PROYECTO FINAL DE INGENIERÍA

VIABILIDAD DE PROBIÓTICOS EN ALIMENTOS FERMENTADOS DE ORIGEN VEGETAL

Carreras, Bárbara Sol – LU 1090677
Ingeniería en Alimentos
Sassi, Camila Belén – LU 1072434
Ingeniería en Alimentos

Tutor:
Larsen, Raúl, Chr. Hansen

Co-Tutores:
Piña, Martín Leonardo, UADE
Guzmán, Leticia, Chr. Hansen

22/07/2022

UNIVERSIDAD ARGENTINA DE LA EMPRESA
FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS EXACTAS

1. Resumen

Los consumidores están cada vez más informados acerca de la calidad de los productos que consumen, de los ingredientes que los componen y de la forma en que son elaborados. Las personas tienden a comprometerse con aquellas marcas que representan sus ideas respecto al cuidado ambiental, el maltrato animal y el cuidado de la salud, entre otras. Dentro de las transformaciones que ha sufrido la industria alimentaria para satisfacer estas exigencias, se encuentra la introducción de los alimentos de base vegetal, como alternativa a los productos tradicionales de origen animal. Este cambio implica la utilización de nuevos ingredientes, tales como microorganismos probióticos, en matrices escasamente estudiadas. Incluso, en el marco de la pandemia desencadenada por la aparición y propagación del virus SARS-CoV-2, se ha incrementado la cantidad de estudios de la relación benéfica que existe entre el consumo de probióticos y el fortalecimiento del sistema inmune.

La presente investigación tiene por objetivo estudiar la viabilidad de los microorganismos probióticos *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB12® y *Lactobacillus rhamnosus* GG, LGG®, en cuatro alimentos vegetales fermentados. Las matrices de estudio serán a base de coco, almendra, soja y quínoa. Los resultados que surjan de esta investigación permitirán acelerar el proceso de desarrollo de nuevos productos. La investigación se llevó a cabo en las instalaciones de la planta piloto de la empresa Chr. Hansen, Buenos Aires. Para realizar los recuentos de los microorganismos probióticos se utilizaron medios de cultivo selectivos agarizados, siguiendo los protocolos recomendados por la empresa. Además, se midieron otros parámetros como la post-acidificación a 6 °C, 13 °C y 25 °C y esfuerzo de corte.

En términos generales, los resultados de los análisis microbiológicos se encontraron dentro del mínimo requerido (10^9 UFC/porción) para generar un efecto beneficioso en el huésped. Esto permite concluir que es viable la adición de microorganismos probióticos en alimentos fermentados de base vegetal ya que son capaces de sobrevivir en el producto final, en condiciones de almacenamiento a 6 °C, durante 30 días y en ciertos casos hasta 45 días. Si bien los resultados fueron alentadores, es necesario profundizar en la investigación de los factores que afectan la viabilidad de los microorganismos probióticos.

Palabras claves: alimentos vegetales fermentados, microorganismos probióticos, viabilidad.

2. Abstract

Consumers are becoming more and more informed about the quality of the products they consume, the ingredients and the way they are made. People tend to commit to those brands that represent their ideas regarding environmental care, animal abuse and health care, and others. Among the transformations that the food industry has undergone to meet these demands, there are plant-based foods, as an alternative to traditional animal origin products. This change involves the use of new ingredients, such as probiotic microorganisms, in poorly studied matrices. Even the frame of pandemic triggered by the emergence and spread of the SARS-CoV-2 virus prompted the study of the beneficial relationship between the consumption of probiotics and strengthening of the immune system.

The present research aims to study the viability of the probiotic microorganisms: *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB12® and *Lactobacillus rhamnosus* GG, LGG®, in four fermented plant foods. The study matrices will be based on coconut, almond, soy and quinoa. The emerging results of this research will speed up the new product development process. It was carried out at the facilities of the pilot plant of the Chr. Hansen company, Buenos Aires. To perform the counts of the probiotic microorganisms, company methodologies were used. In addition, other parameters such as post-acidification at 6 °C, 13 °C and 25 °C and shear stress were measured.

In general terms, the results of the microbiological analysis were found within the minimum required (10^9 CFU/serving portion) to generate a beneficial effect on the guest. This allows to conclude that the addition of probiotic microorganisms in plant-based fermented foods as they can survive in the final product, in storage conditions at 6 °C, for 30 days and in certain cases up to 45 days. Although the results were encouraging, it is necessary to deepen the investigation of the factors that affect its viability.

Key words: fermented vegetable foods, probiotics microorganisms, viability.

ÍNDICE

1. Resumen 2
2. Abstract 3
1. Introducción 8
1.1 Objetivo 8
1.2 Alcance 8
1.3 Alimentos a base de plantas y su mercado 10
1.4 Probióticos 14
1.4.1 Microbiota intestinal 14
1.4.2 Los probióticos y sus características 17
1.4.3 Mecanismos de acción 23
1.4.3.1 Tolerancia a los ácidos gástricos y a la bilis 24
1.4.3.2 Adhesión 25
1.4.3.3 Inhibición de patógenos 26
1.4.3.4 Mejora de la función de barrera 27
1.4.3.5 Interacciones inmunológicas 27
1.4.4 *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB12® 28
1.4.5 *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG®) 31
1.4.6 Factores que limitan la viabilidad de microorganismos probióticos en los alimentos 35
1.5 Situación Covid-19 38
1.6 Alimentos fermentados 40
1.7 Alimentos funcionales 41
1.7.1 Alimentos fermentados adicionados con probióticos 42
1.8 Matrices vegetales alternativas para elaboración de alimentos fermentados adicionados con probióticos 45
2. Materiales y métodos 49

2.1 Materiales 49
2.2 Métodos 50
2.2.1 Análisis de mercado e información nutricional 50
2.2.2 Preparación de sustratos vegetales 51
2.2.3 Homogeneización 53
2.2.4 Tratamiento térmico 53
2.2.5 Fermentación 55
2.2.6 Enfriamiento y pérdida de carga 57
2.2.7 Envasado 58
2.2.8 Liberación de producto 58
2.2.9 Seguimientos 59
2.2.9.1 Post-Acidificación 60
2.2.9.2 Recuento de microorganismos probióticos 61
2.2.9.3 Esfuerzo de corte 64
2.2.9.4 Evaluación sensorial exploratoria 66
3. Resultados 70
3.1 Estudio de mercado 70
3.2 Valores de pH previos a la fermentación 72
3.3 Curvas de fermentación 72
3.4 Liberación de producto final 75
3.5 Post-Acidificación 76
3.6 Recuento de microorganismos probióticos 81
3.7 Esfuerzo de corte 82
3.8 Evaluación sensorial 85
4. Discusión y conclusiones 89
5. Referencias bibliográficas 99
6. Anexos 112

6.1 Anexo A. Especificaciones del cultivo Vega™ nu-trish® BY-101 112
6.2 Anexo B. Especificaciones del cultivo Vega™ nu-trish® GY-101 116
6.3 Anexo C Método de recuento microbiológico para *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB12® 119
6.4 Anexo D. Método de recuento microbiológico para *Lactobacillus rhamnosus GG,* LGG® 121
6.5 Anexo E: Seguimientos bases de coco y almendra 125
6.6 Anexo F: Seguimientos bases de soja y quinoa 126
6.7 Anexo G: Resultados del análisis sensorial 127

INTRODUCCIÓN

1. Introducción

1.1 Objetivo

El presente trabajo tiene por objetivo estudiar la viabilidad de los microorganismos probióticos *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB12® y *Lactobacillus rhamnosus* GG, LGG® durante 45 días en cuatro alimentos vegetales fermentados. Los resultados de esta investigación permitirán favorecer la selección de el/los probiótico/s más convenientes, según su supervivencia, en las distintas matrices elegidas.

Se llevará a cabo un análisis de mercado con el fin de conocer los productos fermentados análogos al yogurt que se comercializan actualmente. Se recabará su información nutricional y se realizarán recuentos microbiológicos a aquellos que contengan probióticos y se comercialicen en Argentina.

Para poder llevar a cabo el estudio de viabilidad de los probióticos seleccionados, se elaborarán prototipos de alimentos vegetales fermentados a base de coco, almendra, soja y quínoa. En el caso de los prototipos a base de coco y almendra el producto final tendrá características similares a las de un yogur batido tradicional. Por otro lado, en los prototipos a base de soja y quínoa, el objetivo es conseguir un producto análogo a un yogur bebible.

En la fermentación se utilizarán cultivos de Chr. Hansen Vega™ nu-trish® BY-101 y Vega™ nu-trish® GY-101, provistos por la empresa, compuestos por microorganismos fermentativos y probióticos. Se evaluará la viabilidad de estos últimos mediante recuentos microbiológicos en placa durante 45 días. A su vez, se medirán otros parámetros de los prototipos finales tales como el descenso de pH a diferentes temperaturas, esfuerzo de corte, y se evaluarán sus características sensoriales. Esta información adicional permitirá complementar la investigación sobre el comportamiento de los microorganismos en estudio y reforzar el fundamento de las conclusiones.

1.2 Alcance

Se llevará a cabo un análisis de mercado de alimentos de origen vegetal análogos a los yogures tradicionales comercializados a nivel mundial. Se evaluarán los ingredientes y la información nutricional de aquellos que se consideren más útiles para la presente investigación.

Además, se elegirán algunos de estos productos que se encuentren dentro del mercado argentino y contengan probióticos relevantes para este estudio, y se le realizarán recuentos microbiológicos.

Se estudiará el comportamiento de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB12® y *Lactobacillus rhamnosus* GG LGG® en cuatro matrices vegetales seleccionadas las cuales consisten en alimentos de origen vegetal que serán fermentados con cultivos provistos por la empresa Christian Hansen. Las materias primas características de las cuatro matrices serán coco, almendra, soja y quinoa. La totalidad de las materias primas para elaborar las bases de coco y almendra serán provistas por una empresa multinacional, y la formulación del alimento es información confidencial. Por otro lado, las matrices de soja y quínoa serán elaboradas a partir de bebidas vegetales comerciales.

Todas las bases serán sometidas al mismo proceso de elaboración de un yogur tradicional con probióticos de manera de obtener un producto con características similares. Durante la fermentación se evaluará la velocidad de descenso del pH de cada una de las bases. Una vez obtenidos los distintos prototipos, se procederá a controlar los parámetros fisicoquímicos y microbiológicos más relevantes durante la vida útil del alimento. Estos son: recuento de bacterias probióticas, pH a 6 °C, 13 °C y 25 °C y esfuerzo de corte.

Adicionalmente se evaluarán características organolépticas de los productos finales mediante un análisis sensorial. No obstante, el alcance del presente trabajo de investigación no abarca el desarrollo del alimento para su aceptación por el consumidor final sino la elaboración de una matriz que sirva como estudio de viabilidad de microorganismos probióticos.

La elaboración de estos alimentos será realizada en la planta piloto de leches fermentadas del Regional Application Center de Latinoamérica, de la empresa Chr. Hansen ubicado en las instalaciones de la Universidad Argentina de la Empresa (UADE). Por otro lado, el seguimiento durante de la vida útil se realizará en los laboratorios de UADE.

La composición de cada una de las matrices vegetales será diferente, por lo que durante este estudio, se hará referencia a ellas por la materia prima más representativa de su formulación. Estas son: coco, almendra, soja y quínoa.

1.3 Alimentos a base de plantas y su mercado

En los últimos años, las cadenas de abastecimiento han tenido que orientarse hacia una producción de alimentos más sensible a las exigencias provenientes de los consumidores, quienes ahora son considerados agentes activos en la cadena alimentaria. Las personas se perciben a sí mismas como consumidores activos, con capacidad de discernir y consideran que sus decisiones forman parte de su identidad (Falguera *et al.*, 2012).

Son diversos los factores que influyen en las decisiones alimentarias de las personas, como por ejemplo pautas culturales, religiosas, modas, educación, situación económica, conciencia alimentaria, estado de ánimo, maltrato animal, cuidado del medio ambiente, etc. El consumidor con sus requerimientos puede modificar el comportamiento del mercado y de la industria, aumentando o disminuyendo la demanda de ciertos productos que satisfagan su deseo de consumo. Según señala Del Greco (2010), la actitud de los consumidores frente a un impulso está cambiando y el acto de alimentarse conlleva mayor razonamiento.

La alimentación incide significativamente tanto en la salud del consumidor como en el medio ambiente. La sustentabilidad de la producción de alimentos es una preocupación constante en algunos sectores de la sociedad ya que la producción, la comercialización y el consumo de diferentes fuentes de nutrientes de la dieta implican un impacto sobre la biodiversidad, el uso del agua y de la tierra, el cambio climático, la salud humana y el bienestar animal (Quesada y Gómez, 2019).

Esta preocupación está trayendo aparejada una disminución en la demanda de alimentos de origen animal en los países más desarrollados (Grasso *et al*., 2020), pues, entre otras razones, se considera que la producción de carne es uno de los principales contribuyentes a los niveles insostenibles de emisión de gases de efecto invernadero y degradación ambiental (Papies *et al*., 2020).

La producción de carne, huevos y lácteos ocupa aproximadamente el 83% de las tierras agrícolas del mundo y contribuye con más del 56% de los alimentos que producen emisión de gases invernaderos, mientras que solo proveen el 37% de todas las proteínas y el 18% de las calorías consumidas. En comparación con fuentes de proteínas de origen vegetal, la producción de carnes rojas requiere una superficie 20 veces más grande y emiten 20 veces más gases de efecto invernadero por cada unidad de proteína comestible. Por esto, el cambio hacia una dieta

con mayor cantidad de vegetales es crucial para reducir el impacto ambiental de la producción de alimentos. Por otro lado, un cambio en la dieta también podría tener beneficios en la salud pública, ya que el consumo de carnes rojas está estrechamente ligado con un incremento en el riesgo de enfermedad coronaria, accidente cerebrovascular y cáncer colorrectal (Papies *et al.*, 2020).

Para que el organismo humano funcione correctamente, la ingesta de proteínas resulta crucial. Las proteínas pueden ser de origen animal o vegetal, según la fuente de obtención. Las proteínas de origen animal son fuente de zinc, hierro hemínico, vitaminas del complejo B y aminoácidos esenciales, son más fácilmente digeribles y aportan todos los aminoácidos esenciales. Sin embargo, su consumo se asocia a un mayor riesgo de mortalidad y desarrollo de complicaciones cardiovasculares. A pesar de que las proteínas de origen vegetal suelen percibirse como una fuente de proteína incompleta al contener una menor o nula cantidad de alguno de los aminoácidos esenciales, es posible obtener proteínas de alta calidad biológica mediante la combinación de fuentes vegetales (Quesada y Gómez, 2019).

La producción de proteínas de origen vegetal implica un impacto ambiental considerablemente menor que la producción de proteínas animales. En consecuencia, es necesario promocionar alternativas que cubran los requerimientos nutricionales de la población y disminuyan el coste para el medio ambiente asociado a la producción y consumo de proteínas de origen animal, y los alimentos a base de plantas son una opción que resulta muy interesante (Quesada y Gómez, 2019).

La preocupación de los consumidores está sustentada principalmente con argumentos éticos, ambientales, de salud y humanitarios, y representa una oportunidad para los productores de alimentos fermentados de base vegetal al poder ofrecer a este mercado en crecimiento un reemplazo de los productos lácteos convencionales. Además, trae aparejada una oferta de alternativas para aquellos que buscan nuevas experiencias (Joergensen, 2020).

"Las marcas relacionadas con alimentos de base vegetal pueden atraer a consumidores que buscan reducir su ingesta de lácteos, asegurando para sus productos un perfil nutricional que incorpore más nutrientes, vitaminas y minerales. En base a las conclusiones de estudios, en América las oportunidades pasan por innovaciones con pre y probióticos que pueden impulsar el crecimiento de este mercado. Además, aquellas marcas que cuentan con claims de

etiqueta limpia y de ingredientes naturales se encuentran en una muy buena posición para atraer a consumidores de este mercado, pudiendo innovar con ingredientes orgánicos y no OGM (Organismos genéticamente modificados), sin saborizantes ni preservantes artificiales." (Joergensen, 2020).

Si bien la apertura de nuevos mercados genera oportunidades para la industria, no siempre es sencillo alcanzar todas las expectativas de los potenciales clientes. Existen factores que pueden llegar a influir negativamente en la decisión de compra de un análogo lácteo. Algunos de ellos son la tendencia *Clean label y* la diferencia de precio entre el producto original y su análogo. Si bien no existe una definición científica del término *Clean label*, se han propuesto varias definiciones e interpretaciones. En general, un producto *Clean label* es aquel que se encuentra libre de aditivos químicos y/o conservantes, posee una lista de ingredientes fácil de interpretar, es un producto natural o mínimamente procesado y/o es orgánico. Respecto a la diferencia de precio, la clave está en convencer a los consumidores de pagar el costo de un nuevo producto, y esto puede ser logrado a través de la comunicación inequívoca de las propiedades saludables a los consumidores (Dey, 2018; Vargas y Simsek, 2021).

En marketing estratégico, la evaluación de fortalezas, oportunidades, debilidades y amenazas (análisis FODA) es una herramienta clave para estudiar la situación actual de una organización. También es una metodología de trabajo que facilita la toma de decisiones considerando tanto los factores internos (fortalezas y debilidades), como los factores externos que ejercen su influencia (oportunidades y amenazas) (Sánchez Huerta, 2020). En la Tabla I se observa esta herramienta aplicada a alimentos y proteínas de origen vegetal, en donde se ve reflejado tendencias y datos del mercado, como también factores relevantes del comportamiento del consumidor.

TABLA I. Análisis FODA del mercado de los alimentos a base de plantas.

Fortalezas	● Se cree que los alimentos de origen vegetal son más saludables ● Se considera que los alimentos de origen vegetal son más respetuosos con el medio ambiente y mejores para el clima. ● Los alimentos de origen vegetal pueden ser favorecidos por proporcionar variedad en la dieta, y porque son novedosos
Oportunidades	● Los desafíos de sostenibilidad alimentan la preocupación y la demanda de los consumidores, así como el apoyo político a las acciones de mitigación en el sector alimentario. ● El desarrollo de una tendencia mundial de alimentos basados en plantas puede mejorar el potencial de exportación de conocimientos, ingredientes y alimentos. ● La calidad de las proteínas vegetales en climas más fríos mejora como efecto secundario del cambio climático.
Debilidades	● Los hábitos, la tradición, la familiaridad y la percepción de lo que es un alimento / comida "adecuada" favorecen las dietas de productos lácteos y de origen animal. ● Existe una creencia de que la carne se necesita incluir nutricionalmente y que es más saciante. ● Se asume y/o percibe que los productos de origen vegetal son menos ricos. ● Todavía hay una falta de conciencia sobre el impacto en la salud y la sostenibilidad de los alimentos de origen animal, y la contribución relativa de los productos de origen vegetal a la salud y la sostenibilidad.
Amenazas	● Las preocupaciones relacionadas con las tendencias de los alimentos de etiqueta limpia sobre el procesamiento y los ingredientes de los alimentos de origen vegetal pueden generar una percepción negativa. ● La preocupación respecto a la salud planteada por las dietas a base de plantas o la inseguridad de los consumidores sobre los posibles riesgos para la salud pueden provocar una reacción violenta contra el mercado de los alimentos de origen vegetal.

Fuente: Aschemann-Witzel *et al.*, 2021.

Actualmente, en los países industrializados, los consumidores han incrementado su interés acerca de los métodos de elaboración y los ingredientes que componen los alimentos

que consumen. Por ejemplo, el uso de agroquímicos en la agricultura convencional genera una percepción negativa en el cultivo de alimentos ya que se los considera "poco naturales". A su vez, algunos componentes alimenticios como los aditivos artificiales son vistos como desconocidos y asociados a alimentos poco saludables (Asioli *et al.*, 2017). La tendencia *Clean label* o etiqueta limpia, tal como se menciona en la Tabla I, es percibida por la industria como una amenaza. Esta preferencia de los consumidores ha llevado a la industria a comunicar cuando un determinado ingrediente o aditivo no está presente en el alimento o incluso si el alimento ha sido producido de un modo más "natural". Del mismo modo, los desarrolladores optan por materias primas de origen natural ya que se asocian con un factor de calidad exigido por quienes eligen alimentos con etiqueta limpia.

Los alimentos a base de plantas que tratan de alcanzar características lo más similares posible a las de un alimento de origen animal, se encuentran con una gran dificultad al tratar de cumplir todos los requerimientos de los consumidores. Esto se debe principalmente a que los alimentos vegetales son muy distintos a los de origen animal no solo en cuanto a sus características organolépticas sino también en cuanto a su composición, estructura, función, entre otros. Todas estas características deben ser ajustadas o complementadas con la adición o transformación de ingredientes. Esta adición o transformación (muchas veces química) hace muy dificultosa la tarea de alcanzar los estándares de calidad de esta nueva tendencia de etiquetas limpias.

1.4 Probióticos

1.4.1 Microbiota intestinal

Existen microorganismos que colonizan y forman comunidades en el cuerpo humano. Estos microorganismos se encuentran en diversos sitios o nichos del cuerpo, como la piel, boca, ojos, vías respiratorias, intestino, vías urinarias y vagina. Todas las comunidades, formadas por microorganismos, sus genes y sus metabolitos reciben el nombre de microbioma. Se dice que es el ecosistema interno que conforman los humanos y los microorganismos (bacterias, virus, hongos y otros microorganismos). Estos se benefician del cuerpo humano, obteniendo oxígeno y nutrientes, pero también ayudan a la digestión, producen vitaminas y protegen contra la

colonización de otros microorganismos patógenos. El microbioma no es igual en todas las personas, varía en cada uno y la colonización se desarrolla durante toda la vida (Uzcátegui, 2016; Sebastián Domingo y Sánchez Sánchez, 2018).

Por otra parte, el término microbiota hace referencia a la comunidad de microorganismos vivos residentes en un nicho ecológico determinado. Es así que la microbiota intestinal se compone por el conjunto de microorganismos vivos que residen en el intestino humano (Sebastián Domingo y Sánchez Sánchez, 2018).

La colonización microbiana y el desarrollo de una microbiota intestinal propiamente dicha comienza en el parto. La microbiota intestinal es clave para el desarrollo del sistema inmunitario y la homeostasis del individuo, y las primeras fases de colonización son cruciales.

Los géneros bacterianos principales de la microbiota intestinal se muestran en la Figura 1. Cada individuo alberga un patrón distintivo de comunidades microbianas con cepas únicas que no se encuentran en otros individuos. Estudios demuestran que factores tales como la dieta, la ingesta de fármacos, los viajes o el tiempo de tránsito colónico, generan variabilidad en la composición microbiana de las muestras fecales de un mismo individuo, pero las diferencias entre distintos sujetos son mucho mayores que las variaciones intra-individuales (Álvarez *et al*., 2021).

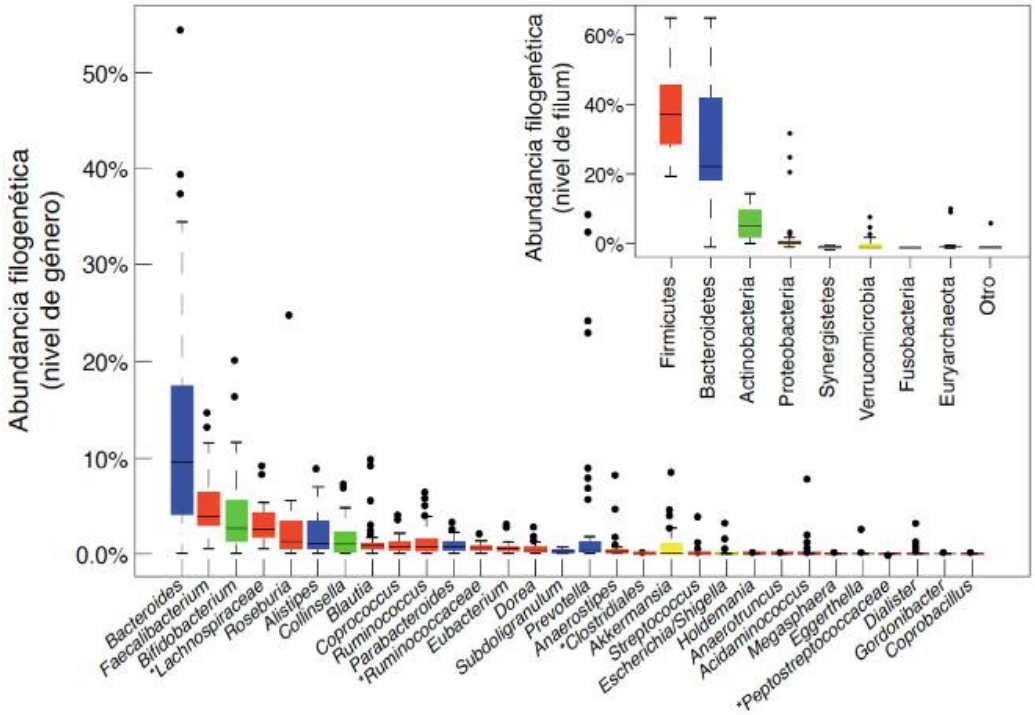


Figura 1. Composición bacteriana de la microbiota intestinal a nivel de género y a nivel de fílum o clase, obtenida mediante secuenciación masiva de ADN extraído de muestras fecales de individuos españoles y daneses de la cohorte MetaHIT. Fuente: Álvarez *et al*., 2021.

La microbiota intestinal ejerce un papel clave en el proceso digestivo y la regulación metabólica del hospedador. Parte de los alimentos no se degradan completamente, y los residuos que no se absorben llegan al colon donde hay alta densidad de microorganismos con recursos metabólicos adicionales capaces de degradarlos. *"El proceso más común es la fermentación de hidratos de carbono complejos, que generan ácidos grasos de cadena corta (AGCC), principalmente ácido acético, propiónico y butírico, que son utilizados por los enterocitos como fuente de energía o pasan al torrente circulatorio alcanzando órganos distales y ejerciendo importantes funciones. Es también importante la producción de compuestos bioactivos como vitaminas del grupo B o la vitamina K"* (Álvarez *et al*., 2021).

Los microorganismos intestinales influyen en el desarrollo y en la función del sistema inmunológico, y un desequilibrio con el hospedador puede dar lugar a desregulación inmunológica, y contribuir a la aparición de trastornos inflamatorios y autoinmunes crónicos (Álvarez *et al*., 2021).

Durante periodos de estrés, enfermedad o tratamiento con antibióticos es común que la microbiota intestinal sufra un cambio a favor de bacterias dañinas que pueden causar diarrea y pérdida de apetito. Un crecimiento excesivo de estas bacterias patógenas y su consecuente invasión en el sistema conducen a problemas inflamatorios, inmunológicos, neurológicos y endocrinológicos. Es por esto que la inducción del crecimiento de bacterias beneficiosas es una de las posibles soluciones para normalizar las condiciones de salud, lo cual podría lograrse a través de la suplementación de células bacterianas viables en el huésped. Los probióticos pueden ayudar a desarrollar la microbiota benéfica en el intestino y excluir a las bacterias patógenas, es así que su uso en el tratamiento de desórdenes gastrointestinales está en crecimiento, junto con el descubrimiento de los efectos beneficiosos de estos agentes (Hemaiswarya *et al*., 2013).

1.4.2 Los probióticos y sus características

Los probióticos han sido definidos como microorganismos vivos que, cuando son administrados en cantidades adecuadas, confieren beneficios para la salud del huésped (Bertazzoni *et al.*, 2013).

En el nuevo milenio las investigaciones sobre la microbiota intestinal y los probióticos en general han aumentado significativamente. Los probióticos deben ser microorganismos vivos al momento de la ingesta para ser considerados como tales. La mayoría de los microorganismos probióticos son bacterias, pertenecientes a los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* (Jungersen *et al.*, 2014).

Lactobacillus es un género compuesto por microorganismos Gram-positivos, catalasa negativos, los cuales producen ácido láctico como principal producto final de la fermentación de carbohidratos. Esta característica hace que ciertas especies de lactobacilos sean conocidas por su aplicación en la fermentación de alimentos. No forman esporas, en su mayoría no son móviles y generalmente tienen forma de bastón. Las células se suelen agrupar en forma de cadenas y su temperatura óptima de crecimiento se encuentra entre 30 °C y 40 °C. En general son tolerantes al oxígeno, pero crecen adecuadamente en condiciones de anaerobiosis (Pot *et al.*, 2014). En el año 1901, *Lactobacillus delbrueckii* fue nombrada la primera especie del género *Lactobacillus*. Desde ese entonces, investigadores de la taxonomía microbiana han

agrupado más de 250 especies dentro de este género, aunque algunas de ellas no se encontraban estrechamente relacionadas. En los últimos años, con la ayuda de análisis de secuenciación de ADN, las distintas especies que conformaban el género *Lactobacillus* se han dividido en 25 géneros. En la Tabla II se puede observar algunas de las especies probióticas pertenecientes al género *Lactobacillus*, en la columna de la izquierda su previa clasificación taxonómica y en la derecha la actual.

TABLA II. Especies del género *Lactobacillus* y su taxonomía actual.

Especies de *Lactobacillus* (género previo)	Taxonomía actual
Lactobacillus acidophilus	Sin cambios
Lactobacillus amylovorous	Sin cambios
Lactobacillus brevis	*Levilactobacillus brevis*
Lactobacillus casei	*Lacticaseibacillus casei*
Lactobacillus crispatus	Sin cambios
Lactobacillus delbrueckii ssp. *bulgaricus*	Sin cambios
Lactobacillus fermentum	*Limosilactobacillus fermentum*
Lactobacillus gasseri	Sin cambios
Lactobacillus helveticus	Sin cambios
Lactobacillus jhonsonii	Sin cambios
Lactobacillus lactis	*Lactobacillus delbruekii* ssp. *lactis*
Lactobacillus paracasei	*Lacticaseibacillus paracasei*
Lactobacillus plantarum	*Lactiplantibacillus plantarum*
Lactobacillus reuteri	*Limosilactobacillus reuteri*
Lactobacillus rhamnosus	*Lacticaseibacillus rhamnosus*

Fuente: Nyanzi *et al.*, 2021.

En cuanto al género *Bifidobacterium*, estas bacterias se encuentran comúnmente en el tracto gastrointestinal humano y de diversos animales. Están presentes desde los primeros días después del nacimiento y durante toda la vida, pero en distintas cantidades. Su morfología es variable, generalmente bacilar (Figura 2). Pueden ser cortos, regulares y con ramificaciones. Son Gram-positivos, inmóviles, no esporulados y anaerobios estrictos. Hay un cierto grado de

tolerancia al oxígeno que depende de la especie y del medio de cultivo. Son usualmente cóncavos y se disponen aislados, en cadenas o en forma de V, Y, o T (Collado Amores, 2004).

Figura 2. Morfología del género *Bifidobacterium*. Fuente: Collado Amores, 2004.

Su temperatura óptima de crecimiento oscila entre 36 °C y 38 ºC para las especies de origen humano y 41°C y 43 ºC para las especies de origen animal. El crecimiento se frena a temperaturas menores de 20 ºC y mayores de 46 ºC. En la actualidad, el género se encuentra conformado por 28 especies, en la Tabla III se pueden observar aquellas especies que generalmente se utilizan como probióticas (Collado Amores, 2004).

TABLA III. Especies del género *Bifidobacterium* comúnmente utilizadas como probióticos.

Especies de *Bifidobacterium* más utilizadas como probióticos
Bifidobacterium adolescentis
Bifidobacterium animalis
Bifidobacterium breve
Bifidobacterium bifidum
Bifidobacterium infantis
Bifidobacterium lactis
Bifidobacterium longum

Fuente: Nyanzi *et al.*, 2021.

Como se deduce de la definición de probiótico, los beneficios de cualquier producto probiótico en la salud dependen de la administración de una concentración adecuada de

microorganismos vivos en la formulación ingerida. La dosis de microorganismos a ingerir se define comúnmente como unidades formadoras de colonias (UFC) por porción, por mililitro o por gramo. Para establecer la concentración de probióticos en una formulación se deben tener cuenta la dilución fisiológica en el tracto gastrointestinal, la capacidad de la cepa probiótica de sobrevivir al ambiente gastrointestinal, la forma de administración, la cepa probiótica y el efecto beneficioso esperado. (Bertazzoni *et al.*, 2013).

No existe un reglamento general para el uso y dosaje de probióticos para todos los países que integran la Unión Europea. En algunos de ellos, como España, no existe una legislación específica que regule el uso de probióticos en alimentación humana, por lo que tampoco existen requisitos específicos para los mismos, ni una lista de probióticos autorizados. Según el Ministerio de consumo de España (2020) el uso de probióticos en alimentación está sujeto a los requisitos generales establecidos en el Reglamento (CE) nº 178/2002 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 28 de enero de 2002 que establece directrices de seguridad alimentaria. Hasta tanto no haya un criterio uniforme por parte de los Estados miembros de la Unión Europea, se considera que podría aceptarse que figure el término "probiótico/s" en la etiqueta de los productos alimenticios, tanto de fabricación nacional como de otros países de la Unión Europea. En todos los casos, estos productos deben cumplir con el requisito de seguridad.

Según el Ministerio de Salud de Italia (2018), la cantidad suficiente para obtener una colonización provisoria del intestino por parte de una cepa es como mínimo 10^9 células vivas por día. Como consecuencia, la porción diaria recomendada debe contener dicha cantidad de al menos una de las cepas probióticas. Se podría aprobar el uso de cantidades menores solo si existen estudios científicos que comprueben la habilidad de la cepa utilizada para colonizar el intestino.

A su vez, el Código Alimentario Argentino, en el capítulo XVII Alimentos de régimen o dietéticos, Artículo 1389, establece que *por un alimento con probióticos, se entiende aquel alimento con una carga de células viables que deberá estar comprendida entre 10^6 y 10^9 UFC/g durante su período de duración mínima (Código Alimentario Argentino, 2011)*.

En la presente investigación se fijó el tamaño de porción en 100 g (1 pote) por lo que el recuento mínimo de microorganismos probióticos debería ser igual o superior a 10^7 UFC/g.

Dicho recuento, que supera el establecido por el Código Alimentario Argentino fue determinado a fin de cumplir con la exigencia del mercado.

En la Figura 3 se puede observar la concentración de probiótico recomendada según el tamaño de porción de alimento.

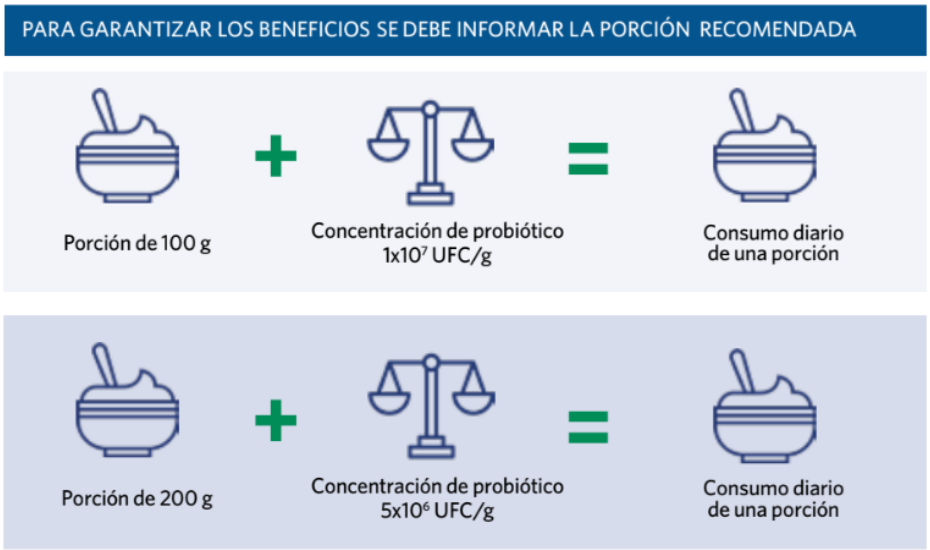


Figura 3. Dosis diaria de consumo de probióticos recomendada. Fuente: Costa *et al.*, 2020.

Una vez ingeridos, el pasaje a través del tracto gastrointestinal representa diferentes desafíos para los probióticos ya que deben enfrentarse a elevadas concentraciones de ácidos gástricos y sales biliares capaces de desactivarlos. A su vez, la adhesión de los microorganismos probióticos a las células de la mucosa intestinal es considerada necesaria para poder lograr su acción en el huésped. Muchos patógenos no pueden ejercer sus efectos perjudiciales si no se adhieren a la mucosa intestinal, por lo que parte de la acción beneficiosa de los probióticos está determinada por su supuesta capacidad de interferencia en la adherencia de células patógenas (Bezkorovainy, 2001).

En resumen, además de estar vivos al momento de la ingesta y en concentraciones adecuadas, la supervivencia de un microorganismo probiótico al paso a través del tracto gastrointestinal y la adherencia en el intestino delgado y colon son fundamentales para generar efectos beneficiosos en el huésped.

Dentro de los principales beneficios que proveen los probióticos a la salud del huésped se pueden nombrar la prevención de enfermedades cardíacas, modulación de la microbiota

autóctona, prevención de la diarrea aguda y asociada a antibióticos, prevención de infecciones en el tracto respiratorio, prevención del cáncer, entre otros. Cada uno de estos efectos tiene un grado de validez determinado por pruebas científicas que se puede observar en la Tabla IV (Iniesta *et al.*, 2011).

En 2002 FAO/OMS establecieron directrices para seleccionar probióticos basadas en distintos indicadores tales como identificación de la cepa, caracterización biológica, eficacia y seguridad. El consumo de probióticos confiere diferentes beneficios a la salud del consumidor y su eficacia depende del tipo de cepa y la cantidad de la dosis administrada, entre otros (Castañeda Guillot, 2018).

Los probióticos se han aplicado a numerosos campos de la medicina (Tabla IV), entre los que cabe citar: asma y otras enfermedades de base alérgica, cardiopatía isquémica, cáncer de colon, infecciones urogenitales, infecciones del tracto respiratorio, el efecto sobre los niveles de colesterol, etc. Sin embargo, para ciertos efectos, los datos clínicos son aún insuficientes (Iniesta *et al*, 2011).

TABLA IV. Efectos establecidos y propuestos de los probióticos sobre la salud.

Efecto probiótico	**Validez de las pruebas científicas**
Prevención y/o reducción de la duración y síntomas de la diarrea aguda. Prevención o alivio de la diarrea asociada a antibióticos. Mantenimiento de la remisión de la pouchitis crónica en remisión.	Efectos bien establecidos mediante estudios clínicos y aceptados por la comunidad científica.
Modulación de la microflora autóctona (normalmente intestinal). Inmunomodulación y/o regulación. Reducción de la concentración de enzimas promotoras del cáncer y/o metabolitos en descomposición en el intestino.	Efecto bien establecido. Sin embargo, debido a las dificultades metodológicas y a las interdependencias complejas entre los mecanismos reguladores, la correlación con los efectos verdaderos sobre la salud no está clara.

Prevención o alivio de las alergias y enfermedades atópicas en niños. Efectos beneficiosos sobre alteraciones microbiológicas, inflamación y otras dolencias en conexión con: enfermedades inflamatorias del intestino, infección por *Helicobacter pylori*, sobrecrecimiento bacteriano. Tratamiento de infecciones urogenitales. Prevención y alivio de dolencias irregulares e inespecíficas del tracto gastrointestinal en personas sanas. Prevención de las infecciones del tracto respiratorio (resfriado común, gripe) y otras enfermedades infecciosas.	Efectos observados solo en ciertos grupos. Por lo tanto, son necesarios más estudios para descubrir qué sector de la población puede beneficiarse de un probiótico y bajo qué circunstancias.
Prevención del cáncer. Normalización de las deposiciones, tanto en frecuencia como en consistencia, en sujetos con obstipación o colon irritable. Prevención o tratamiento de las enfermedades cardíacas isquémicas. Mejora de las enfermedades autoinmunes (por ejemplo, artritis).	Debido a los insuficientes datos clínicos y/o datos epidemiológicos, los efectos no pueden considerarse como bien establecidos y científicamente demostrados.
Disminución de los niveles de colesterol. Mejora de la absorción mineral. Mejora de la flora bucal y prevención de caries.	A la luz de los datos existentes, no se ha demostrado del todo la existencia de efectos fiables.

Fuente: Iniesta *et al.*, 2011

1.4.3 Mecanismos de acción

No existe un único mecanismo de acción que determine el comportamiento de los probióticos, sino que intervienen diversos mecanismos en conjunto. Como se observa en la Figura 4, dentro de ellos se encuentra la secreción de compuestos antimicrobianos, la competencia por nutrientes en el tracto GI (gastrointestinal) y por los receptores presentes sobre la superficie del epitelio intestinal, la estimulación del sistema inmune y del tejido linfoide, la secreción de mucina, la estabilización de la permeabilidad intestinal y por último la degradación de receptores de toxinas (Iniesta *et al.*, 2011).

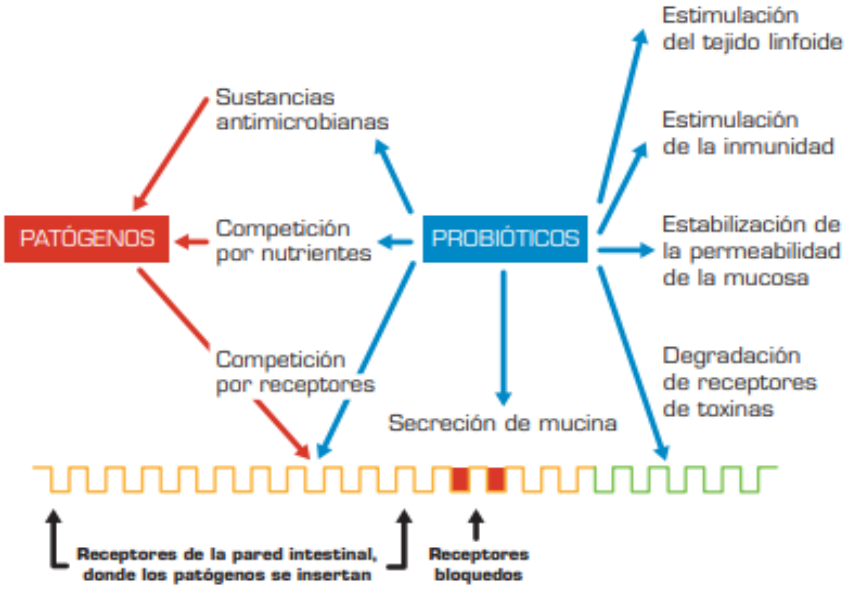


Figura 4. Mecanismos de acción de los probióticos Fuente: Iniesta *et al.*, 2011.

1.4.3.1 Tolerancia a los ácidos gástricos y a la bilis

La exposición de las bacterias a los jugos gástricos y a la bilis puede afectar la viabilidad de los microorganismos probióticos. La mayoría de las bacterias vivas que se administran oralmente mueren cuando llegan al estómago, por lo que aquellas cepas que sean utilizadas como probióticos deben tener la capacidad de resistir el traspaso por el tracto gastrointestinal (Iniesta *et al.*, 2011).

La bilis es una solución acuosa cuyos principales componentes son ácidos biliares, colesterol, fosfolípidos y el pigmento biliverdina. Funciona como un detergente biológico que emulsiona y solubiliza lípidos, es por esto que tiene un rol esencial en la digestión de las grasas. A su vez, esta propiedad le confiere actividad microbiana principalmente a través de la disolución de las membranas bacterianas. Como consecuencia, la habilidad de las cepas probióticas de hidrolizar las sales biliares es uno de los criterios de selección (Begley *et al.*, 2006).

Para llevar a cabo dicha hidrólisis es necesario que el genoma microbiano contenga la secuencia que codifica para la hidrolasa de sales biliares (BSH). Esto le provee una ventaja a la célula ya que permite una rápida respuesta a altas concentraciones de sales biliares y, por lo

tanto, facilita el pasaje seguro del intestino delgado hacia el intestino grueso (Jungersen *et al.*, 2014).

A su vez, teniendo en cuenta que los cultivos probióticos pueden encontrarse con condiciones de acidez tanto en los productos alimenticios como en el tránsito por el tracto gastrointestinal, la tolerancia a un pH bajo es un factor crítico para su funcionalidad. Esta tolerancia ha sido relacionada con la inducción de la actividad de una H^+-ATPasa, enzima que controla la concentración de los iones H^+ y, por lo tanto, determina el pH dentro y fuera de la célula (Mättö *et al.*, 2006).

1.4.3.2 Adhesión

La adhesión de una cepa a la mucosa intestinal es otro de los principales criterios de selección para microorganismos probióticos ya que se lo considera un prerrequisito para la colonización. Dado que el epitelio se regenera constantemente (cada 3 o 4 días), las bacterias pueden colonizar sólo si la tasa de generación es mayor que la tasa de recambio celular. Es por esto que el efecto benéfico de los probióticos está relacionado con su capacidad de interactuar y adherirse a la pared intestinal (Iñiguez Palomares y Acedo Félix, 2006).

El mecanismo de adhesión es un proceso complejo que involucra diversos factores los cuales aún no son comprendidos en su totalidad. Existen reportes acerca del rol de los exopolisacáridos y compuestos proteicos, sin embargo, por el momento no se ha elaborado una caracterización precisa de estos componentes celulares. Se cree que mientras más tiempo permanezca una cepa probiótica en el tracto GI, hay mayor posibilidad de que genere efectos beneficiosos. Así mismo, otros efectos beneficiosos de las cepas probióticas como la inhibición de patógenos y la inmunomodulación podrían estar asociadas con la habilidad de adhesión (Izquierdo *et al*., 2008).

En general, la adhesión de microorganismos es analizada *in vitro* utilizando monocapas de células de cultivo de tejido intestinal. A pesar de que estos métodos son valiosos, no tienen en cuenta la posible adhesión a la capa de mucus que recubre las células epiteliales en el intestino. Esta capa tiene dos funciones, sirve como barrera para la adhesión de ciertos microorganismos y a su vez puede proporcionar un hábitat para la adhesión de otros.

Otro factor a considerar es la composición de la población en el intestino, la cual cambia a través del tiempo. Por ejemplo, las bifidobacterias tienen un menor nivel de adhesión en las personas de edad avanzada. Es por esto que la edad del huésped también tiene una influencia en la habilidad de adhesión y posterior colonización de la cepa probiótica (Ouwehand *et al.*, 1999).

A su vez, puede variar el sitio de colonización entre especies, los lactobacilos suelen colonizar el intestino delgado, mientras que las bifidobacterias, el intestino grueso (Iniesta *et al.*, 2011).

1.4.3.3 Inhibición de patógenos

En los últimos años se obtuvo evidencia de que la introducción de probióticos en el intestino puede llevar a la inhibición del crecimiento de potenciales microorganismos patógenos a través de diversos mecanismos. Dentro de ellos se encuentra la capacidad de disminuir el pH del lumen, secretar proteínas bactericidas (bacteriocinas) e inhibir la adhesión de las bacterias a las células epiteliales (Boirivant y Strober, 2007).

Respecto a la capacidad de disminución de pH, se ha observado que las bacterias ácido lácticas (BAL) son capaces de producir sustancias antimicrobianas. Dentro de las BAL se encuentran diversos probióticos. En general, las sustancias producidas son ácidos orgánicos, específicamente ácido láctico y acético. Otras sustancias comunes son peróxido de hidrógeno y dióxido de carbono. Si las BAL se encuentran metabólicamente activas durante el pasaje a través del intestino es probable que se produzcan algunas de estas sustancias (Ouwehand *et al.*, 1999).

Como se mencionó anteriormente, aquellas cepas que son consideradas probióticas deben tener la capacidad de adherirse a la mucosa intestinal para colonizar y luego interactuar con el huésped. Esta interacción es necesaria para la modulación del antagonismo contra patógenos. Algunos lactobacilos y bifidobacterias pueden producir bacteriocinas, estas moléculas actúan en la membrana citoplasmática de las bacterias, específicamente en las vesículas para interrumpir la fuerza protón motriz (Plaza Diaz *et al.*, 2019).

Otro de los mecanismos mencionados es la inhibición de la adhesión de patógenos a las células epiteliales, lo cual se debe al aumento de la secreción de mucinas por parte de las

bacterias probióticas. Esto aumenta su propia capacidad de adherirse a la mucosa intestinal y bloquea la unión de los microorganismos patógenos (Iniesta *et al.*, 2011).

1.4.3.4 Mejora de la función de barrera

El tracto gastrointestinal es una de las regiones sometidas a mayores concentraciones de antígenos ya que posee la superficie de contacto más extensa con el medio exterior, con un valor de aproximadamente 250 m^2. La función de barrera intestinal es clave para el mantenimiento de la homeostasis intestinal y la prevención de respuestas inmunes exageradas que facilitan la inflamación crónica del intestino. Este rol de defensa es asumido por numerosos elementos con el propósito de preservar la integridad intestinal. La superficie de la mucosa del tracto gastrointestinal está revestida de células epiteliales que impiden el paso de sustancias potencialmente nocivas, pero también son responsables de la absorción de nutrientes y electrolitos, por lo que se requiere una barrera semipermeable. Es decir, debe permitir el paso selectivo a ciertas sustancias y evitar el acceso de otras. (Salvo Romero *et al.*, 2015).

"La pérdida de la integridad de la barrera epitelial puede desencadenar desórdenes como la enfermedad inflamatoria intestinal, infecciones entéricas, enfermedad celíaca y algunas enfermedades autoinmunes. Ciertos probióticos han demostrado ser capaces de contribuir al mantenimiento de la integridad de la barrera intestinal, así como de prevenir y reparar daños en la mucosa causados por distintos agentes como alérgenos presentes en los alimentos, microorganismos patógenos y citoquinas proinflamatorias. Los mecanismos de acción implicados en este beneficio incluyen la secreción de mucina, la modulación de la fosforilación de proteínas y el aumento de la resistencia transepitelial" (Martínez Cuesta *et al.*, 2012).

La mejora de la función de barrera es uno de los mecanismos más aceptados de los probióticos debido a que este efecto en la barrera intestinal podría reducir el pasaje de patógenos y antígenos. (Jungersen *et al.*, 2014).

1.4.3.5 Interacciones inmunológicas

El sistema inmunitario consiste en diferentes órganos linfáticos como el intestino, bazo, médula ósea, etc., así como en diferentes tipos celulares. Las interacciones antigénicas entre

esas células inducen una respuesta celular inmunitaria mediada por células activadas y a una respuesta humoral mediada por anticuerpos. Estas complejas interacciones celulares conducen a la respuesta inmunitaria sistémica. El intestino es el órgano inmune más extenso del cuerpo humano ya que contiene la mayoría de células linfoides. A su vez, hospeda a un inmenso número de bacterias comensales comúnmente denominadas "microbioma humano" las cuales tienen un rol importante en la salud del huésped. Aunque las interacciones entre el microbioma intestinal y el organismo del huésped aún no son completamente comprendidas, estas bacterias han sido relacionadas con obesidad, diabetes, alergias, desórdenes psiquiátricos y enfermedad de las arterias coronarias. Las bacterias probióticas productoras de ácido láctico y, en general, todas las probióticas, tienen mecanismos de acción que pueden influir y modular las respuestas inmunitarias, en parte mediadas por el tejido linfoide asociado al intestino (gut associated lymphoid tissue, GALT) (Tormo Carnicé, 2006; Kim y Pritts, 2017).

Los efectos inmunomoduladores de los probióticos protegen al hospedador frente a infecciones y procesos de inflamación intestinal crónica ya que son capaces de actuar sobre la inmunidad innata y la adquirida. Pueden estimular la respuesta inmunitaria específica en situaciones de sensibilización a antígenos (alergias) o bien ejercer efectos intestinales antiinflamatorios. Esto da lugar a nuevos enfoques en el tratamiento del dolor abdominal y la enfermedad del colon irritable (Martínez Cuesta *et al.*, 2012).

1.4.4 *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB12®

Bifidobacterium es un género productor de ácido láctico, Gram positivo, con forma de bastón, no esporulado, no móvil y anaeróbico (Figura 5). En general y relativo a la etapa de vida, una proporción mayor de *Bifidobacterium spp*. en el tracto gastrointestinal es considerado un beneficio para la salud. *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* (*B. lactis*) es una de las especies más comunes de *Bifidobacterium* utilizada en América del Norte y Europa como probiótico en productos comerciales, particularmente en alimentos fermentados en los cuales ha sido utilizado por décadas (Uusitupa *et al.*, 2020).

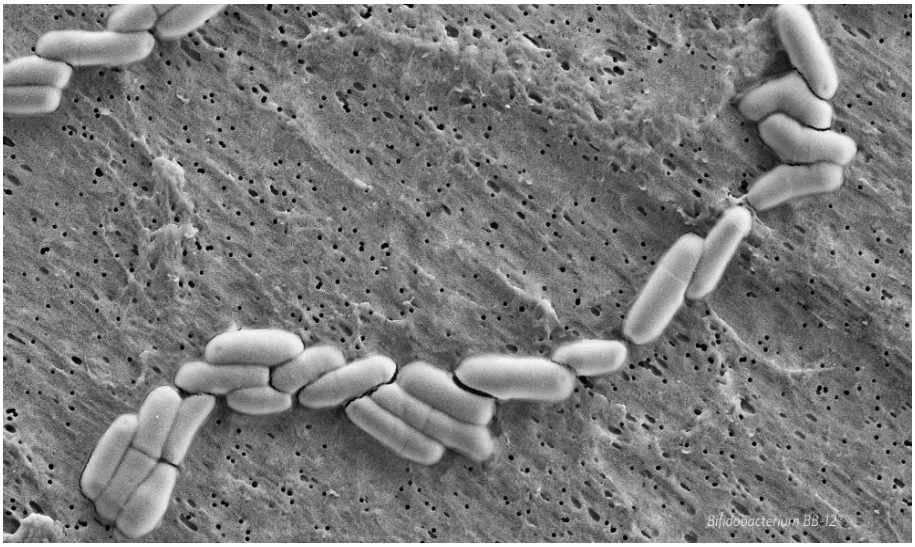


Figura 5. Microscopía electrónica de barrido de células de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12; Fuente: Jungersen *et al.*, 2014.

Como consecuencia de su extensa aplicación, *B. lactis* es el probiótico más documentado de las bifidobacterias. Se describe en más de 300 publicaciones científicas de las cuales más de 100 son publicaciones de estudios clínicos en humanos. En particular, se ha comprobado que la cepa *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 sobrevive al tracto gastrointestinal y contribuye a una microbiota saludable. Además, ha sido demostrado que mejora la función intestinal, posee efecto protector contra la diarrea y reduce los efectos secundarios de tratamientos con antibióticos. Respecto a la función inmunológica, estudios clínicos han demostrado que BB12® aumenta la resistencia del cuerpo a infecciones respiratorias comunes y reduce la incidencia de infecciones agudas en el tracto respiratorio (Jungersen *et al.*, 2014). Los mecanismos y características de la cepa han sido establecidos mediante diversas pruebas *in vitro*. Se considera seguro para su uso como ingrediente dietario en alimentos y suplementos dietéticos para ser consumidos por una población sana, incluidos los recién nacidos prematuros (Jungersen *et al.*, 2014).

En la Tabla V se detallan los mecanismos específicos de acción de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12.

TABLA V. Mecanismos específicos de acción de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12

	***Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12**
Tolerancia a los ácidos gástricos y a la bilis	Contiene un gen que codifica la sal biliar hidrolasa, enzima de gran importancia para hacer frente a las altas concentraciones de sales biliares en el intestino delgado. BB-12® demostró en estudios *in vitro* una alta tolerancia al ácido gástrico y la bilis en comparación con otras bifidobacterias y se adapta a pH muy bajos. La mayoría de las células de la cepa *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* BB-12® pueden sobrevivir a las condiciones del tracto gastrointestinal después del consumo por parte de los humanos.
Adhesión	Se sospecha que la capacidad que tiene para adherirse a las células intestinales humanas se debe a glucoproteínas y polisacáridos que se encuentran en su superficie. Esta juega un papel clave en la interacción con las células epiteliales del intestino. Se ha demostrado que los componentes de la superficie bacteriana pueden verse afectados por el tratamiento con proteasa (tripsina, pepsina y proteinasa K) y otras diversas afecciones. BB-12® ha demostrado propiedades de alta adherencia en varios entornos *in vitro*. Esta evidencia respalda que BB-12® posee la capacidad de colonizar transitoriamente las superficies mucosas del intestino, persistir en estos sitios y, por lo tanto, aumentar la posibilidad de producir efectos beneficiosos para la salud.
Inhibición de patógenos	La inhibición de patógenos se ve facilitada a través de múltiples mecanismos que incluyen: producción de sustancias inhibidoras (ácidos orgánicos, H_2O_2, bacteriocinas); competencia de nutrientes; eliminación / degradación de toxinas; competencia por los sitios de adherencia (moco, receptores celulares); modulación de coagregación y virulencia; e inducción de respuestas inmunes del huésped. BB12® es capaz de inhibir patógenos gastrointestinales importantes a través de la producción de una sustancia antimicrobiana, así como a través de la competencia por la adhesión de la mucosa.

Conservación de la función de barrera	En un estudio *in vitro*, los productos de fermentación de BB-12® aumentaron la fuerza de la unión estrecha (red de proteínas transmembranales que forman puntos de adhesión entre célula y célula) significativamente por encima de la del control sin tratar. Indujeron el mayor aumento en la resistencia eléctrica transepitelial en comparación con otras cepas probadas. BB-12® puede aumentar la fuerza de la unión estrecha y proteger contra la interrupción de la función de barrera epitelial.
Interacciones inmunológicas	Las propiedades inmunoestimulantes tanto local como sistémicas han sido confirmadas en varios estudios. BB-12® es capaz de interactuar con las células inmunes y demuestra que su presencia y colonización en el tracto gastrointestinal puede tener un impacto beneficioso sobre la función inmunológica.

Fuentes: Collado *et al.*, 2007; Martins *et al.*, 2009, Jungersen *et al.*, 2014.

1.4.5 *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG®)

Lactobacillus rhamnosus GG fue la primera cepa perteneciente al género *Lactobacillus* identificada por su habilidad de sobrevivir a la presencia de ácidos gástricos, proliferar en un medio que contiene bilis, y adherirse a los enterocitos. Además, es capaz de producir biofilms que protegen mecánicamente la mucosa intestinal y compuestos que previenen la apoptosis de epitelio intestinal, entre otros beneficios. Existe un gran número de investigaciones respecto a esta cepa debido a su extensivo uso como microorganismo probiótico (Capurso, 2019).

El cultivo comercial LGG® está compuesto por bacterias catalasa negativa y con forma de bastón (Figura 6). *Lactobacillus rhamnosus* GG fue aislado por primera vez en el año 1985 y se propuso como una posible cepa probiótica debido a su capacidad de adhesión y elevada tolerancia al ácido y la bilis. Se introdujo al mercado en 1990 y desde entonces se ha convertido en una de las cepas probióticas más estudiadas y comercializadas. Las características y mecanismos de acción de la cepa han sido establecidas a través de diversos estudios genómicos e *in vitro.* Se han identificado genes importantes para la función probiótica, incluidos aquellos que codifican pili que facilitan la adhesión e inmunomodulación (Stage *et al.*, 2020).

Figura 6. Células de *Lactobacillus rhamnosus* GG (microfotografía por microscopio electrónico de barrido) (Kankainen *et al*., 2009).

Como se describió en la sección de mecanismos de acción de los probióticos, son diversos los mecanismos que actúan en conjunto para que dichos microorganismos puedan proveer un beneficio a la salud del huésped. Como se puede observar en la Figura 7, estas interacciones se producen en distintas partes del tracto gastrointestinal.

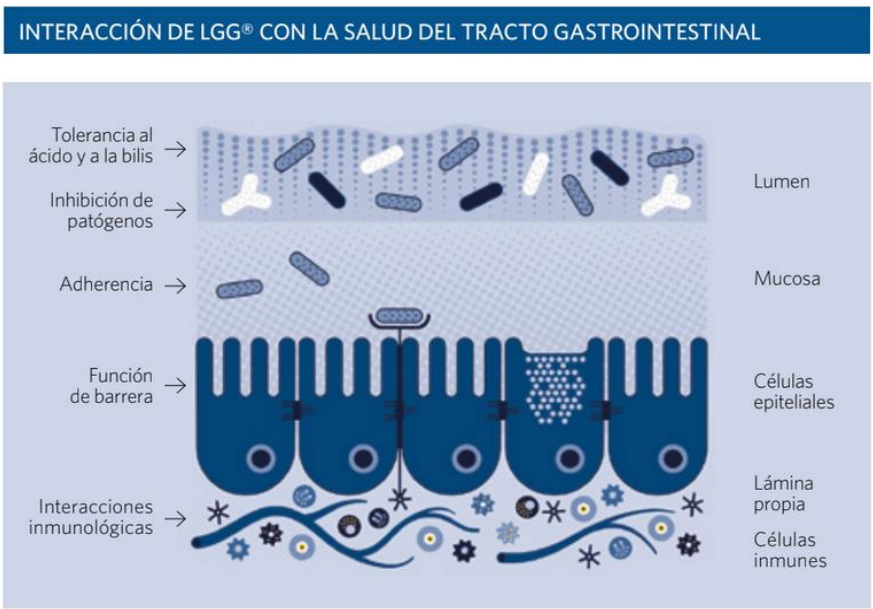


Figura 7. Interacciones de LGG con el tracto gastrointestinal. Fuente: Costa *et al.*, 2020.

En la Tabla VI se pueden observar los mecanismos de acción específicos que posee la cepa.

TABLA VI: mecanismos específicos de la cepa *Lactobacillus rhamnosus* GG.

	***Lactobacillus rhamnosus* GG**
Tolerancia a los ácidos gástricos y a la bilis	Contiene en su genoma un gen que codifica para la hidrolasa de sales biliares, enzima de gran importancia para hacer frente a las altas concentraciones de sales biliares en el intestino delgado.
Adhesión	Comparado con otros lactobacilos, tiene la mayor adhesión a las células de la mucosa, dicha adhesión podría estar facilitada por la presencia de una proteína adhesiva (LGG-0186) y un exopolisacárido rico en galactosa. La producción de exopolisacáridos protegen al probiótico en el tracto GI, favoreciendo su supervivencia y persistencia dentro del huésped. A su vez, tiene pelos en la superficie de sus células llamados pili de adhesión (Figura 8), los cuales son importantes para la adherencia al mucus y a las células epiteliales. En estudios en humanos, esto se vio reflejado en una persistencia durante un periodo más largo de tiempo por parte del LGG® en el intestino que otras cepas estrechamente relacionadas que naturalmente no poseen pili de adhesión.
Inhibición de patógenos	Es capaz de inhibir una serie de patógenos, incluyendo diversas cepas de *Escherichia coli, Streptococcus, Pseudomonas, Salmonella, Bacteroides fragilis y Clostridium.* También en Caco-2, un modelo celular de la barrera epitelial intestinal, demostró que podría inhibir *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium. Las moléculas responsables de estos efectos antimicrobianos aún no son totalmente comprendidas. Cierta evidencia apunta al ácido láctico como responsable, sin embargo, otros experimentos demuestran que por sí solo no podría tener dicho efecto por lo que se supone que otras moléculas se encuentran involucradas. En otros estudios se comprobó que genera microcina, una bacteriocina que resiste proteasas y calentamiento. En paralelo, estabiliza la función gastrointestinal de barrera limitando el paso de antígenos y otras macromoléculas desde el

	lumen hacia la mucosa. Además, puede interferir con la presencia de potenciales patógenos (*S. aureus, S. pneumoniae* y *estreptococos* beta-hemolíticos) en el tracto respiratorio superior.
Conservación de la función de barrera	Produce p40, una proteína soluble capaz de mejorar la apoptosis inducida por citocinas en las células del epitelio intestinal, preservando la función de barrera. A su vez, existe evidencia *in vitro* de que un tratamiento con LGG podría resultar efectivo para prevenir lesiones A/E (adherencia y eliminación) en las células de la barrera epitelial. Es un tipo de lesión distintiva causada por *Escherichia coli* O157:H7 y *Escherichia coli* enteropatógena La cepa de LLG® secreta dos proteínas principales: Msp1/p75 y Msp2/p40, las cuales han demostrado proteger monocapas de Caco-2 contra la ruptura de la barrera epitelial inducida por peróxido de hidrógeno
Interacciones inmunológicas	El ácido lipoteicoico (LTA) es un componente importante de la pared celular de las bacterias Gram positivas y su estructura varía entre las diferentes cepas. El LTA de LGG® interactúa con receptores de la superficie del epitelio intestinal de Caco-2 (modelo de la barrera intestinal) y estimula la expresión de IL-8, una quimiocina que tiene un papel clave en el reclutamiento de neutrófilos para el sitio de infección. Los neutrófilos son células blancas que combaten las infecciones. Por lo tanto, la capacidad de LGG® para estimular la IL-8 de las células epiteliales in vitro sugiere que puede inducir respuestas inmunitarias en el intestino del huésped que son beneficiosas para combatir infecciones.

Fuentes: Johnson-Henry *et al.*, 2008; Seth *et al*., 2008; Kankainen *et al.*, 2009; Cáceres y Gotteland, 2010; Koskenniemi *et al*., 2011; Lebeer *et al.*, 2011; Claes *et al.*, 2012; Douillard *et al.*, 2013; Capurso, 2019, Stage *et a*l., 2020.

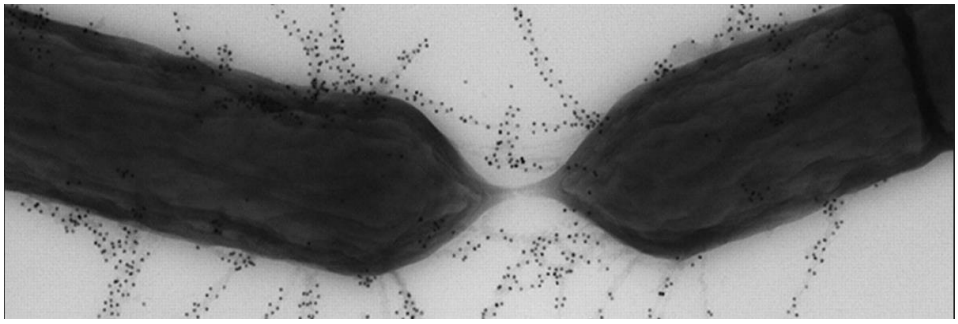


Figura 8. Pili de adhesión en la superficie celular de *Lactobacillus rhamnosus* GG obtenida mediante microscopía electrónica de transmisión. Fuente: Reunanen *et al*., 2012.

1.4.6 Factores que limitan la viabilidad de microorganismos probióticos en los alimentos

"La viabilidad de bacterias probióticas en leches fermentadas depende de numerosos factores tales como la cepa en particular, la forma de inoculación (cultivos congelados, liofilizados o con una etapa previa de propagación in situ en planta), el momento del agregado a la leche (antes o después de la fermentación), la temperatura de fermentación, la acidez final y la composición química de la matriz, las interacciones con las bacterias lácticas acidificantes, las condiciones de temperatura durante la vida de estante y el oxígeno disuelto, etc. Esta lista no es exhaustiva ya que es probable que existan interacciones entre estos factores, los cuales no han sido completamente abordados por estudios científicos. A pesar de esto, el pH final del producto y el fenómeno de post-acidificación durante la vida de estante han sido señalados como los dos factores más importantes en las pérdidas de viabilidad celular de bacterias probióticas en leches fermentadas experimentales y comerciales" (Taranto *et al.*, 2005).

El pH óptimo de crecimiento para las diferentes especies de bifidobacterias varía entre 6,00-7,00, mientras que en el caso de los lactobacilos se encuentra entre 5,50-6,09. Es por esto que la producción de ácido láctico por parte de las bacterias fermentadoras, y el consecuente descenso de pH, afecta directamente la viabilidad de estos microorganismos. Según la especie y cepa tendrán distinta tolerancia. Por ejemplo, los lactobacilos poseen un sistema de regulación de pH que les permite sobrevivir en rangos de pH desde 3,7 a 4,3 (Meybodi *et al.*, 2020). Sin

embargo, las bifidobacterias son menos tolerantes y un nivel de pH por debajo de 4,6 es perjudicial para su supervivencia (Tripathi y Giri, 2014).

Respecto a los ácidos orgánicos, se ha identificado que tienen un efecto mayor en la viabilidad de los microorganismos probióticos que el pH, ya que en su forma no ionizada pueden atravesar las membranas de las células. Esto provoca que a pH menores a 4,5 se necesite mucha energía para mantener el pH intracelular, lo cual lleva a una insuficiente cantidad de ATP requerido para otras funciones vitales para la célula y por consecuencia, muerte celular (Meybodi *et al.*, 2020).

La temperatura de fermentación es otro de los factores más importantes ya que posee influencia en la supervivencia de los microorganismos cómo también sobre las propiedades organolépticas del producto final. La temperatura ideal de crecimiento de la mayoría de las bacterias probióticas varía entre 37 y 43 °C. A su vez, en comparación con los alimentos fermentados tradicionales, aquellos que contienen probióticos presentan un tiempo de fermentación mayor (Meybodi *et al.*, 2020).

Complementariamente, el contenido de oxígeno y el potencial redox afectan la viabilidad de los probióticos durante la fermentación y especialmente durante el período de almacenamiento. El oxígeno molecular puede condicionar para la supervivencia ya que la mayoría de las bacterias probióticas son anaerobias estrictas. Durante el almacenamiento, el nivel de oxígeno dentro del envase debe ser tan bajo como sea posible para evitar la generación de peróxidos y radicales libres los cuales son tóxicos y por lo tanto generan muerte del microorganismo. El grado de sensibilidad al oxígeno varía considerablemente entre las distintas especies y cepas de los probióticos (Tripathi y Giri, 2014). La mayoría de los lactobacilos son anaerobios aerotolerantes mientras que las bifidobacterias son anaerobios con una gran sensibilidad al nivel de oxígeno disuelto. Algunas etapas del proceso de elaboración de un alimento fermentado, como la agitación o mezclado como también la difusión de oxígeno durante el almacenamiento generan que el producto final tenga concentraciones de oxígeno que pueden afectar la viabilidad (Meybodi *et al.*, 2020).

El cultivo iniciador también es otro factor importante, ya que por ejemplo se ha observado que *Streptococcus thermophilus* puede ayudar al crecimiento de probióticos, sobre todo las bifidobacterias, por su capacidad de consumo de oxígeno. También se observó que la

combinación de distintas cepas probióticas puede causar menor crecimiento y supervivencia durante el almacenamiento en comparación con una única cepa, esto se cree que es por la competencia por los nutrientes y actividades antagónicas (Meybodi *et al.*, 2020).

Sumado a los distintos factores anteriormente mencionados, la encapsulación de bacterias probióticas es un buen método para proteger a estos microorganismos y mejorar su resistencia ante las diferentes condiciones ambientales y tecnológicas. Sin embargo, varios métodos empleados para mejorar la viabilidad de los probióticos, como la microencapsulación, inducen un costo adicional al proceso de producción de alimentos (Terpou *et al.*, 2019).

Respecto a los ingredientes utilizados, pueden ser protectores, neutros o perjudiciales a la estabilidad probiótica. Dentro de los aditivos que se utilizan generalmente en la industria alimentaria se encuentran diferentes tipos de azúcares, edulcorantes, sales, compuestos aromáticos, aromatizantes, colorantes naturales o artificiales, nisina, natamicina, lisozima, etc. Algunos de estos aditivos podrían afectar drásticamente el crecimiento y la viabilidad de las bacterias probióticas utilizadas tanto para productos fermentados como no fermentados. Sin embargo, otros como la glucosa, vitaminas, minerales, caseína, proteína de suero hidrolizada, extracto de levadura y antioxidantes actúan como promotores del crecimiento (Tripathi y Giri, 2014).

Durante el almacenamiento, la viabilidad de las bacterias probióticas está inversamente relacionada a la temperatura de almacenamiento. Los productos deben almacenarse preferiblemente a una temperatura de 4 °C a 5 °C. En un estudio se observó que la temperatura de almacenamiento óptima para *Bifidobacterium lactis* Bb-12 es de 8 °C, esto se atribuye a la resistencia de las bifidobacterias a las bajas temperaturas de refrigeración (Tripathi y Giri, 2014).

Por último, diferentes aspectos del envase como el material del cual está compuesto, el grosor, la permeabilidad a gases (oxígeno y vapor de agua) y a la luz y la técnica de envasado, podrían influir en la supervivencia. La mayoría de los productos lácteos se comercializan en envases de plástico con alta permeabilidad al oxígeno lo cual genera un inconveniente para la supervivencia de los probióticos. Por el contrario, la permeabilidad es extremadamente baja en los envases de vidrio, favoreciendo la supervivencia. Sin embargo, debido al elevado costo del vidrio junto con los peligros inherentes a su manipulación, los fabricantes optan por envases de

plástico. Considerando el contexto mencionado, se deben analizar enfoques alternativos como el envasado al vacío, la adición de compuestos absorbentes de oxígeno o packaging activos con materiales que proporcionen una barrera a este gas. (Tripathi y Giri, 2014).

1.5 Situación Covid-19

El mundo entero se encuentra actualmente en medio de la pandemia de COVID-19, situación que inició en el año 2019 en Wuhan, China, con la aparición y rápida propagación del virus SARS-CoV-2 que se transmite por vías respiratorias y gastrointestinales.

Dado que aún no se conoce ninguna terapia farmacológica efectiva ya sea para tratamiento como para un cuidado preventivo, se han comenzado a implementar terapias alternativas que muestren algún grado de efectividad contra la enfermedad.

Actualmente, las personas están interesadas en consumir alimentos que, además de su aporte nutricional, brinden beneficios adicionales como la prevención de enfermedades. Es por eso que se extiende un marcado interés en el consumo de probióticos, haciendo foco en las bacterias ácido lácticas (BAL) y sus metabolitos. Al ingerir estos microorganismos en una dosis adecuada, se producen cambios en la microbiota intestinal repercutiendo positivamente en el estado de salud del consumidor. El intestino desempeña un papel muy importante respecto a los mecanismos de tolerancia y defensa ante patógenos y enfermedades. Una manera de fortalecer el sistema inmunológico en general, es manteniendo un balance adecuado en la microbiota intestinal, evitando así, los efectos de contraer cualquier infección (Lara Lopez *et al*., 2020).

Según Mogollon y Chalbaud (2020), hay diversos estudios que reflejan que existen relaciones entre los microbiomas de las vías respiratorias y gastrointestinales, y el consumo de probióticos. Estos últimos modulan el sistema inmunológico al restablecer el balance gastrointestinal, lo cual implica una respuesta del sistema inmune. Esto explicaría la capacidad que tendrían los probióticos para prevenir la infección y combatir esta enfermedad.

En la Tabla VII se señalan los probióticos más usados por algunos países, que podrían prevenir el impacto de la pandemia de COVID-19. Los efectos beneficiosos que proveen a la salud del huésped han sido comprobados mediante diversos estudios en pacientes con enfermedades respiratorias.

TABLA VII. Probióticos mayormente utilizados por algunos países, indicación y administración.

Productos	Indicación	Cuándo administrar
Lactobacillus casei DN-114 001; DanActive/Actimel, bebida fermentada, Danone	Redujo la incidencia y duracion de enfermedades del tracto respiratorio	Una vez al día durante la pandemia
Lactobacillus rhamnosus GG; Culturelle u otras marcas	Para la salud digestiva e integridad de la barrera intestinal	Una cápsula al dia durante la pandemia
Bifidobacterium breve Yakult, y *Lactobacillus casei* Shirota; disponibles como bebidas fermentadas	Menor incidencia en neumonías	Una vez al día, cada uno durante la pandemia
Lactobacillus gasseri PA 16/8, Bifidobacterium longum SP 07/3, y B. bifidum MF 20/5; Tribion harmonis, Merck	Reduce la duración y severidad de los resfriados	Una vez al día, durante la pandemia
Bifidobacterium longum BB536; Morinaga, y en muchas otras formulaciones	Eleva la respuesta inmune innata y previene infección de influenza	Una vez al día, durante la pandemia
Pediococcus pentosaceus 5-33:3, *Leuconostoc mesenteroides* 32-77:1, *L. paracase* i ssp. *paracasei* 19, *L plantarum* 2,362 mas inulina, salvado de avena, pectina, y almidon resistente: Medipharm, Suecia	Para reducir la tasa de Sindrome de respuesta inflamatoria sistémica, infecciones, sepsis, cuidados intensivos, respiración asistida y mortalidad	Para pacientes COVID-19

Fuente: Baud *et al.*, 2020.

Se ha demostrado que los probióticos pueden influir positivamente en el estado de ánimo, ansiedad y depresión. Esto sugiere que además de contribuir con el fortalecimiento del sistema inmune, los probióticos, especialmente *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, tienen un impacto positivo en los efectos que trae el confinamiento en la salud mental y fisiológica (Interián Gómez *et al.*, 2021).

Desde Marzo 2020, se han llevado a cabo diversos estudios acerca de los beneficios de los probióticos tanto en el tratamiento como en la prevención de COVID-19. Dentro de los probióticos que se encuentran disponibles comercialmente, *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG) es particularmente alentador dado al éxito de las cepas de *Lactobacillus* en numerosos estudios in vitro. Se creería que el control de la propagación de una infección o enfermedad por parte de LGG podría disminuir la incidencia de los síntomas de la infección por COVID-19 (Wischmeyer *et al*., 2022).

1.6 Alimentos fermentados

Se puede definir a un alimento fermentado como aquel producto comestible que resulta de la transformación de alguna materia prima por microorganismos. En consecuencia, el alimento fermentado (en el estado que se presente) aporta nutrientes, posee aroma, sabor y textura diferentes a las del producto vegetal o animal a partir del que se generó (Hurtado Escamilla y Hurtado Escamilla, 2007).

En sus inicios, el hombre fue nómada, y dedicaba su tiempo a la recolección de alimentos y caza de animales, y luego viajaba a otros lugares en los que podía obtener sus alimentos dependiendo la época del año. Cuando decidió establecerse en un lugar determinado, y finalmente se volvió sedentario, comenzó el desarrollo de la agricultura. Derivado de las actividades agrícolas y pecuarias, surgió la necesidad de almacenar los excedentes y conservar los alimentos. Así mismo aparece la posibilidad de cocinarlos o prepararlos de diversas formas, entre ellas, el secado al sol como la más sencilla, y posiblemente la más compleja, la fermentación (Wacher Rodarte, 2014).

Los alimentos fermentados han estado presentes en la dieta desde los inicios de la civilización, como por ejemplo el vino, el pan y la cerveza, y aún continúan teniendo gran importancia en algunos países donde son parte de la cultura y tradiciones locales. A su vez, existen otros tales como el kéfir (bebida láctea fermentada), el kéfir de agua (agua fermentada adicionada de azúcar y/o fruta) o la kombucha (té azucarado fermentado) que se han revalorizado en los últimos años (Bengoa *et al.*, 2020). Existen una amplia variedad de alimentos fermentados en las diversas culturas que varían en función de la materia prima de origen y el tipo de fermentación. Algunos pueden sonar más conocidos para la cultura occidental, pero estos alimentos van desde el mikyuk o mukuk (piel y grasa de ballena fermentada por los Inuit), hasta bebidas fermentadas a base de flores que elaboran los aborígenes australianos. Las dietas tradicionales como la asiática o la mediterránea, incluyen una extensa cantidad y variedad de alimentos fermentados (Gómez Gallego *et al.*, 2020).

La fermentación de los alimentos produce cambios en su composición, tanto en macronutrientes como en micronutrientes. Muchas bacterias ácido lácticas tienen la capacidad de contribuir a la hidrólisis del almidón e incrementar su digestibilidad y disponibilidad energética. Lo mismo ocurre con la digestibilidad y biodisponibilidad de las proteínas. Es

importante tener en cuenta que esto no ocurre con todos los microorganismos, por lo que se debe seleccionar el cultivo adecuado para el objetivo del desarrollo. A su vez, la fermentación puede producir nuevos compuestos que aportan un efecto positivo para la salud, como por ejemplo el lactato, vitaminas del grupo B, aminoácidos esenciales, polisacáridos, antioxidantes, entre otros (Gómez Gallego *et al.*, 2020).

En los últimos cien años, debido a la industrialización de la producción de alimentos, la diversidad de los alimentos fermentados tradicionales se redujo, y por lo tanto también su consumo. Sin embargo, el desarrollo de alimentos que otorgan beneficios para la salud es una de las principales tendencias de alimentación de los últimos años. Esto ha incrementado el interés y la curiosidad de los consumidores por los alimentos fermentados y sus potenciales efectos benéficos para la salud (Gómez Gallego *et al.*, 2020).

1.7 Alimentos funcionales

En los últimos años se ha estado estudiando la relación que existe entre la alimentación y las enfermedades crónicas no transmisibles y los efectos de la alimentación en las funciones cognitivas, inmunitarias, capacidad de trabajo y rendimiento deportivo. Los consumidores son cada vez más conscientes de su autocuidado y buscan en el mercado aquellos productos que contribuyan a su salud y bienestar (Araya y Lutz, 2003).

Aún no se ha encontrado una definición universal para los alimentos funcionales. Esta terminología no hace referencia a un grupo de alimentos sino más bien a un concepto. En términos generales, se los conoce por sus beneficios para la salud, más allá de su contenido nutricional. "*Un alimento funcional es un alimento convencional, que hace parte de una dieta estándar en cantidades normales, además de aportar un valor nutritivo, ha demostrado tener un beneficio en la salud mediante un efecto fisiológico en la reducción del riesgo de enfermedades crónicas*" (Bernal Castro *et al.*, 2017).

Las maneras de obtener alimentos funcionales son diversas. Generalmente se elaboran a partir de alimentos tradicionales modificando algún elemento de su formulación, aumentando o añadiendo algún componente que brinda un efecto positivo para el consumidor, sacando alguno que tenga efectos fisiológicos negativos o incluso sustituyendo total o parcialmente un componente con efecto negativo por otro cuyo impacto sea positivo (Cadaval *et al.*, 2005).

Como se mencionó anteriormente, el interés por la alimentación y la salud, va más allá de la acción preventiva de los nutrientes en los déficits nutricionales. Este interés se explica por las asociaciones que se han evidenciado entre el consumo de alimentos de origen vegetal, esencialmente frutas, verduras, cereales integrales y leguminosas y sus efectos preventivos sobre el cáncer y las enfermedades cardiovasculares. Los alimentos funcionales son fuente de antioxidantes, tales como las vitaminas C, E y A y beta caroteno, entre otros componentes beneficiosos para la salud humana (Araya y Lutz, 2003).

Los alimentos funcionales se han dirigido también hacia los aditivos alimentarios que puedan ejercer un efecto positivo sobre la composición de la microbiota intestinal; la atención se centró principalmente en probióticos, prebióticos y más recientemente en simbióticos. Los alimentos probióticos y prebióticos son alimentos considerados como funcionales. Los alimentos probióticos son alimentos que contienen microorganismos vivos, y que ingeridos en las cantidades adecuadas y suficientes, producen efectos benéficos en la salud de quien lo consume. Actúan de forma directa e indirecta interactuando con la microbiota intestinal.

Un prebiótico, es un componente alimenticio no digerible que estimula selectivamente el crecimiento de varias especies bacterianas del colon, o modifican su actividad metabólica mejorando en consecuencia la salud del hospedador (Díaz *et al.*, 2014).

Existen muchos productos alimenticios y farmacéuticos que contienen probióticos en su composición. Muchos de ellos no solo contienen una cepa, sino que existen también combinaciones de diversas especies de microorganismos. Incluso hay asociaciones entre probióticos, vitaminas y prebióticos para otorgar beneficios adicionales al consumidor con su ingesta (Lara Lopez *et al.*, 2020).

1.7.1 Alimentos fermentados adicionados con probióticos

En los últimos años se ha impulsado el desarrollo de alimentos funcionales probióticos, siendo estos productos alimenticios que además de su valor nutritivo intrínseco ayudan a mantener el estado de salud general del organismo. Además de resultar beneficiosos para la salud del consumidor, el agregado de bacterias probióticas en la elaboración de alimentos fermentados suele modificar sus propiedades sensoriales. Esto se debe al sinergismo entre los probióticos y los cultivos iniciadores (Taranto *et al.*, 2005).

No obstante, los microorganismos utilizados para la producción de leches fermentadas, *S. thermophilus* y *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, no son de origen intestinal y por lo tanto difícilmente sobreviven a las condiciones extremas encontradas durante el tránsito gastrointestinal (Vinderola, 2011).

Tradicionalmente, la ingesta de probióticos estuvo asociada a productos lácteos fermentados tales como leches fermentadas, yogur y queso. Sin embargo, existe un notable aumento en los casos de intolerancia a la lactosa, alergia a la proteína de la leche y problemas asociados a las dietas altas en colesterol. Esto, sumado a los cambios de estilo de vida hacia el veganismo, el aumento de las preocupaciones éticas sobre el bienestar animal y los impactos negativos sobre el ambiente de la producción de lácteos hace que exista una demanda en aumento de productos alternativos no lácteos. El tamaño del mercado mundial de estos productos fue valorado en 13.021 millones de dólares en EE.UU. en 2018, y se estima que se ampliará a 38.805 millones de dólares para 2026. El segmento de bebidas, que incluye leches alternativas y bebidas probióticas no lácteas, fue el sector más destacado representado la mayor participación en el mercado mundial y se espera que crezca a mayor velocidad en los próximos años (Rasika *et al.*, 2020).

En el caso de los productos lácteos, el desarrollo de alimentos probióticos fue rápido ya que la matriz es naturalmente adecuada para este tipo de cultivos. En la actualidad se están comenzando a tener en cuenta otros factores como que las matrices lácteas no tienen la ventaja de ser sustentables como las matrices vegetales. La industria láctea y la producción de leche son contaminantes a gran escala, se encuentran dentro de las industrias más contaminantes debido a su elevado consumo de agua. Los formatos de alimentos no lácteos son conocidos por sus complejidades tecnológicas y los desafíos que presentan, pero a pesar de ello existen varios productos comercialmente viables y exitosos en tiendas minoristas. Sin embargo, cada matriz alimentaria es única por lo que las industrias necesitan estandarizar y optimizar la formulación básica para cada producto que tenga requerimientos en sus características sensoriales, fisicoquímicas, extendida vida útil de anaquel y estabilidad química, todo a un costo razonable (Dey, 2018; Feil *et al.*, 2020).

La inclusión de microorganismos probióticos en matrices vegetales presenta un gran desafío para la industria. Existen diversos factores como la composición fisicoquímica,

bioactiva y sensorial, que limitan la viabilidad de estos microorganismos y la estabilidad del producto durante el almacenamiento. Aun así, este tipo de matrices ha demostrado ser un excelente sustrato para la síntesis celular y la producción de ácido láctico (Bernal Castro *et al.*, 2017).

Un enfoque exitoso para el desarrollo de productos probióticos debe abordar las tendencias del mercado y preferencias de los consumidores, las propiedades fisicoquímicas de la matriz alimentaria seleccionada y la potencial interacción entre la cepa probiótica y los ingredientes de la matriz durante el proceso de elaboración y la vida útil. La salud seguirá estando a la vanguardia de las estrategias de negocio de nuevos productos y es por esto que los productores de alimentos y bebidas están buscando incorporar probióticos en todos los grupos de alimentos y matrices. Sin embargo, existen ciertas preocupaciones en el desarrollo de productos probióticos como la credibilidad de los "claims" saludables, los requisitos de acceso a los mercados y la falta de conocimiento por parte de los consumidores. Para que haya una mayor aceptación, deben desarrollarse en formatos con los que los clientes estén más familiarizados (Dey, 2018).

El mercado de alimentos probióticos está creciendo rápidamente debido al aumento de la preocupación de los consumidores acerca del impacto de la alimentación en la salud. Actualmente los productos probióticos abarcan entre el 60 y 70% del mercado de alimentos funcionales y los lugares de mayor consumo son Asia, Australia y el este de Europa. Sin embargo, las ventas en América están aumentando día a día, siendo EEUU, Brasil, Canadá y México los países de principal consumo. Las bebidas de origen vegetal son consideradas una buena matriz alimentaria para la incorporación de probióticos por sus características como composición nutricional y pH adecuados para el crecimiento y supervivencia de los probióticos (Rufino Pallás, 2021).

En la Fig. 9 se observan los resultados de una encuesta realizada a consumidores en Latinoamérica en el año 2019, que demuestran un marcado interés en el fortalecimiento del sistema inmunológico, y cierto conocimiento en la relación que existe entre el consumo de microorganismos probióticos y el bienestar.

Figura 9. Resultados de encuesta realizada a consumidores de latinoamérica. Fuente: Costa *et al.*, 2020.

1.8 Matrices vegetales alternativas para elaboración de alimentos fermentados adicionados con probióticos

Se seleccionaron coco, almendra, soja y quinoa como materias primas alternativas para obtener las matrices en las que se llevará a cabo la investigación de viabilidad de microorganismos probióticos.

"El coco es el fruto de la planta denominada "cocotero" o "palma de coco" (Coco nucifera L., familia Palmae), y es aprovechado en múltiples aplicaciones (Trujillo Sánchez y Arias Maya, 2013).

El coco y sus productos derivados contienen cantidades significativas de componentes biológicamente activos como vitaminas, antioxidantes, compuestos fenólicos y aminoácidos que contribuyen a sus propiedades antioxidantes (Nayik y Gull, 2020). Además, representa una fuente calórica importante y por su composición en ácidos grasos podría considerarse como un alimento funcional. Casi el 25% de la producción mundial de coco se consume principalmente en forma de bebida, y en forma secundaria como ingrediente en preparaciones gastronómicas. Existe una tendencia actual de consumo de este tipo de alimentos debido a los altos contenidos de ácidos grasos que contribuyen con el sistema inmunológico al controlar bacterias, virus y parásitos (Fuentes Cuiñas, 2019).

La almendra (*Prunus dulcis*) es una drupa, pertenece a la familia Rosaceae y ocupa el primer lugar en la producción de frutos secos a nivel mundial. El grano comestible se utiliza principalmente como snack o como ingrediente en productos de panadería y confitería, y los subproductos para alimentación de ganado. Los frutos secos son ricos en proteínas, lípidos, fibra dietética, vitaminas y minerales, y la semilla contiene compuestos bioactivos como compuestos fenólicos, tocoferoles, esteroles y resveratrol (Gupta *et al*., 2020).

Los alimentos a base de almendra suelen atraer a los consumidores por su alto contenido proteico y por la posibilidad de mantenerse frescos por un tiempo prolongado a diferencia de los lácteos en general, que tienden a deteriorarse (Fuentes Cuiñas, 2019). Además, su consumo ha sido asociado a diversos beneficios nutricionales los cuales incluyen la disminución del colesterol, protección contra diabetes y potenciales propiedades prebióticas. Por otro lado, pueden desencadenar respuestas inmunitarias adversas en personas alérgicas, razón por la cual es importante garantizar el etiquetado preciso de los alimentos que contengan dicho ingrediente para proteger la salud de los consumidores (López Calleja *et al*., 2014).

La soja (*Glycine max)* es una planta perteneciente a la familia Fabaceae, o familia de las leguminosas. Se cultiva principalmente por sus semillas, de contenido medio en aceite y alto contenido de proteína. Es rica en fitoquímicos beneficiosos para el ser humano y, por lo tanto, se considera un cultivo alimenticio nutracéutico o funcional. Reduce el riesgo de una variedad de enfermedades peligrosas como la aterosclerosis, la osteoporosis y diversos tipos de cáncer (cáncer de mama, útero y próstata) (Ponnusha *et al.*, 2011).

La soja es uno de los principales cultivos en Argentina, donde suele ocupar el 60 % de la superficie sembrada con cultivos agrícolas (Strada Rodriguez y Vila, 2015). Además, se le han atribuido propiedades beneficiosas para la salud referentes a trastornos asociados con la menopausia (Fuentes Cuiñas, 2019). La soja contiene varios compuestos bioactivos, entre ellos, las isoflavonas, que son un tipo de polifenoles (por lo que tienen una actividad antioxidante), pero que también tienen actividad como fitoestrógenos. Si bien las isoflavonas pueden encontrarse también en otros vegetales que forman parte de la dieta humana, la soja es uno de los alimentos con mayor contenido (Pérez Leonard *et al.*, 2013).

La quinoa (Chenopodium quinoa Willd.), planta perteneciente a la familia Chenopodiaceae, es conocida en el mundo entero por sus propiedades nutricionales. La semilla

es de origen andino, cultivada en Argentina durante miles de años desde la domesticación. En los años noventa, la quinoa ha sido clasificada por la NASA como un cultivo emergente con propiedades nutricionales apto para misiones espaciales humanas a largo plazo debido a su alto contenido en proteínas y composición única de aminoácidos que le otorgan alto valor biológico, en particular en lo que respecta a lisina y sulfuraminoácidos. La quinoa es una fuente de flavonoides y otros compuestos bioactivos con potenciales efectos sobre la salud. Además, la quinoa posee alto contenido de vitaminas, especialmente C, E y del complejo B. También es rica en minerales como el hierro, fósforo, potasio y calcio (Nascimento *et al.*, 2014; Pichihua, 2016).

En los últimos años, el desarrollo de bebidas vegetales derivadas de leguminosas, cereales, pseudocereales, nueces y semillas ha ido en incremento, posicionando a la bebida a base de soja como la preferida por los consumidores (García Hernández y Rodríguez Hernández, 2021). Esto es consecuencia del interés por adoptar dietas saludables que ayuden a prevenir enfermedades, lo cual a su vez impulsa el desarrollo de diversos alimentos funcionales como aquellos que contienen prebióticos y probióticos. El aumento del consumo de sustitutos de productos lácteos provocó que la industria se oriente al desarrollo de productos vegetales que ofrezcan los mismos beneficios probióticos (Fuentes Cuiñas *et al*., 2020).

Según el Clúster alimentario de Galicia (2020) dentro de las bebidas "*plant-based*", la más consumida es la de soja (21%), seguida de la de almendra (17%) y la de coco (15%). De las innovaciones en leche y sus análogos registrados entre 2015 y 2019, alrededor del 52% presentan un claim con referencia a su origen "*plant-based*". Esto incluye a las mencionadas anteriormente y otras a base de arroz, quinoa, guisantes, entre otras.

Teniendo en cuenta las características de las materias primas mencionadas se elaborarán 4 prototipos de yogur análogo que servirán como matriz de estudio para evaluar la viabilidad de microorganismos probióticos en alimentos vegetales fermentados. Con las matrices basadas en coco y almendra se elaborarán dos productos fermentados con textura similar a la de un yogur batido tradicional, mientras que con las basadas en soja y quinoa los productos fermentados serán líquidos. En todos los casos, los sustratos vegetales (inicialmente líquidos previos a su fermentación) serán adicionados con cultivos compuestos por microorganismos fermentativos y probióticos para llevar a cabo la investigación.

MATERIALES Y MÉTODOS

2. Materiales y métodos

La elaboración de los prototipos e investigación de viabilidad de los microorganismos probióticos en cada uno de ellos se llevó a cabo en las instalaciones de la planta piloto de la empresa Chr. Hansen ubicada en el edificio de laboratorios de la Universidad Argentina de la Empresa, Buenos Aires. La elaboración de cada uno de los prototipos fue realizada una única vez tal como se detalla en la sección 2.2 Métodos.

2.1 Materiales

Se eligieron cuatro materias primas características para elaborar los alimentos líquidos fermentados: coco, almendra, soja y quínoa. La formulación de los alimentos de coco y almendra que se utilizaron como base de los prototipos finales de estudio es propiedad confidencial de la empresa proveedora. Se utilizaron como ingredientes principales harina de coco, aceite de coco y pasta de almendra.

Por otro lado, para los alimentos fermentados de soja y quinoa se partió de bebidas vegetales comercializadas actualmente en el mercado local bajo la siguiente denominación y marca: alimento líquido de soja marca Ades, Coca-Cola Company (Figura 10) y alimento líquido de quínoa marca Bibba, Babasal (Figura 11). Posteriormente, se incorporó glucosa Natural Whey y almidón de tapioca HOMECRAFT® CREATE 315 34131M00, Ingredion.

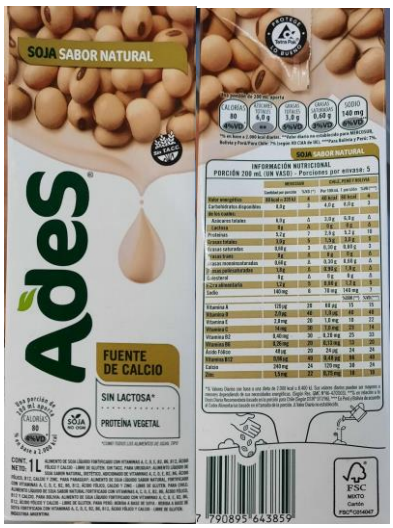


Figura 10. Bebida vegetal a base de soja Ades, Coca-Cola Company.

Figura 11. Bebida vegetal a base de quínoa Bibba, Babasal.

2.2 Métodos

2.2.1 Análisis de mercado e información nutricional

Se realizó un estudio de mercado seleccionando productos fermentados a base de plantas que se comercializan actualmente en el mercado internacional. En primer lugar, se recopilaron los datos de los productos encontrados que cumplieran con las características de ser fermentado, *plant-based* y similar a un yogur tradicional. Entre ellos, se escogieron aquellos cuya materia prima característica fuera alguna de las elegidas para el presente trabajo.

El estudio se basó en el análisis de la información nutricional y los ingredientes declarados en cada producto elegido, de manera que las matrices vegetales que se elaborarán para este estudio sean representativas y comparables con dichos alimentos.

Algunos de los ingredientes que se encontraron en la mayoría de los productos comerciales de coco son: leche de coco (agua, crema de coco), azúcar, almidón (de distintos orígenes), pectina y microorganismos probióticos (*L. bulgaricus*, *L. acidophilus*, *S. thermophilus*, *L. casei*, *B. lactis*, *L. rhamnosus*, *L. delbruekii*, otros).

Por otro lado, los ingredientes que se encontraron en la mayoría de los productos comerciales de almendra son: leche de almendra (agua y almendra), azúcar, almidón (de distintos orígenes), pectina, goma garrofín y microorganismos probióticos (*L. bulgaricus*, *L. acidophilus*, *S. thermophilus*, *B. lactis*, otros).

En el caso de la soja y la quínoa, no se encontraron productos comerciales que cumplieran las características mencionadas para realizar este mismo análisis.

Además de recolectar la información nutricional declarada en cada producto, se pudieron adquirir tres alimentos comercializados en CABA, Buenos Aires, Argentina que contenían específicamente la cepa *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB12® a los cuales se les realizó los recuentos microbiológicos descritos en la sección 2.2.9.2, Recuento de microorganismos probióticos.

La información nutricional de las matrices de coco y almendra elaboradas para la presente investigación fue entregada por la empresa proveedora de las materias primas.

En el caso de las matrices de soja y quinoa, dado que se trata de bebidas comerciales, se tomó la información nutricional declarada en el rótulo de cada producto. En caso de ser necesario el agregado de ingredientes adicionales, las tablas se han ajustado de acuerdo a la información nutricional de cada ingrediente adicionado.

Por último, tanto la información nutricional de los alimentos comerciales, como de las matrices elaboradas, se llevó a 100 gramos de producto para realizar posteriormente una comparación entre ellas.

2.2.2 Preparación de sustratos vegetales

La preparación de las bases de coco y almendra (primera elaboración) se realizó según las instrucciones brindadas por la empresa. Para facilitar el proceso de disolución y garantizar la homogeneidad del producto, se utilizó la mezcladora Silverson L4RT (Figura 12) a una velocidad de 6800 rpm.

Figura 12. Preparación de las bases utilizando mezcladora Silverson L4RT, Reino Unido.

Una vez constituidas las bases líquidas, se procedió a medir su pH. En caso de encontrarse por debajo de 6,6, se ajustó con NaOH 50 % p/p hasta llevarlo a un valor de entre 6,6 - 6,7 de manera que, en el posterior agregado de cultivo, las bacterias se encuentren en un medio adecuado para su crecimiento.

En la elaboración de los prototipos de soja y quínoa, se procedió a fermentar directamente las bebidas comerciales ya que estas poseen tratamiento térmico previo UHT (Ultra Heat Treatment). Por consiguiente, se agregó el cultivo fermentador como único ingrediente.

Por último, se repitió la producción de los prototipos de quínoa y soja, agregando 1 % de glucosa en ambas bases y 0,2 % de almidón de tapioca en el caso de la quínoa. El objetivo de la glucosa es brindar a los microorganismos fermentadores una fuente adicional de sustrato fermentable. A su vez, el agregado del almidón de tapioca en la quínoa tiene por finalidad mejorar la viscosidad y disminuir la separación de fases. Al adicionar estos ingredientes, fue necesario someter las mezclas a un tratamiento térmico de manera de asegurar la calidad microbiológica de las bases.

2.2.3 Homogeneización

La homogeneización fue realizada solo en el caso de las bases de coco y almendras. Para esto, se utilizó un homogeneizador Ariete de GEA, modelo N52006 (Figura 13) en dos etapas.

Figura 13. Homogeneizador Ariete de GEA, modelo N52006, Italia.

Los parámetros de homogeneización utilizados fueron:

- Etapa 1: Coco: 0 bar /Almendra: 80-100 bar
- Etapa 2: Coco: 120-130 bar /Almendra: 50 bar
- Temperatura de homogeneización: 60/65 °C

2.2.4 Tratamiento térmico

Para las bases de coco y almendra, el tratamiento térmico fue realizado elevando la temperatura de las mezclas en el intercambiador de placas de un pasteurizador y luego manteniendo la temperatura en un tubo de retención (Figura 14). Los parámetros utilizados fueron:

- Temperatura del alimento en el tubo de retención: 92-95 °C
- Retención: 300 segundos

Luego del tratamiento térmico, la base se enfría hasta los 6 °C y se coloca en los recipientes de fermentación.

Figura 14. Pasteurizador de placas GEA, Argentina.

Por otro lado, las bases de quínoa y soja fueron sometidas a un tratamiento térmico en batch, en contenedores de 5 L (Figura 15) del equipo "BPU" (Bucket Pasteurization Unit) (Figura 16) con parámetros de 10 minutos a 80 °C y posterior enfriamiento a 4 °C. A esta temperatura se inocularon y permanecieron durante toda la noche para ser fermentados al día siguiente.

Figura 15. Equipo BPU (Bucket Pasteurization Unit) FH Scandinox, contenedores de acero inoxidable con capacidad de 5L.

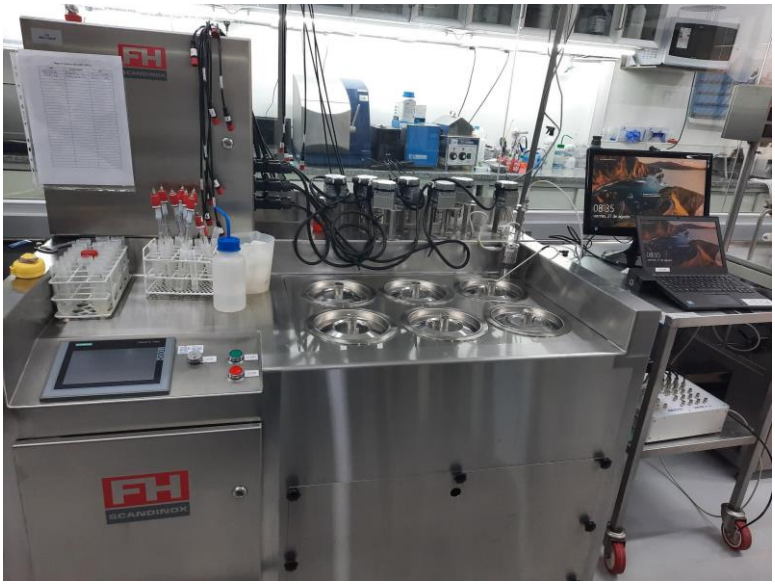


Figura 16. Equipo "BPU" (Bucket Pasteurization Unit), FH Scandinox, Dinamarca.

2.2.5 Fermentación

Para llevar a cabo la fermentación de cada una de las bases se utilizaron dos cultivos, Vega Nutrish BY-101® y Vega Nutrish GY-101® de la empresa Chr. Hansen. El primero está compuesto por *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB12®, mientras que el segundo por *Streptococcus thermophilus, Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *Lactobacillus rhamnosus* LGG® (Figura 17). Dichos cultivos se comercializan congelados y se estandarizan en función a la actividad fermentativa de cada lote, que se controla por un test de acidificación estándar. A partir de los resultados de este test, se define el contenido en un sobre de 500 U (unidades fermentadoras). La tasa de inoculación se establece en unidades fermentadoras por litro de sustrato (por ejemplo, 500 unidades en 2500 litros). Las especificaciones de los cultivos empleados se encuentran en los Anexos A y B.

En todos los casos, los contenedores de 5 L fueron inoculados con una dosis de 0,02% de cultivo (equivalentes a 500 unidades fermentadoras en 2500 litros). Para esto, primero se pesó el contenido del sobre de cultivo correspondiente, el cual contiene 500 U. Luego se tomó el equivalente en peso a 250 U, es decir, la mitad del contenido del sobre y se llevó a volumen en un matraz de 500mL. Para llevar a volumen en las bases de coco y almendra, se utilizó la

bebida dietética a base de almendra UHT Silk de La Serenísima y para soja y quínoa, bebida vegetal a base de soja UHT Ades, The Coca-Cola Company. Del matraz de 500 mL se tomó el volumen equivalente al número de unidades necesarias para lograr una concentración de 0,02% en la base y finalmente se procedió a inocular los tanques de fermentación. A modo de ejemplo, en las ecuaciones 1, 2 y 3 se observan los cálculos realizados para la base de coco con el cultivo BY-101®.

$$Concentración\ del\ inóculo: \frac{250\ U}{500\ mL} = 0{,}5\ U/mL \quad (1)$$

$$Volumen\ del\ inóculo\ [mL]: \frac{Volumen\ de\ base\ a\ fermentar\ [mL] * Dosis\ de\ cultivo\ [U/\ 100\ mL]}{Concentración\ del\ inóculo\ [U/mL]} \quad (2)$$

$$Volumen\ del\ inóculo\ [mL]: \frac{5233\ mL * \frac{0{,}02\ U}{100\ mL}}{0{,}5\ U/mL} = 2{,}1\ mL \quad (3)$$

La fermentación fue llevada a cabo en contenedores de acero inoxidable pertenecientes al equipo BPU FH Scandinox (Figuras 15 y 16), a una temperatura de 42 °C. Cada recipiente posee un electrodo para la medición constante de pH durante el proceso. Los cambios de pH se registran mediante un pHmetro de registro continuo equipado con un software Axone. La fermentación concluye cuando se alcanza un pH de 4,7-4,6.

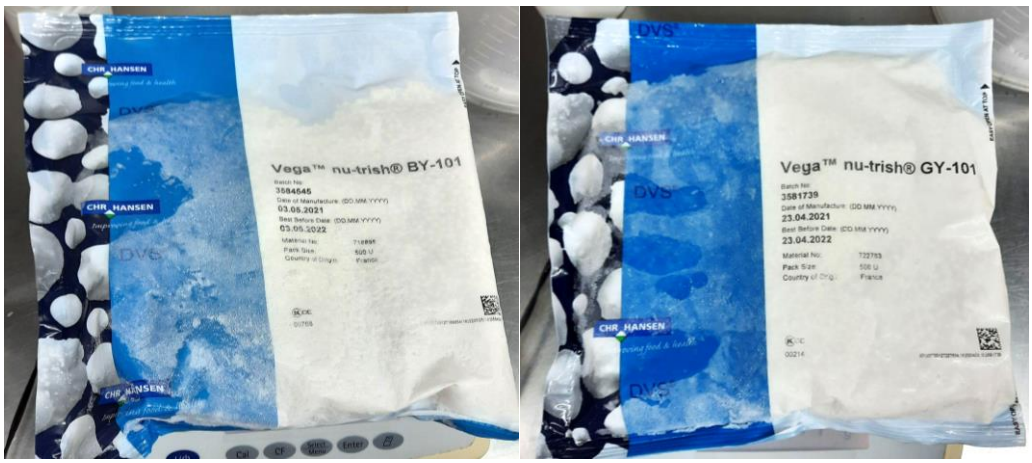


Figura 17. Bolsas de cultivo congelado, a la izquierda el Vega Nutrish BY-101® y a la derecha el Vega Nutrish GY-101®.

Para cada experimento se utilizaron cuatro contenedores en total, dos por base y cada uno con un cultivo diferente, obteniéndose cuatro combinaciones diferentes por elaboración. Se realizaron tres experimentos, en primer lugar, los productos de coco y almendra, segundo los productos de soja y quinoa y, por último, soja y quínoa con agregado de glucosa. Cada uno de los experimentos fue realizado una única vez por lo que no se realizaron análisis estadísticos con los resultados obtenidos.

Se obtuvieron, en total, ocho prototipos de estudio:

3. Coco + Vega Nutrish BY-101®
4. Coco + Vega Nutrish GY-101®
5. Almendra + Vega Nutrish BY-101®
6. Almendra + Vega Nutrish GY-101®
7. Soja + Vega Nutrish BY-101®
8. Soja + Vega Nutrish GY-101®
9. Quínoa + Vega Nutrish BY-101®
10. Quínoa + Vega Nutrish GY-101®

2.2.6 Enfriamiento y pérdida de carga

Los contenedores se retiran del equipo BTU y se procede a romper el coágulo formado durante la fermentación mediante un agitador. Luego, el contenido se vierte en el equipo PTU (Post Treatment Unit) (Figura 18) en donde se simula la pérdida de carga mediante la aplicación de una contrapresión de 2-2,5 bar y se enfría hasta 18 °C/ 20 °C. Este proceso fue aplicado a todas las bases elaboradas.

Figura 18. Unidad de post-tratamiento FH Scandinox, Dinamarca.

2.2.7 Envasado

Todos los productos obtenidos se envasaron manualmente bajo flujo laminar en recipientes estériles de polipropileno de 100 mL de capacidad. De esta manera se asegura no incorporar contaminantes que puedan afectar la investigación. Luego del envasado, los productos se distribuyeron en cámaras frigoríficas seteadas a 6 °C, 13 °C y 25 °C según los análisis a realizar detallados en la sección 2.2.9 Seguimientos.

2.2.8 Liberación de producto

Una muestra de cada producto final fue destinada a la liberación. Se tomaron como referencia los parámetros establecidos en el Artículo 576 del capítulo VIII del Código Alimentario Argentino (2006) (Tabla VIII) para un yogur tradicional. Esto se debe a que al día de la fecha no se han establecido criterios microbiológicos para productos vegetales fermentados.

Al ser una prueba a escala piloto destinada a investigación de viabilidad de microorganismos probióticos y no una elaboración industrial destinada a su comercialización,

se analizó una única muestra indicativa por cada elaboración (n=1). Es por esto que se llevó a cabo un plan de muestreo de dos clases y tanto m (límite crítico) como c (número de muestras a partir del cual se rechaza el lote) adquieren un valor de 0.

Los recuentos realizados fueron: coliformes en profundidad en agar VRB (Violet Red Bile) incubado a 30 °C durante 24 horas en condiciones de aerobiosis; hongos y levaduras en profundidad en agar YGC (Yeast extract glucose chloramphenicol) incubado 5 días a 25 °C en aerobiosis y coliformes a 42°C mediante el método de número más probable en tubos de BRILA (Brilliant Green Bile Lactose) incubados durante 72 hs en aerobiosis. Todos los medios de cultivo utilizados fueron elaborados por Merck SA.

TABLA VIII. Criterios microbiológicos para liberación de producto.

Microorganismo	Criterio de Aceptación	Categoría	Norma
Coliformes/g (30° C)	n= 5 c = 2 m= 10 M= 100	4	FIL 73 A: 1985
Coliformes/g (45° C)	n= 5 c= 2 m< 3 M= 10	4	APHA: 1992 c 24 (1)
Hongos y Levaduras/g	n= 5 c= 2 m= 50 M=200	2	FIL 94B: 1990 (2)

(1). Compendium of Methods for the Microbiological Examinations of Foods. 3° Edición. Editado por Carl Vanderzant y Don F. Splittstoesser.
(2). Norma FIL 94 B: 1990. Recuento de levaduras específicas.

Fuente: Código Alimentario Argentino, capítulo VIII, Art. 576, 2006.

Las demás muestras fueron destinadas a los seguimientos durante la vida útil y a realizar una evaluación sensorial informal.

2.2.9 Seguimientos

Los parámetros evaluados durante 45 días desde la fecha de elaboración de los productos se encuentran detallados en la Tabla IX.

Se utiliza la expresión “D+n” para representar la cantidad de días posteriores a la elaboración. Indica el momento en que se realiza la medición.

TABLA IX. Parámetros de seguimiento hasta D+45.

	D+0	D+7	D+14	D+21	D+28	D+35	D+45
pH a 6 °C	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
pH a 13 °C	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
pH a 25 °C	✓	✓	✓				
Reometría (Esfuerzo de corte)		✓	✓				
Recuento de microorganismos probióticos	✓	✓	✓		✓		✓
Evaluación sensorial informal			✓				

Estos parámetros fueron evaluados tanto en la elaboración de los productos de coco y almendra como en los productos de soja y quinoa con agregado de glucosa. El experimento con las bases de soja y quínoa fue descartado debido a que no se alcanzaron los valores de pH de corte en el tiempo esperado.

2.2.9.1 Post-Acidificación

Se denominará post-acidificación al descenso de pH durante el período de estudio. El pH se midió utilizando un pHmetro portátil Mettler Toledo (Figura 19). El análisis se realizó en todos los productos, almacenados a diferentes temperaturas en cámaras de refrigeración, llevándolos a 20 °C al momento de la medición.

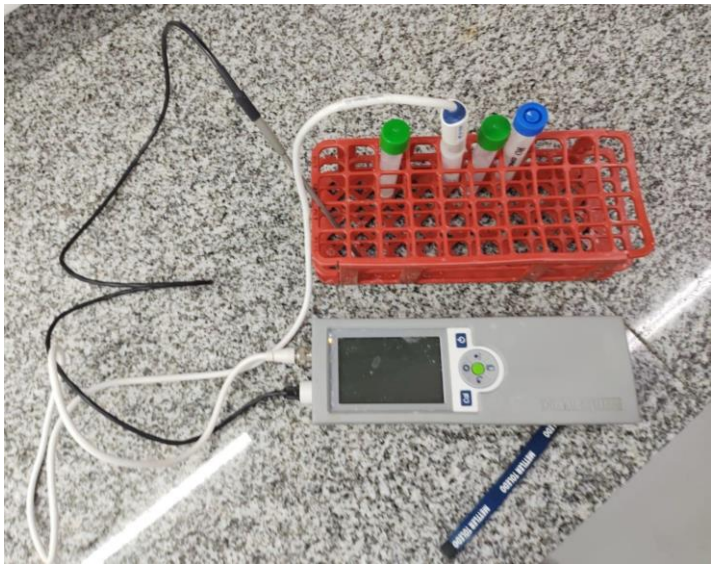


Figura 19. pHmetro portátil Mettler Toledo, España.

2.2.9.2 Recuento de microorganismos probióticos

Las metodologías utilizadas para realizar los recuentos de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB12® y *Lactobacillus rhamnosus* GG LGG® fueron las correspondientes a productos lácteos fermentados ya que no se encontraron métodos específicos para productos vegetales fermentados.

Para el recuento de BB12®, el protocolo de Chr. Hansen (Anexo C) se basa en la norma ISO 29981/IDF220: "Milk products - Enumeration of presumptive Bifidobacteria - Colony-count technique at 37 °C", pero se encuentra modificado. Se utiliza agar MRS (Man, Rogosa y Sharpe) con CyHCl (Cisteína-L clorohidrato monohidratado) en lugar de agar TOS (Oligosacárido transgalactosilado) y una menor dosis de mupirocina en comparación al método estándar. La mupirocina inhibe el crecimiento de la mayoría de las bacterias ácido lácticas utilizadas comúnmente en productos lácteos fermentados y no fermentados. Debido a su selectividad, cuando se agrega a un medio no suele haber crecimiento de las bacterias típicas del yogur (*Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*), cultivos mesófilos (ej. *Lactococcus lactis*), *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus rhamnosus*. La L-Cysteina disminuye el potencial redox en el medio de cultivo y mejora las condiciones anaeróbicas para el crecimiento de las bifidobacterias (Roy, 2001).

Por otro lado, el protocolo para el recuento de LGG® (Anexo D) utiliza agar MRS (Man, Rogosa y Sharpe) y vancomicina como agente selectivo ya que la cepa es resistente al antibiótico. Este agregado inhibe el desarrollo de las bacterias starters del yogur (Saccaro *et al*., 2011).

Como primer paso se realizó el homogenato pesando bajo flujo laminar 10 g de producto final almacenado a 6 °C dentro de una bolsa de Stomacher estéril y llevando a 100 g con agua peptonada 0,1%. Luego se llevó al equipo Stomacher durante 120 segundos obteniendo el homogenato correspondiente a la dilución -1 de la muestra. Posteriormente, bajo flujo laminar, se tomó 1,0 mL del homogenato con pipeta estéril y se colocó en un tubo de ensayo con 9 mL de agua peptonada, se pasó por un Vórtex y de esta forma se obtuvo la dilución -2. Este procedimiento de diluciones decimales seriadas se repitió hasta llegar a la dilución -6.

En paralelo se funde el medio de cultivo MRS (Man, Rogosa y Sharpe) previamente preparado según la metodología del Anexo D y luego se atempera en un baño termostático a 45 °C aproximadamente. De igual manera, se debe contar con las soluciones de antibióticos cuya preparación también se encuentra descrita en los Anexos C y D según corresponda.

Para la siembra, se utilizó el método en profundidad, colocando 1 mL de las diluciones correspondientes en placas de Petri estériles y agregando el medio de cultivo el cual se adiciona previamente con los antibióticos correspondientes. Las placas se colocaron dentro de una jarra de anaerobiosis (Figura 20), junto con el generador de anaerobiosis e indicador (Figura 21). Por último, la jarra se introdujo en una estufa a 37 °C donde permaneció durante 72 horas al cabo de las cuales se realizó el conteo de las colonias desarrolladas, el cual se expresa como unidades formadoras de colonias (UFC) por g o ml de producto según corresponda. Todos los parámetros se encuentran resumidos en la Tabla X.

Cuando las colonias crecen en medio sólido y bajo las condiciones especificadas en los métodos utilizados, las respectivas a BB12® son de forma redondeada, blanquecinas y con bordes más o menos regulares. El diámetro de las colonias varía entre 1 mm a 3 mm dependiendo del número de colonias. Respecto al LGG®, forman colonias blancas y lisas, redondas u ovaladas con bordes definidos y un diámetro que varía entre 2 mm a 4 mm según la cantidad de colonias.

Figura 20. Jarra de anaerobiosis Merck.

Figura 21. A la izquierda, el generador de anaerobiosis Anaeropack MGC y a la derecha el indicador de anaerobiosis Anaerotest MERCK.

TABLA X. Parámetros del análisis microbiológico.

Probiótico	Medio de cultivo	Aditivos (por litro de medio)	Parámetros de incubación
Bifidobacterium animalis subsp. *lactis* BB12®	MRS	5mL de solución de CyHCl 10% + 2,5mL de solución de mupirocina 1%	37±1°C 72h Anaerobiosis
Lactobacillus rhamnosus GG LGG®	MRS	0,5mL de solución de vancomicina 50ppm	37±1°C 72h Anaerobiosis

2.2.9.3 Esfuerzo de corte

El esfuerzo de corte se midió utilizando el reómetro "Modular Compact Rheometer MCR 102" de Anton Paar (Figura 22), el cual se programó para medir el esfuerzo de corte (Shear stress, Pa) a tasas de corte (Shear rate) crecientes entre 0 y 300 s-1 en una geometría "bob and cup" (Figura 23) manteniendo la muestra a una temperatura de 13 °C. Las muestras sometidas al presente análisis se encontraban almacenadas a 6 °C, por lo que fueron previamente atemperadas a 13 °C en una heladera programada a dicha temperatura.

Para cada matriz, fueron evaluadas dos muestras, una a los 7 días y otra a los 14 días y no se realizaron repeticiones.

Figura 22. Reómetro Modular Compact Rheometer MCR 102" de Anton Paar, Austria.

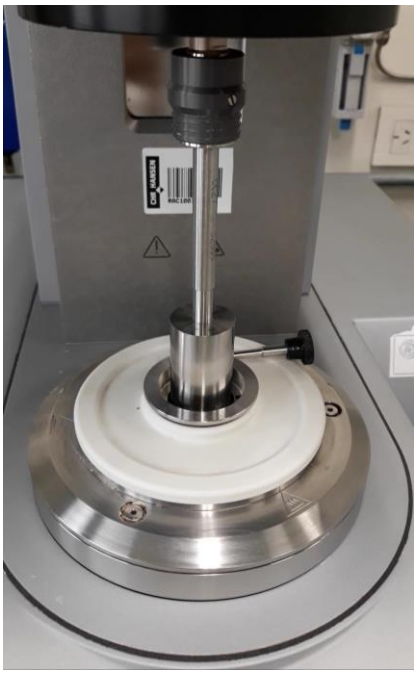


Figura 23. Geometría "bob and cup", reómetro Anton Paar.

2.2.9.4 Evaluación sensorial exploratoria

El análisis sensorial fue realizado en la planta piloto de Chr. Hansen, ubicada en el edificio de laboratorios de UADE, por un grupo reducido de panelistas no entrenados. Este análisis exploratorio se realizó para recabar información acerca de las propiedades sensoriales de las muestras evaluadas, y para detectar características indeseables de los productos o diferencias perceptibles entre las muestras que pudieran estar asociadas al cultivo utilizado. En todos los casos de estudio se realizaron pruebas sensoriales descriptivas con escala de atributos.

Para los alimentos a base de coco y almendra, se llevó a cabo un análisis sensorial con la colaboración de 8 panelistas. Las muestras sometidas a esta evaluación fueron: matriz de coco con cultivo BY-101, matriz de coco con cultivo GY-101, matriz de almendras con cultivo BY-101 y matriz de almendra con cultivo GY-101. En la Tabla XI se observan los parámetros evaluados en cada una de las matrices.

TABLA XI. Atributos evaluados en el análisis sensorial de las matrices de coco y almendra y su descripción.

Atributo	Descripción
Cuchareabilidad	Estabilidad del producto en una cuchara.
Grumosidad	Introducir una cuchara de metal en el producto. Observar la parte posterior de la cuchara y analizar si hay grumos.
Viscosidad (Mouth coating)	Distribuir el producto en la boca y tragarlo. Mientras más cobertura deja en la boca, mayor mouth coating.
Viscosidad (Mouth Thickness)	Resistencia del producto al ser tragado a una velocidad normal.
Cremosidad	Sabor a crema.
Sabor Especifico (Coco/Almendra)	Se logra identificar el sabor.
Acidez	Gusto básico (Intensidad).
Dulzor	Gusto básico (Intensidad).
Sabor a yogurt	Sabor característico a yogurt.

Para las matrices de soja y quínoa, la evaluación sensorial se llevó a cabo con la colaboración de 4 panelistas. Las muestras sometidas a esta evaluación fueron: matriz de quinoa con cultivo BY-101, quinoa con cultivo GY-101, soja con cultivo BY-101 y soja con cultivo

GY-101. Los parámetros evaluados se detallan en la Tabla XII. Estos difieren de los parámetros evaluados en el análisis sensorial descrito anteriormente debido a que el producto obtenido tiene características organolépticas y de composición diferentes.

TABLA XII. Atributos evaluados en el análisis sensorial de los productos de soja y quinoa y su descripción

Atributo	Descripción
Sinéresis	Observar la cantidad de separación de suero. Cuanto mayor separación, mayor sinéresis.
Para evaluar los siguientes atributos agitar 5 veces la bebida fermentada	
Viscosidad (Mouth coating)	Distribuir el producto en la boca y tragarlo. Mientras más cobertura deja en la boca, mayor mouth coating.
Sabor Especifico (Soja/Quínoa)	Se logra identificar el sabor.
Acidez	Gusto básico (Intensidad).
Dulzor	Gusto básico (Intensidad).
Sabor a yogurt	Sabor característico a yogurt.
Filancia	Colocar el producto en un vaso, tomar una cuchara y apoyarla en la superficie tocando el producto. Levantar la cuchara y observar si se forma un hilo. Cuanto mayor sea la formación del hilo, mayor filancia.

En todos los casos, los panelistas debían degustar las muestras y puntuar cada atributo con una escala de 0 a 5. Cada panelista recibió dos planillas idénticas por matriz, es decir, cuatro en total por cada elaboración. A modo de ejemplo, en la Figura 24 se puede observar la grilla a completar para los productos de soja. Las muestras fueron codificadas mediante números de tres dígitos al azar. Debido al reducido número de panelistas no se realizaron análisis estadísticos de los resultados, sino que se recolectaron en una planilla de Excel, se sumaron los puntajes obtenidos para cada atributo y luego se calculó un promedio redondeando a un único número entero para establecer el valor final.

SOJA

Nombre: _____

Producto N°: ----------

Evaluación de:

Sinéresis	0	1	2	3	4	5
Viscosidad (Mouth coating)	0	1	2	3	4	5
Sabor Específico (Soja/Quínoa)	0	1	2	3	4	5
Acidez	0	1	2	3	4	5
Dulzor	0	1	2	3	4	5
Sabor a yogurt	0	1	2	3	4	5
Filancia	0	1	2	3	4	5

Figura 24. Planilla de evaluación sensorial para soja y quínoa.

RESULTADOS

3. Resultados

3.1 Estudio de mercado

Los datos obtenidos del estudio de mercado acerca de la composición nutricional de los productos comerciales fermentados a base de coco y almendra se presentan en las Tablas XIII y XIV.

A su vez, la empresa proveedora de las materias primas de las bases de coco y almendra utilizadas para llevar a cabo la investigación, brindó una tabla de composición nutricional teórica (Tabla XV). Esto permitió generar una comparación entre los productos comercializados y los utilizados como matrices de estudio, llegando a la conclusión de que tanto las bases de coco y almendra con las que se trabajara en esta investigación poseen una composición nutricional que se encuentra dentro del rango de valores de cada parámetro de los productos comercializados actualmente.

TABLA XIII. Composición nutricional de los productos comerciales a base de coco en 100 gramos de alimento.

	COMPOSICION NUTRICIONAL COCO						
MARCA	Valor energético (kcal)	CH Totales (g)	Proteínas (g)	Grasas Totales (g)	Grasas Saturadas (g)	Fibra (g)	Sodio (mg)
Lavva	93	6	1	7	5	1	43
Trader Jones	100	14	0	5	4	0	15
The Coconut Cult	212	9	3	18	15	6	15
Harmless Harvest	64	11	1	2	2	2	12
Forager Project (ml)	71	8	1	3	1	0	4
Crudda	72	12	2	2	1	0	0
Crudda	32	2	2	2	1	0	0
QuimYa	92	11	1	5	5	2	55

TABLA XIV. Composición nutricional de los productos comerciales a base de almendra en 100 gramos de alimento.

	COMPOSICION NUTRICIONAL ALMENDRA						
MARCA	Valor energético (kcal)	CH Totales (g)	Proteínas (g)	Grasas Totales (g)	Grasas Saturadas (g)	Fibra (g)	Sodio (mg)
Califia Farms	63	8	1	3	1	1	79
Good Plants	67	11	3	3	0	5	23
Silk	124	13	3	8	1	2	53
Kite Hill	93	8	3	6	0	2	7
Felices las vacas	80	10	2	4	1	2	78

TABLA XV. Composición nutricional de los productos de coco y almendra elaborados en 100 gramos de alimento.

	COMPOSICION NUTRICIONAL DE LAS BASES ELABORADAS						
SABOR	Valor energético (kcal)	CH Totales (g)	Proteínas (g)	Grasas Totales (g)	Grasas Saturadas (g)	Fibra (g)	Sodio (mg)
COCO	128	16	0,6	6,8	6,5	1,0	6
ALMENDRA	105	12	2,3	5,3	1,1	2,0	1

Fuente: Elaboración propia. Información proveída por Empresa "X"

Para los productos de soja y quinoa se realizó una tabla de composición nutricional de manera teórica de los productos elaborados (Tabla XVI). Se confeccionó sobre la base de la información nutricional declarada por la empresa elaboradora de las bebidas y la declarada en el rótulo de los ingredientes adicionados.

TABLA XVI. Composición nutricional de los productos de soja y quínoa elaborados en 100 gramos de alimento.

	COMPOSICION NUTRICIONAL DE LAS BASES ELABORADAS						
SABOR	Valor energético (kcal)	CH Totales (g)	Proteínas (g)	Grasas Totales (g)	Grasas Saturadas (g)	Fibra (g)	Sodio (mg)
SOJA	44,33	5,07	2,6	1,5	0,3	0,6	71,33
QUINOA	27,08	5,10	1,6	0	0	0,5	51,93

Con respecto a los recuentos de probióticos realizados a tres productos comerciales, los resultados obtenidos se detallan en la Tabla XVII.

TABLA XVII. Resultados de los recuentos microbiológicos de los productos comerciales.

MARCA	RECUENTO DE PROBIÓTICOS (UFC/mL)
A	1,00E+07
B	5,00E+05
C	< 10.000

El artículo 1389 del Código Alimentario Argentino (2011) establece que la carga de células probióticas viables deberá estar comprendida entre 10^6 y 10^9 UFC/g durante su período de duración mínima. En la Tabla XVII se puede observar que solo uno de los productos

analizados (producto marca A) alcanzó el recuento mínimo necesario para generar un efecto beneficioso en la salud del consumidor. Sin embargo, el análisis fue realizado 15 días antes de la fecha de vencimiento del producto por lo que no se puede asegurar que al final de la vida útil se mantenga dicho valor.

3.2 Valores de pH previos a la fermentación

Una vez constituidas las bases se procedió a medir el pH previo a inocular con los cultivos fermentadores. Los pH de las bases de coco y almendra fueron 5,62 y 6,16 respectivamente, por lo que se procedió a ajustarlos mediante la adición de NaOH 50% p/p. Los valores se elevaron a un pH de 6,64 para la base de coco y 6,65 para la de almendra. Este procedimiento se realizó debido a una experiencia previa de la empresa proveedora con la fermentación de estas bases, en la que los cultivos no tuvieron la actividad esperada. Para la quínoa y soja, la preparación fue diferente ya que se partió de las bebidas vegetales comerciales las cuales tenían un tratamiento UHT. Los tanques de fermentación se llenaron con las bebidas sin adición de ningún ingrediente más que el cultivo. Los pH iniciales fueron de 7,24 para la soja y 7,10 para la quínoa. Si bien los pH son altos en comparación al de las bases de coco y almendra previo a su inoculación, se decidió no modificarlos con el fin de evitar un tratamiento térmico posterior por el agregado de un ingrediente no estéril y evaluar si los cultivos podrían adaptarse a una condición de pH más elevado que el óptimo. Se observó que a pesar de estas condiciones la actividad fermentativa inició como se esperaba.

En la elaboración de los prototipos de soja y quínoa con agregado de glucosa, los valores de pH iniciales fueron de 7,27 para la base de soja y 7,09 para la de quínoa. Si bien se realizó un tratamiento térmico por el agregado de ingredientes se decidió no ajustar el pH, debido a que en la elaboración anterior la fermentación comenzó de manera correcta.

3.3 Curvas de fermentación

En la elaboración de los productos de coco y almendra se puede observar que ambos cultivos tuvieron mayor velocidad de fermentación en la base de almendra que en la base de coco (Figura 25), es decir, que el descenso de pH en la matriz se dio en un tiempo menor. A su vez, para cada base, fue diferente el cultivo que tuvo mayor velocidad. En el caso de la base de

almendra el cultivo que alcanzó primero el pH de corte (4,6-4,7) fue el cultivo BY-101 mientras que en la base de coco el más rápido fue el GY-101.

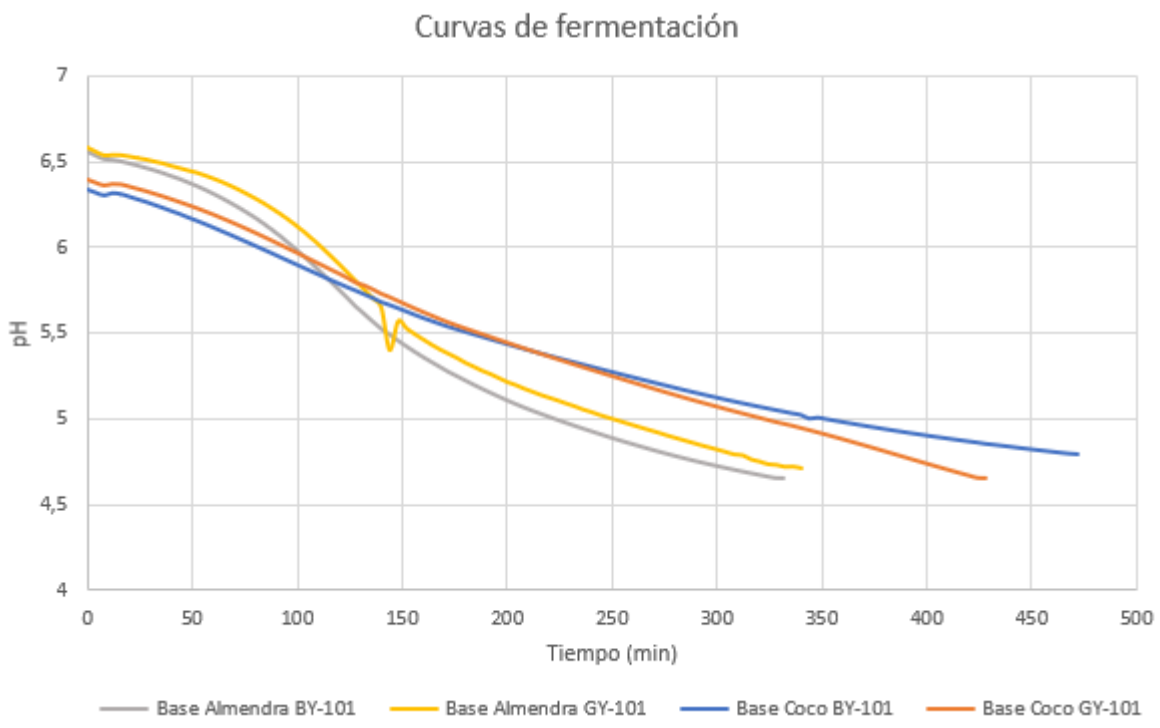


Figura 25. Curvas de fermentación correspondientes a la elaboración de los productos de coco y almendra.

En la elaboración correspondiente a las bases de soja y de quinoa, las curvas de fermentación observadas en la base de soja fueron similares con ambos cultivos (Figura 26). El pH final en la base de soja fue de 4,62 para el cultivo BY-101 y 4,57 para GY-101 en un total de 7 horas 40 minutos de fermentación.

Las curvas correspondientes a la base quinoa presentaron un comportamiento diferente a partir de las 3 horas de iniciada la fermentación, en el que se comienza a observar una disminución de la velocidad de fermentación, particularmente en la base inoculada con el cultivo GY- 101. Con este cultivo se llega a pH 5,20 luego de 8 horas 20 minutos de tiempo de fermentación, momento en que se decide frenar el proceso. Por otra parteen el mismo tiempo la base de quínoa con cultivo BY-101, alcanzó un valor de pH de 4,68.

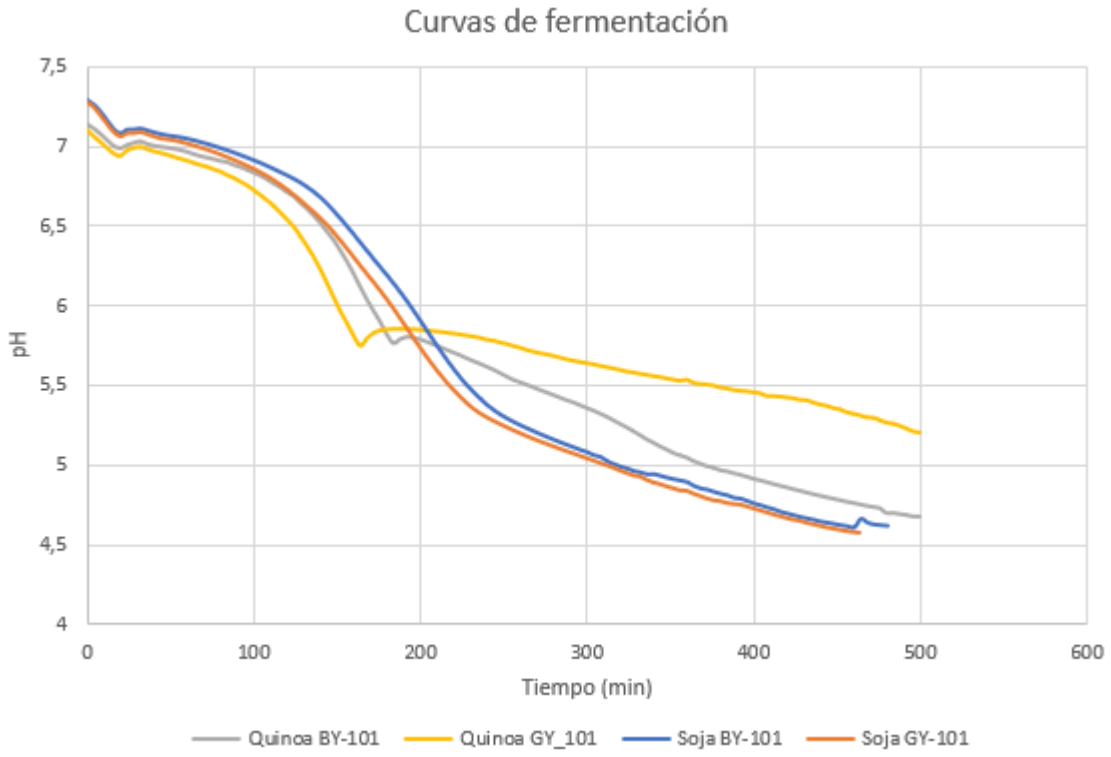


Figura 26. Curvas de fermentación correspondientes a la elaboración de los productos de soja y quínoa.

En la elaboración de los productos de soja y quínoa (Figura 27) con agregado de 1% de glucosa en ambas bases y 0,2% de almidón de tapioca en el caso de la quínoa, las curvas de fermentación de la base de soja fueron similares al caso anterior. La base de soja con el cultivo BY-101 alcanzó un valor de pH de 4,69 en 6 horas y 20 minutos y un pH de 4,67 con el cultivo GY-101 en 6 horas y 28 minutos. En el caso de la quínoa las curvas mostraron el mismo comportamiento inicial, y luego, la velocidad de fermentación del tanque que contenía el cultivo GY-101 no disminuyó de manera abrupta como se observó en la base quinoa sin adición de glucosa y almidón de tapioca (Figura 26). Incluso, tuvo un descenso más rápido de pH llegando a un valor de pH de 4,28 en 8 h, superando al que contenía el cultivo BY-101 que tardó 8 horas 16 minutos en llegar a pH 4,54.

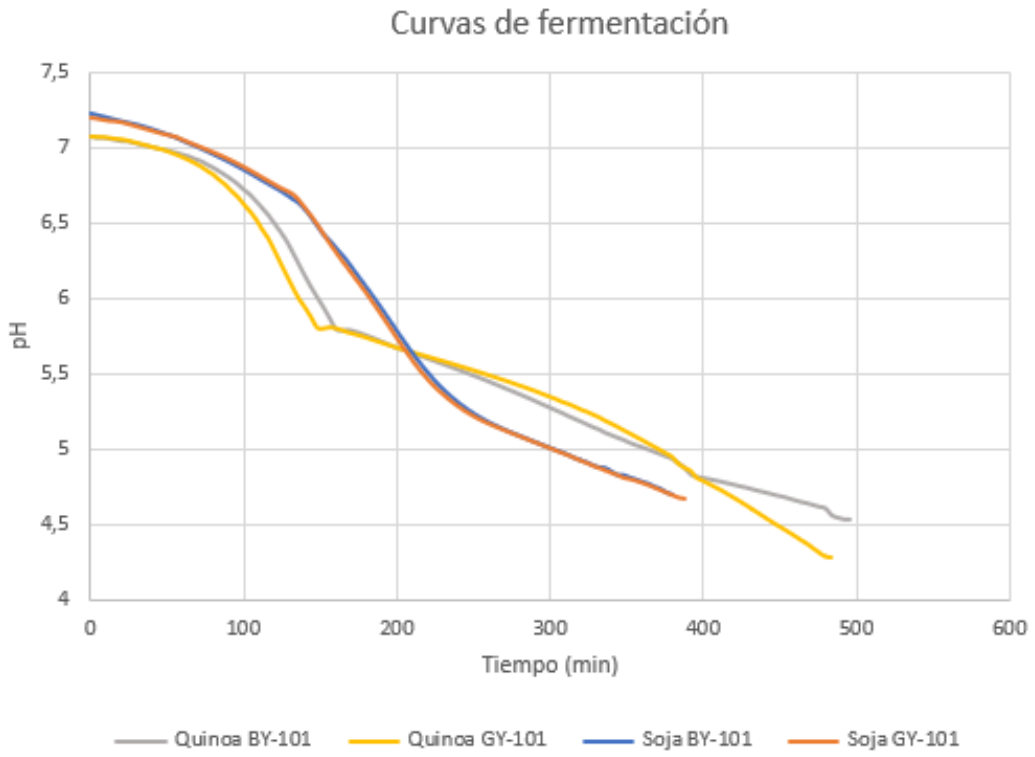


Figura 27. Curvas de fermentación correspondientes a la elaboración de los productos de soja y quínoa con agregado de glucosa.

3.4 Liberación de producto final

Para la liberación del producto final se tomaron como referencia los parámetros microbiológicos establecidos para yogurt en el artículo 576 del Código Alimentario Argentino (2006), dado que aún no se cuentan con límites establecidos para el tipo de producto propuesto. Los resultados obtenidos para las bases coco y almendra, y soja y quinoa adicionadas con glucosa se reportan en las Tablas XVIII y XIX respectivamente.

TABLA XVIII. Resultados de análisis microbiológicos para liberación de producto final. Elaboración 1, coco y almendra.

	Coliformes totales	Coliformes fecales	Hongos y Levaduras
Límites máximos	<10 UFC/mL	<3 NPM	<50 UFC/mL
Base Coco BY-101	<1	<3	<1
Base Coco GY-101	<1	<3	<1
Almendra BY-101	<1	<3	<1
Almendra GY-101	<1	<3	<1

No se realizó la liberación de los productos de soja y quínoa cuyo tratamiento fue únicamente el agregado del cultivo (segunda elaboración: sin tratamiento térmico) ya que no se alcanzaron los valores de pH de corte en el tiempo esperado y por lo tanto fue descartada.

TABLA XIX. Resultados de análisis microbiológicos para liberación de producto final. Elaboración 3, soja y quínoa con glucosa.

	Coliformes totales	Coliformes fecales	Hongos y Levaduras
Límites máximos	<10 UFC/mL	<3 NPM	<50 UFC/mL
Soja BY-101	<1	<3	1
Soja GY-101	<1	<3	<1
Quínoa BY-101	<1	<3	1
Quínoa GY-101	<1	<3	<1

Todos los resultados obtenidos están por debajo de los límites establecidos en el CAA, encontrándose en condiciones de inocuidad apropiadas para la posterior evaluación sensorial.

3.5 Post-Acidificación

La post-acidificación de los productos de coco, almendra, soja y quinoa a diferentes temperaturas, se analizó midiendo el pH en intervalos de una semana durante los 45 días de análisis. Los resultados obtenidos se encuentran detallados en los Anexos E y F. Para su interpretación, se han realizado gráficos que muestran las variaciones de pH de las distintas matrices con sus respectivos cultivos durante el período de estudio a distintas temperaturas de conservación.

En la Figura 28 se observa que el descenso de pH en los prototipos de coco y almendra, almacenados a 6 °C, que contienen el cultivo BY-101 es menor que en aquellos prototipos fermentados con el cultivo GY-101.

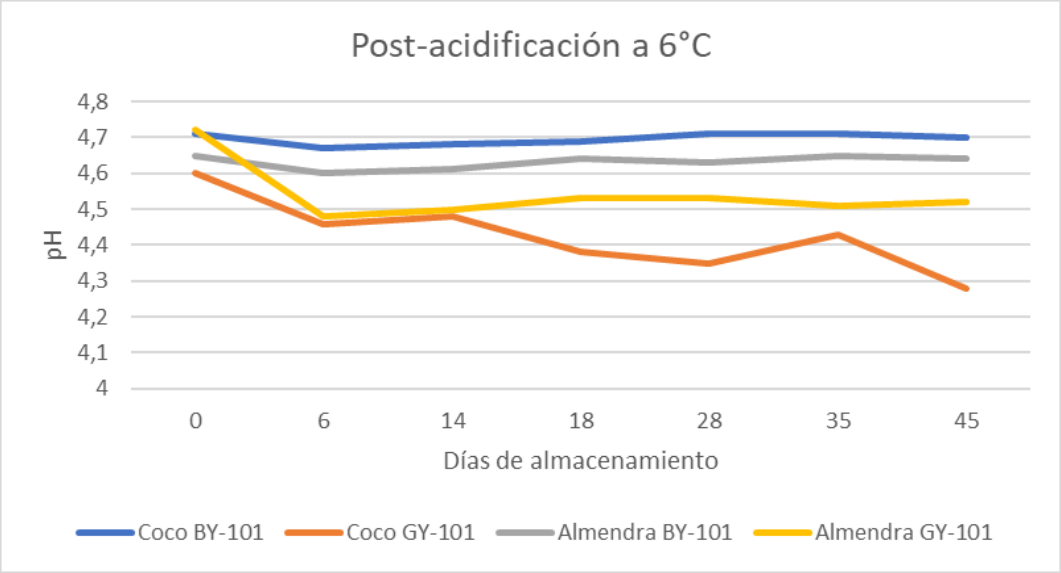


Figura 28. Evolución de pH durante el almacenamiento a 6° C de las bases de coco y almendra.

Por otro lado, las curvas correspondientes a los prototipos conservados a 13 °C (Figura 29) y 25 °C (Figura 30) mostraron un comportamiento similar entre sí, pero diferente respecto a los conservados a 6 °C (Figura 28). En los prototipos conservados a 13°C y 25 °C, el descenso de pH fue semejante para las bases e independiente del cultivo. Para ambas temperaturas de conservación, las curvas de post-acidificación de la base de almendra se encontraron por encima (a valores de pH mayores) de las de coco. Este comportamiento es distinto al observado en los prototipos conservados a 6°C en donde la principal diferencia se encontró entre cultivos y no entre bases.

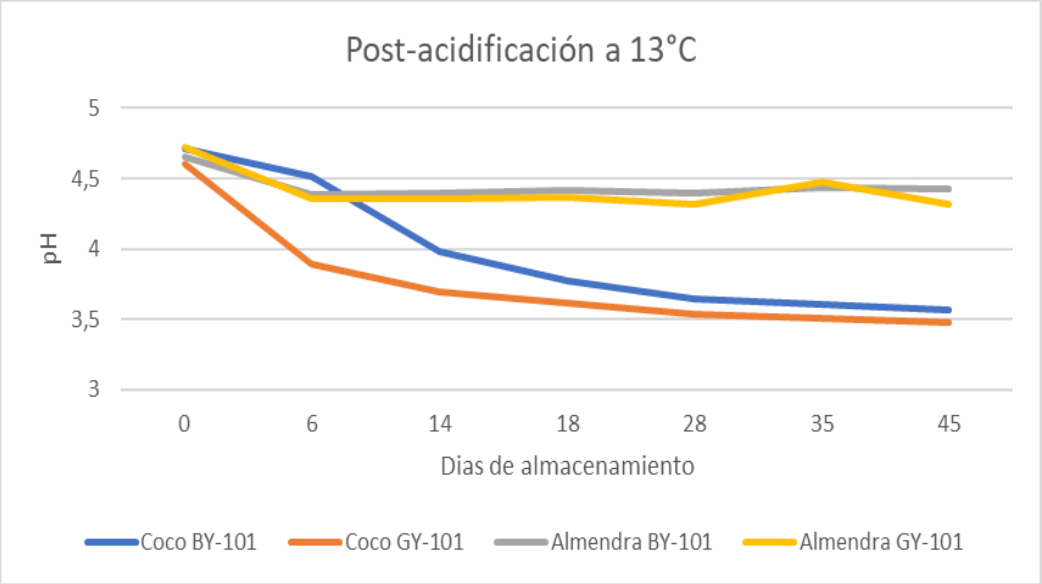


Figura 29. Evolución de pH durante el almacenamiento a 13 °C de las bases de coco y almendra.

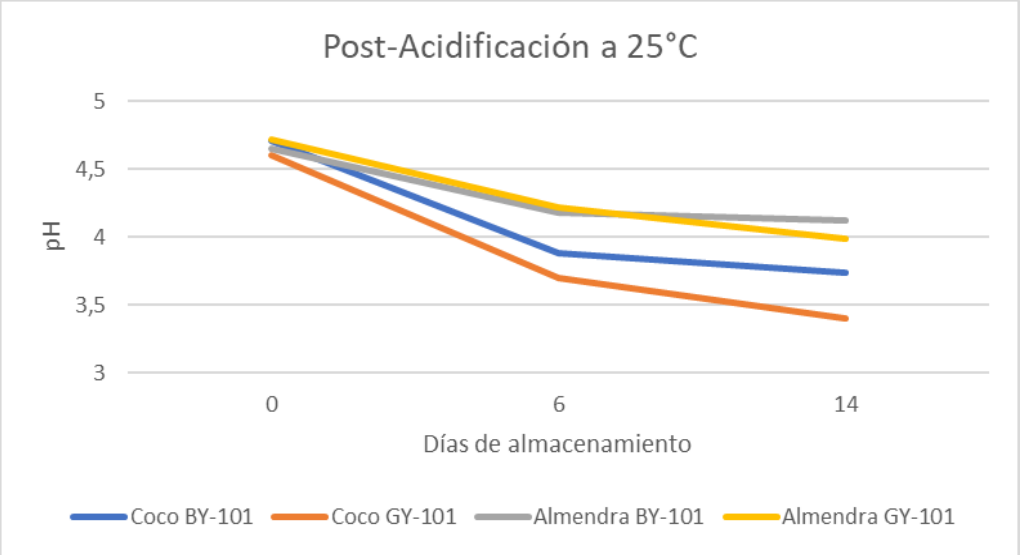


Figura 30. Evolución de pH durante el almacenamiento a 25 °C de las bases de coco y almendra.

El pH ha mostrado un ligero descenso durante los 45 días de almacenamiento a 6 °C (Figura 31), en las ambas bases con el cultivo BY-101, y en la base de soja con cultivo GY-101. Por otro lado, se observó un acentuado descenso de pH en la base de quinoa fermentada con el cultivo GY-101.

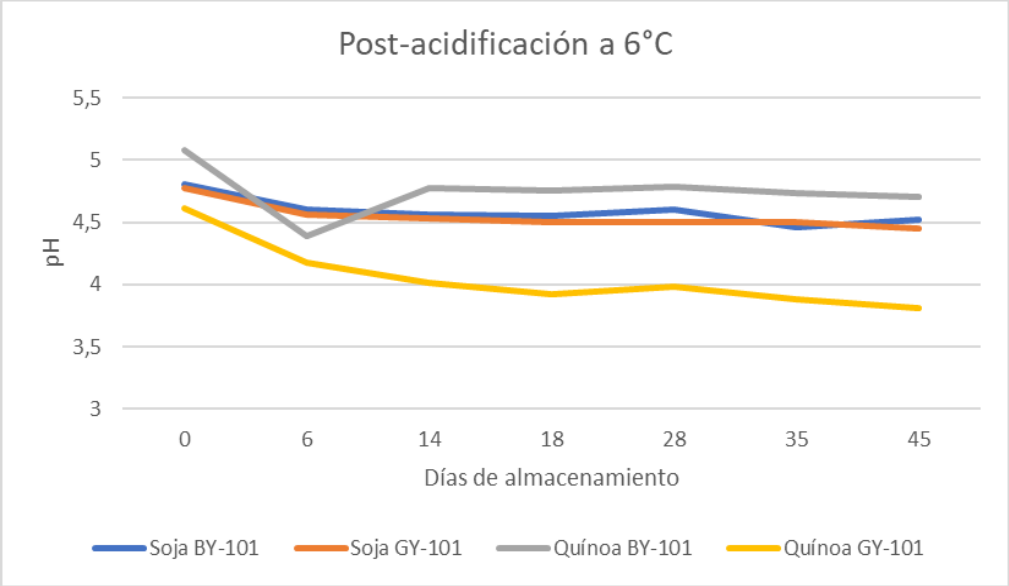


Figura 31. Evolución de pH durante el almacenamiento a 6 °C de las bases de soja y quínoa con glucosa.

En los prototipos de soja y quínoa con agregado de glucosa conservados a 13 °C (Figura 32), se observa que la curva correspondiente a la base de soja con el cultivo BY-101 muestra un descenso de pH menor que el resto de las bases. Al igual que el mismo producto conservado a 6 °C, prácticamente no se observaron modificaciones en los valores de pH desde el D+6 hasta el D+45.

Por otra parte, las curvas correspondientes a la base de quínoa tuvieron un comportamiento similar, independientemente del cultivo utilizado.

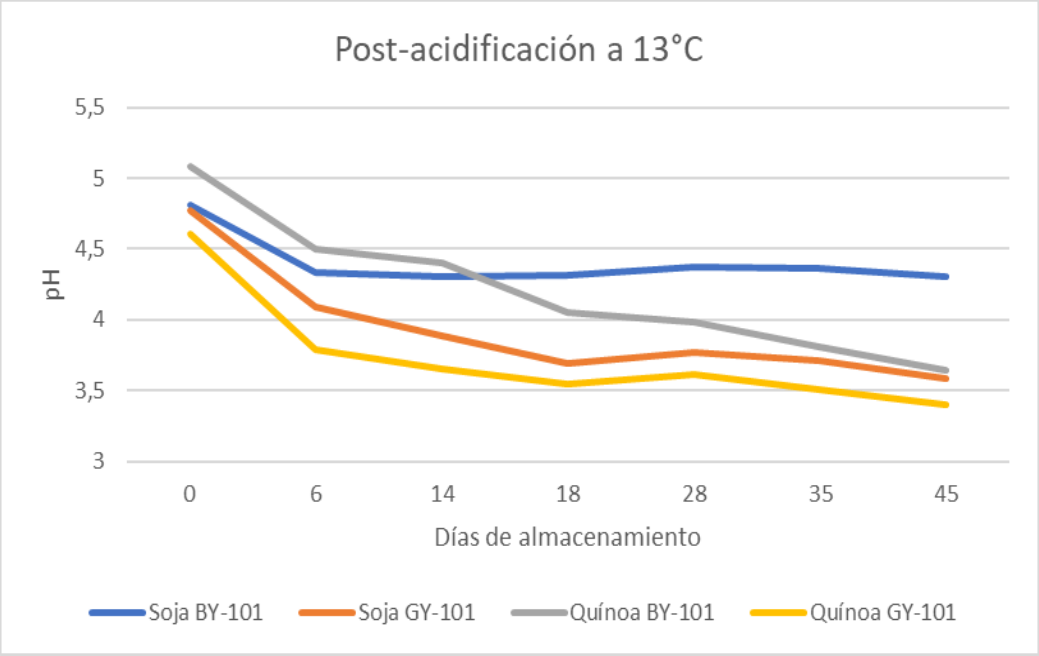


Figura 32. Evolución de pH durante el almacenamiento a 13 °C de las bases de soja y quínoa con glucosa.

A 25 °C (Figura 33), la base de soja con el cultivo BY-101 desciende hasta el día 6 sin alcanzar un pH de 4 y se mantiene estable hasta los 14 días. Por otro lado, para la base de soja con el cultivo GY-101 se registró una curva similar a las dos de quinoa.

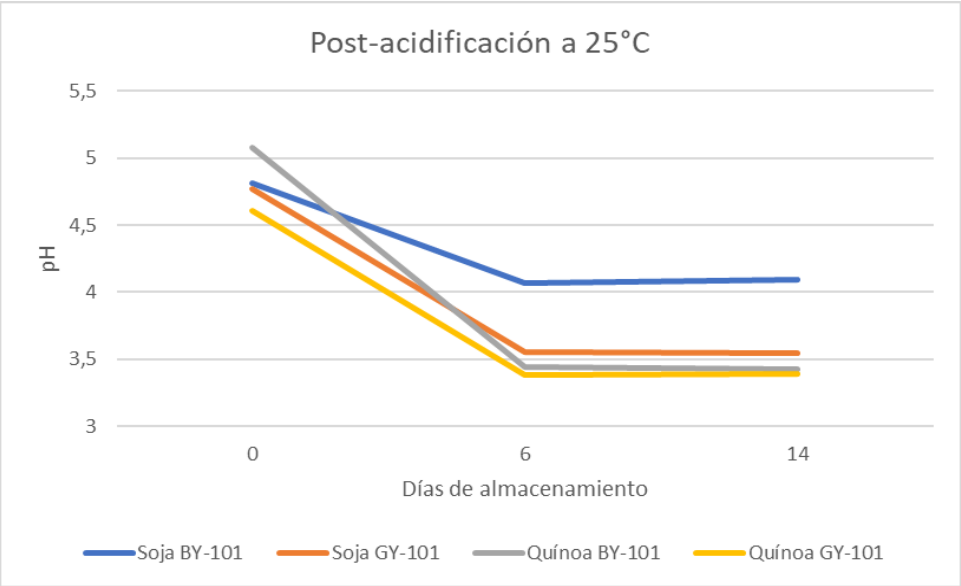


Figura 33. Evolución de pH durante el almacenamiento a 25 °C de las bases de soja y quínoa con glucosa.

3.6 Recuento de microorganismos probióticos

Los resultados correspondientes a la elaboración de coco y almendra (Figura 34) muestra que la base de coco con el cultivo BY-101 estuvo por debajo de $1x10^7$ UFC/g desde el "D+0", es decir, desde el mismo día de la elaboración.

Respecto a la base de coco adicionada con el cultivo GY-101 se observó un recuento inicial superior a $1x10^7$ UFC/g, el cual se mantuvo relativamente estable durante el almacenamiento del producto por 45 días a 6 °C. Se registró una leve disminución al D+30, atribuible a la variabilidad del método.

En relación a las bases de almendra, con ambos cultivos los resultados obtenidos fueron mayores a $1x10^7$ UFC/g desde el día de la elaboración hasta los 45 días posteriores inclusive.

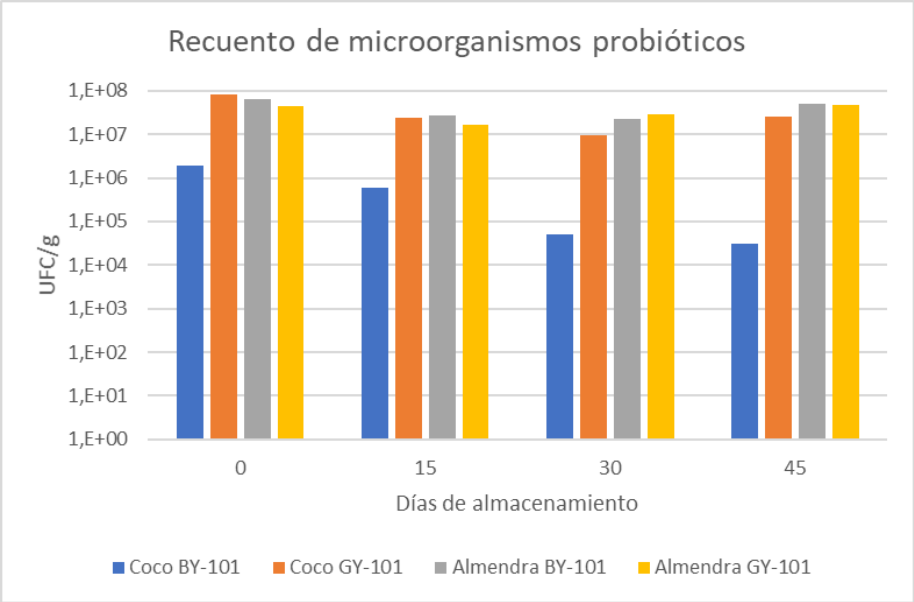


Figura 34. Recuentos de probióticos en las bases fermentadas de coco y almendra almacenadas a 6 °C.

Todos los recuentos correspondientes a las bases de soja y quinoa (bebidas comerciales adicionadas de glucosa y almidón en el caso que corresponda, y posterior tratamiento térmico) tuvieron valores iniciales que superaron $1x10^7$ UFC/g. En el gráfico de la Figura 35, se puede observar que en ambas bases fermentadas con el cultivo GY-101 se mantuvieron los recuentos del microorganismo probiótico hasta los 45 días posteriores a la elaboración. Por otro lado, para las bases de soja y quinoa fermentadas con el cultivo BY-101 no se han podido realizar los

recuentos de microorganismos probióticos correspondientes al D+45, debido a una falla en la generación de anaerobiosis durante el tiempo de incubación.

Particularmente en el caso de la base de soja fermentada con el cultivo BY-101, al D+15 el recuento resulta apenas inferior al límite, pero al D+30 se restablece. Esta oscilación es compatible con la variabilidad del método de recuento.

Por otra parte, la base de quínoa con el mismo cultivo se mantuvo hasta el último dato obtenido, correspondiente al día 30 desde la fecha de elaboración, con un valor de 1,84 x 10^7 UFC/g.

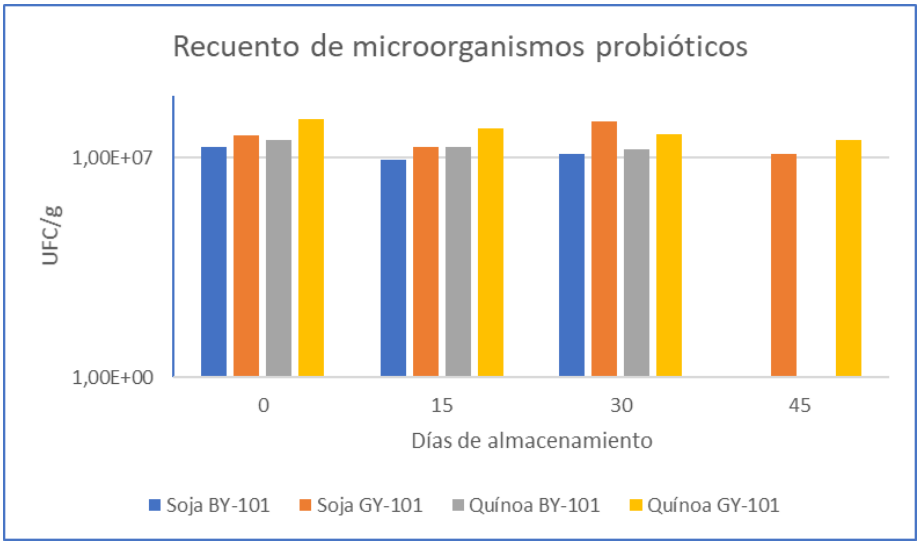


Figura 35. Resultados de los recuentos de probióticos de las bases de soja y quinoa con agregado de glucosa.

3.7 Esfuerzo de corte

En la Figura 36 se observan los resultados que arrojó el análisis de esfuerzo de corte para las matrices de coco y almendras con los cultivos GY-101 y BY-101 a los 7 días de la elaboración. Analizando el gráfico, se observa que para un valor de 0,3 1/s, la matriz que presenta mayor resistencia es la de almendras con GY-101. A partir de 30 1/s, tanto la base de coco como la de almendra adicionadas con el cultivo GY-101, presentan un mayor esfuerzo de corte respecto a las que fueron inoculadas con BY-101.

Al comparar la base de coco con GY-101 y la de almendra con igual cultivo, se observa que, a baja tasa de corte, la almendra da mayor esfuerzo, pero si se aumenta la tasa, esta situación se invierte. Lo mismo ocurre en el caso del cultivo BY. Si se observa la matriz de coco con BY-101 y almendra con BY-101, a baja tasa la almendra da mayor esfuerzo, pero cuando sube la tasa por encima de 60 1/s es la matriz de coco la que resulta con mayor esfuerzo.

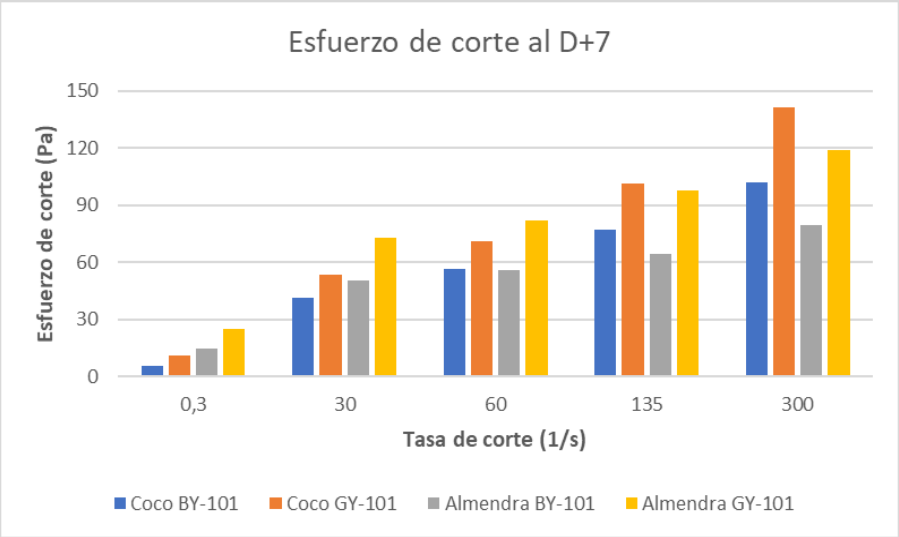


Figura 36. Esfuerzo de corte de las matrices elaboradas de coco y almendra al D+7.

La Figura 37 muestra los resultados del mismo análisis a los 14 días de la elaboración en donde el comportamiento desarrollado anteriormente frente a los valores de tasa de corte se repite.

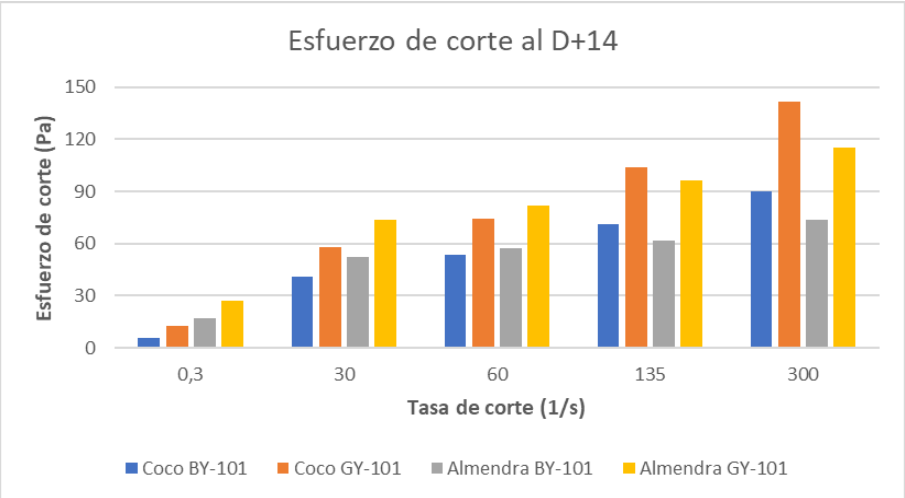


Figura 37. Esfuerzo de corte de las matrices elaboradas de coco y almendra al D+14.

En la Figura 38 se observan los resultados que arrojó el análisis de esfuerzo de corte para las matrices de soja y quinoa con glucosa con los cultivos GY-101 y BY-101 a los 7 días de su elaboración.

Respecto a las bases de quinoa, el comportamiento fue similar al que presentaron el coco y la almendra. La matriz de quinoa con cultivo GY-101 presentó una mayor resistencia al esfuerzo de corte que la que contenía BY-101.

A diferencia de las otras 3 bases, la bebida de soja con el cultivo BY-101 resultó levemente más resistente frente al estrés mecánico que la misma base con el cultivo GY-101.

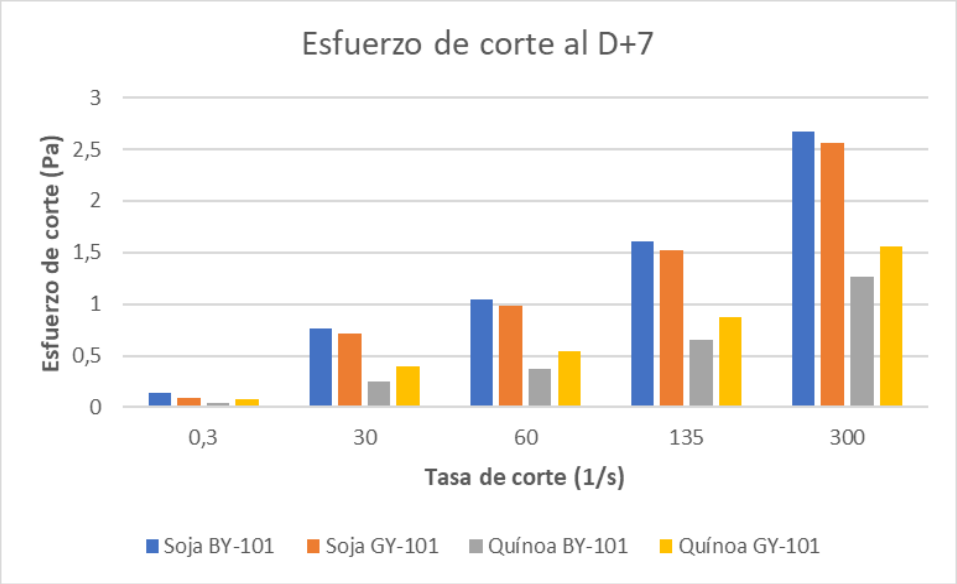


Figura 38. Esfuerzo de corte de las bases de soja y quinoa con glucosa al D+7.

A los 14 días de elaboración (Figura 39), ocurrió una reversión de lo ocurrido al D+7 en las bases de soja pues comenzaron a comportarse tal como lo hicieron el resto de las bases, donde se observa mayor resistencia al esfuerzo de corte en las bases que fueron inoculadas con el cultivo GY-101.

Las bases de quinoa mantuvieron el comportamiento del D+7, acentuándose un poco más dichas características reológicas.

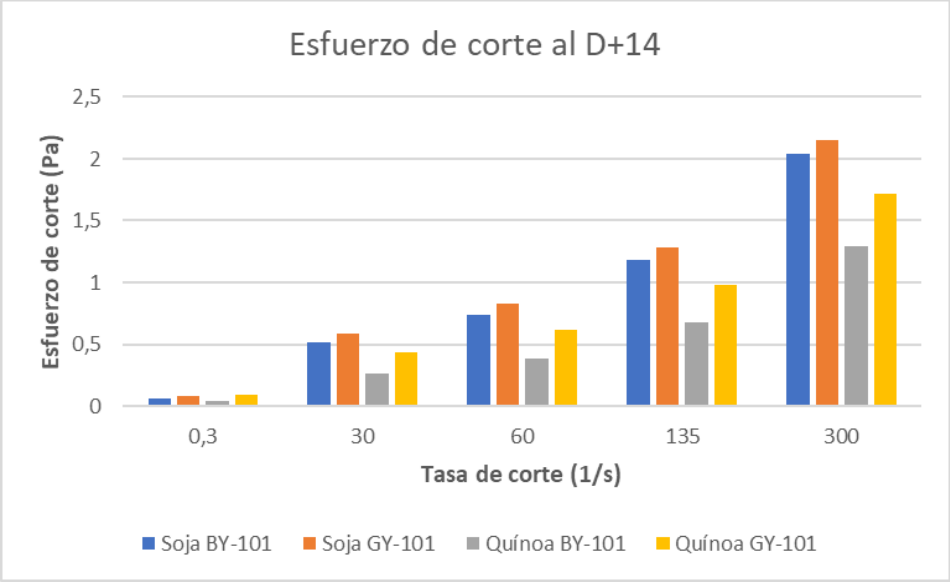


Figura 39. Esfuerzo de corte de las matrices de soja y quinoa con glucosa al D+14.

3.8 Evaluación sensorial

Los datos recolectados del análisis sensorial exploratorio se encuentran detallados en el Anexo G y fueron representados en la Figura 40 donde se observa que para la base de almendra los panelistas no encontraron diferencias entre los distintos cultivos, respecto a atributos como cuchareabilidad, sabor a yogurt, dulzor, acidez y sabor específico. Sin embargo, en los atributos "mouth coating", "mouth thickness" y cremosidad el cultivo GY-101 obtuvo valores superiores al BY-101 en todos los casos.

Las muestras de coco con GY-101 fueron calificadas con valores más altos que aquellas que contenían el cultivo BY-101 en los siguientes parámetros: cuchareabilidad, "mouth coating", "mouth thickness", cremosidad, sabor específico, acidez y sabor a yogur. Entre los atributos mencionados anteriormente, se destaca la superioridad en el valor de cuchareabilidad del cultivo GY-101.

Para ambas bases, la grumosidad fue mayor con el cultivo BY-101 que con GY-101. Además, entre los comentarios agregados por los participantes (Tabla XX), hubo sugerencias de mejorar la grumosidad y textura para los productos con cultivo BY-101.

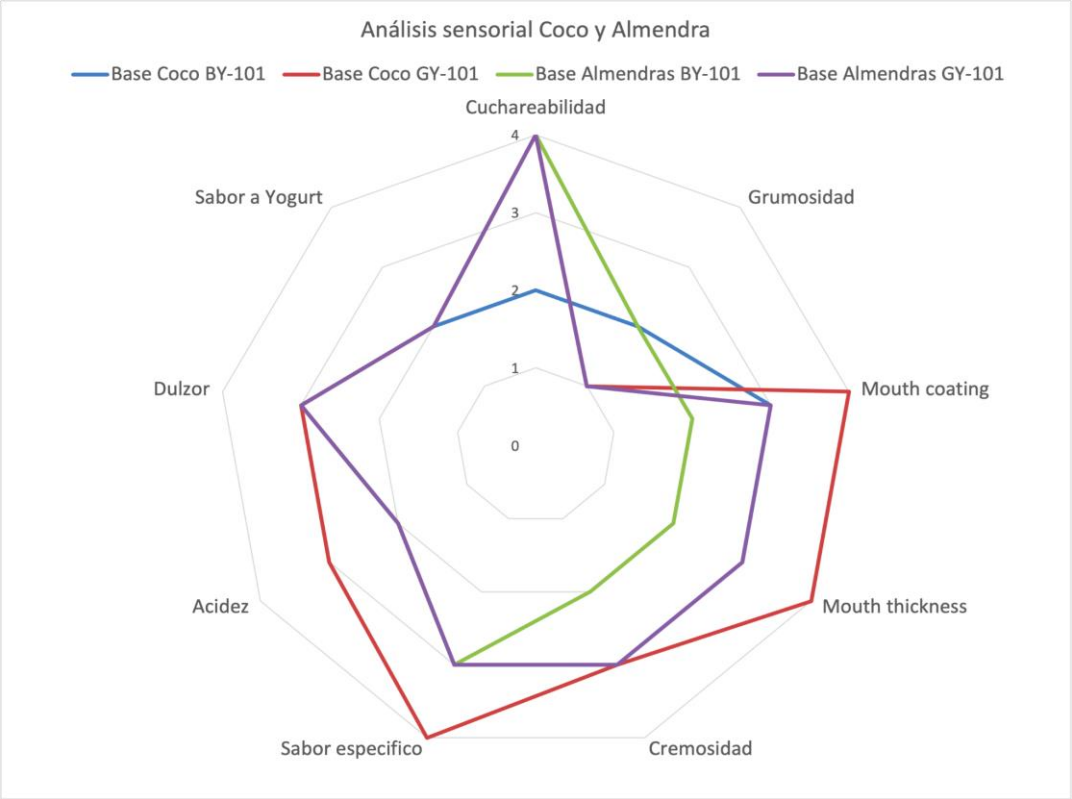


Figura 40. Resultados del análisis sensorial bases coco y almendra.

TABLA XX. Comentarios hechos por los participantes del análisis sensorial de las matrices elaboradas de coco y almendra.

Producto N°	Nombre	Comentarios
457	Coco + Vega Nutrish® BY-101	Buen balance general de sabor. Mejorar consistencia. Producto gomoso. Filancia.
901	Coco + Vega Nutrish® GY-101	Mejor textura y consistencia que el 457. Mejor que el 457. Filancia.
891	Almendra + Vega Nutrish® BY-101	Buen balance de sabor, dulzor y acidez. Mejorar grumosidad.
368	Almendra + Vega Nutrish® GY-101	No agradó. Amargor residual.

En la Figura 41 se observan los resultados del análisis de evaluación sensorial de los productos fermentados obtenidos de soja y quinoa. Estas matrices presentaron una sinéresis alta, muy bajos niveles de “mouth coating” y filancia, y una acidez de moderada a alta. Si bien todas las bases mostraron un “mouth coating” bajo, este parámetro fue calificado levemente más alto en la base de soja con GY-101.

La matriz de quinoa con GY-101 se percibió con una acidez bastante superior al resto de las muestras evaluadas.

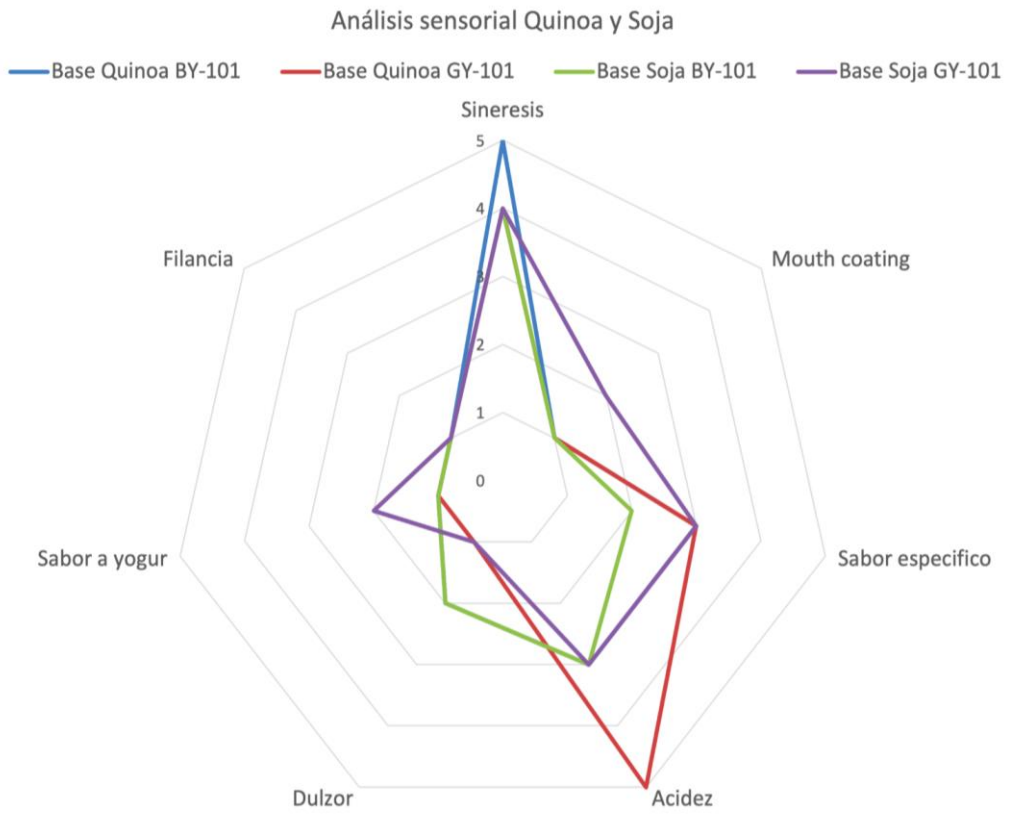


Figura 41. Resultados del análisis sensorial bases soja y quinoa con glucosa.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

4. Discusión y conclusiones

Al comparar los productos de mercado (Tabla XIII y XIV) con las matrices elaboradas para la presente investigación (Tabla XV) (en cuanto a ingredientes e información nutricional) se concluye que los alimentos elaborados son compatibles con los que se comercializan actualmente en el mercado tanto local como internacional. Es por esto que se considera que las matrices elaboradas resultaron adecuadas para poder realizar un análisis de viabilidad de microorganismos probióticos.

Se analizaron microbiológicamente tres productos comercializados dentro del mercado argentino; se observó heterogeneidad en los resultados obtenidos de los recuentos de microorganismos probióticos (Tabla XVII). Solo uno de ellos alcanzó el mínimo requerido por el art. 1389 del CAA (2011), aunque fue evaluado únicamente 15 días previo a la fecha de vencimiento.

Durante la etapa de elaboración de los diferentes prototipos se confirmó que el proceso productivo del yogur tradicional puede utilizarse en un alimento de base vegetal, cuando el objetivo es conseguir un producto con características similares a las del yogur. Para esto, la composición del cultivo fermentador se considera un factor clave. Para fermentar alimentos de base vegetal el cultivo a utilizar no necesariamente debe respetar la composición específica de los cultivos de yogur, establecidos por el CAA en el artículo 576 (2006), como cultivos protosimbióticos de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* a los que en forma complementaria pueden acompañar otras bacterias acidolácticas. No obstante, usar cepas *Lb. bulgaricus* y *St. thermophilus*, permite obtener un producto con características semejantes a un yogur de base láctea. Asimismo, al añadir el cultivo es importante la medición y, en caso necesario, el ajuste del pH de las bases de manera tal que las bacterias se encuentren en un medio adecuado para su crecimiento. Las BAL (Bacterias ácido lácticas) prefieren un pH neutro sobre uno alcalino, se recomienda un pH de inicio de aproximadamente 6,8 - 6,6 (Joergensen, 2020). La empresa proveedora de las materias primas de los productos de coco y almendra, realizó una experiencia previa en donde la fermentación se llevó a cabo sin ajustar el pH de las bases y no se obtuvieron los resultados esperados. Por este motivo, en la primera elaboración de la presente investigación se decidió ajustar el pH mediante la adición de NaOH 50% p/p.

Por otro lado, el pH de las bases de soja y quínoa tampoco se encontraban dentro del rango óptimo, sin embargo, como eran valores superiores a 6,8 – 6,6 y no inferiores como en el caso anterior, se decidió proceder con la fermentación sin el ajuste de pH. Esta decisión no afectó la actividad de los microorganismos.

Otro factor importante a considerar en la elaboración de alimentos fermentados no lácteos es la concentración de alérgenos de las proteínas de la leche, la cual debe mantenerse por debajo de los límites de seguridad específicos para asegurar su consumo. Para ello, es importante contar con procesos de producción controlados y utilizar cultivos diseñados para productos fermentados de origen vegetal los cuales deben ser elaborados utilizando ingredientes no lácteos, como los empleados en este trabajo.

Al analizar las curvas de fermentación correspondientes a las bases de coco y almendra (Figura 25), se observó que el comportamiento fue similar en las bases del mismo sabor e independiente del cultivo que contenían. En consecuencia, estos resultados estarían indicando que, aunque los probióticos poseen cierta actividad fermentativa, la fermentación está principalmente dirigida por los microorganismos *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus*.

En las curvas de fermentación de las matrices de soja y quinoa con el agregado de los respectivos cultivos, y sin tratamiento térmico, se observó que ambos cultivos presentaron un descenso de pH idéntico en la matriz de soja (Figura 26). La soja ha sido ampliamente utilizada para la elaboración de productos fermentados. En general, la leche de soja comercial es un sustrato adecuado para el crecimiento de los iniciadores de yogur, *Lb. delbrueckii* y *Streptococcus thermophilus* (Montemurro *et al*., 2021). En cambio, los prototipos de quinoa tuvieron un descenso de pH similar hasta las 3 horas de fermentación, momento en el cual se observa un leve aumento de pH y luego las curvas adoptan pendientes diferentes. Para el caso de la matriz de quinoa que contenía el cultivo GY-101 la disminución de pH luego de las 3 horas se dio a una velocidad muy baja. Considerando que la única diferencia entre este experimento y el que contiene el cultivo BY-101 es el probiótico, es probable que la diferencia sea consecuencia de cierta falta de actividad por parte del *Lactobacillus rhamnosus*. De esta forma, se planteó un segundo caso, en que el probiótico tendría influencia en el proceso de fermentación por efecto directo o sinérgico con los demás microorganismos presentes. Este

experimento fue descartado debido a que a las 8 horas de fermentación el prototipo de soja con el cultivo GY-101 no alcanzó el pH de corte.

A razón de obtener un producto acorde a lo buscado y comprobar el segundo supuesto, se repitió la fermentación de las bases de soja y quínoa agregando un 1% de glucosa en todos los casos y 0,2% de almidón de tapioca en la base de quínoa. La glucosa se agregó con el objetivo de observar el impacto que tiene la actividad fermentativa del *Lactobacillus rhamnosus*, ya que según Jurado Gamez (2013), los lactobacilos tienen un metabolismo fermentativo, son principalmente aerotolerantes y algunas especies son estrictamente anaeróbicas. En condiciones de exceso de glucosa y un limitado uso de oxígeno, los homolácticos son capaces de transformar un mol de glucosa a través de la vía glucolítica de Embden-Meyerhof-Parnas para formar dos moles de piruvato.

En cuanto al almidón de tapioca, su finalidad fue mejorar la consistencia del producto final dado que la desestabilización de la proteína vegetal causada por la fermentación y la acidificación puede conducir al debilitamiento de la estructura del producto y consecuentemente a la separación de la fase acuosa durante el almacenamiento. Es por esto que la textura óptima de los productos no lácteos comerciales se logra con aditivos (extractos de proteínas, inulina, espesantes y emulsionantes) que no cumplen con la tendencia de productos de etiqueta limpia (Montemurro *et al*., 2021).

En este experimento se observó que las curvas de las matrices de soja reiteraron el patrón esperado (Figura 27). Respecto a las bases de quínoa, las curvas volvieron a tener el salto de pH poco antes de las 3 horas de fermentación, pero luego de esto ambas tomaron prácticamente la misma pendiente. Durante la última fase de la fermentación y en contraposición a lo ocurrido en la segunda elaboración, el cultivo GY-101 adquirió una velocidad mayor que el BY-101.

En la Figura 42 se puede observar que, a diferencia de la elaboración de quínoa sin glucosa y almidón, luego del agregado de estos ingredientes, ambas bases alcanzaron los valores de pH objetivo antes de las 8 horas de fermentación. Por esta razón, considerando que la diferencia entre ambas bases es únicamente el microorganismo probiótico, podría concluirse que previo a la adición de los ingredientes mencionados, el probiótico GY-101 no contaba con suficiente sustrato para influir en la fermentación. También podría ocurrir que uno o varios

ingredientes de la formulación estuviesen influenciando negativamente el crecimiento de dicho microorganismo.

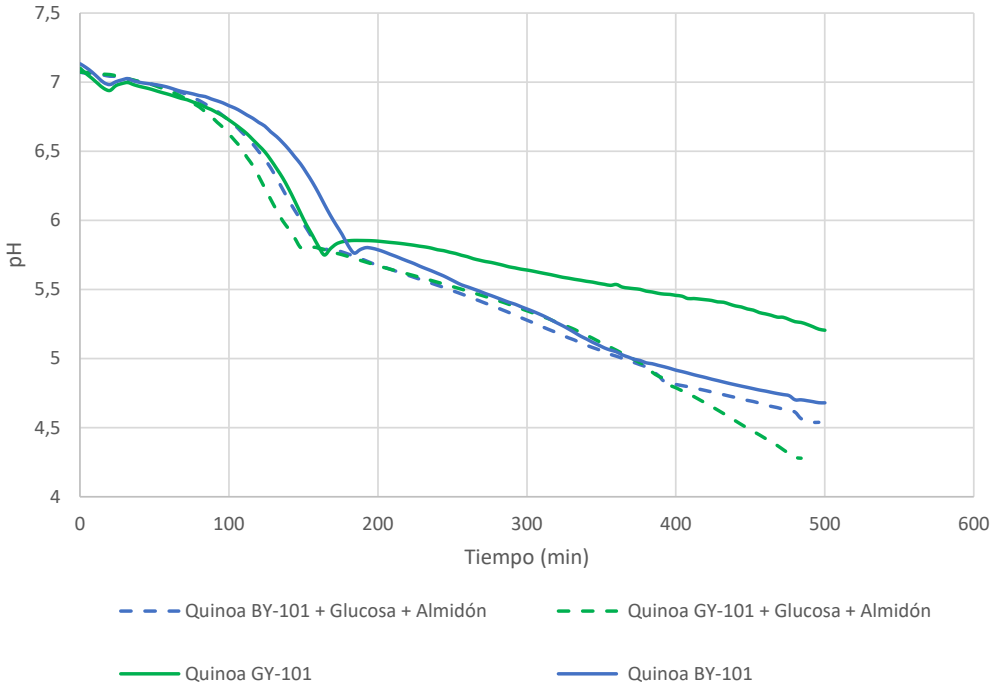


Figura 42. Comparación entre curvas de fermentación de la base de quínoa con y sin el agregado de almidón y glucosa.

Por otro lado, el agregado de glucosa en la base de soja con ambos cultivos generó una disminución en el tiempo de fermentación, aunque la diferencia no es tan relevante como en la base de quínoa con GY-101 (Figura 43).

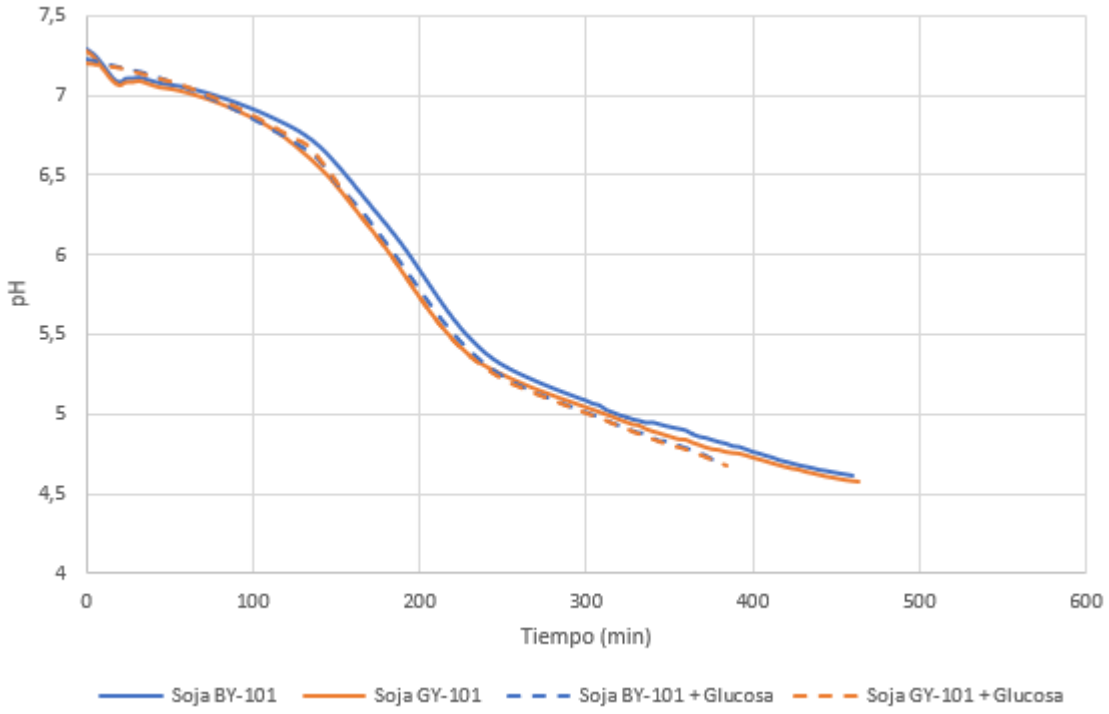


Figura 43. Comparación entre curvas de fermentación de la base de soja con y sin el agregado de glucosa.

Se requiere profundizar en el estudio sobre la influencia del agregado de glucosa en el desarrollo de los microorganismos probióticos y su efecto en la fermentación de alimentos a base de plantas.

En la Tabla XXI se comparan los valores de pH y recuentos microbiológicos correspondientes al día de cada elaboración, a los 30 días y a los 45 días posteriores. A su vez, se incorporó el dato de la diferencia entre los dos valores de pH mencionados. Los recuentos correspondientes al D+45 de los prototipos de soja y quínoa con el cultivo BY-101 no pudieron obtenerse por problemas analíticos, específicamente con la generación de anaerobiosis durante el tiempo de incubación. Se estableció el tamaño de porción en 100 g (1 pote) por lo que el recuento de microorganismos probióticos mínimo debería ser igual o superior a 10^7 UFC/g.

TABLA XXI. Cuadro comparativo de los resultados obtenidos en las determinaciones analíticas referidas a pH y recuentos de microorganismos probióticos.

Tratamientos	pH 6°C D+0 (*)	pH 6°C D+45 (**)	Diferencia entre pH °6 D+0 y D+45	Recuento microorganismos probióticos D+0 (UFC/g)	Recuento microorganismos probióticos D+30 (UFC/g)	Recuento microorganismos probióticos D+45(UFC/g)
Coco + Vega Nutrish® BY-101	4,71	4,7	0,01	1,91E+06	5,00E+04	3,00E+04
Coco + Vega Nutrish® GY-101	4,6	4,28	0,32	8,40E+07	9,7E+06	2,60E+07
Almendra + Vega Nutrish® BY-101	4,65	4,64	0,01	6,40E+07	2,29E+07	5,00E+07
Almendra + Vega Nutrish® GY-101	4,72	4,52	0,2	4,50E+07	2,9E+07	4,80E+07
Soja + Vega Nutrish® BY-101	4,81	4,52	0,29	2,18E+07	1,39E+07	-
Soja + Vega Nutrish® GY-101	4,77	4,45	0,32	5,40E+07	1,48E+08	1,38E+07
Quinoa + Vega Nutrish® BY-101	5,08	4,7	0,38	3,90E+07	1,84E+07	-
Quinoa + Vega Nutrish® GY-101	4,61	3,81	0,8	1,73E+08	5,60E+07	3,68E+07

(*)Resultados correspondientes al mismo día de la elaboración.

(**)Resultados correspondientes a 45 días después de la fecha de elaboración.

Nota: Vega Nutrish® BY-101 está compuesto por *Streptococcus thermophilus, Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis Bb12* y Vega Nutrish® BY-101 está compuesto por *Streptococcus thermophilus, Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *Lactobacillus rhamnosus* GG.

Observando los valores de los recuentos de bifidobacterias, estos se conservaron durante 45 días por encima del mínimo en la base de almendra y durante 30 días en las bases de soja y quínoa. En la base de coco con el cultivo BY-101, el recuento del día de la elaboración no alcanzó el mínimo requerido y fue disminuyendo durante el análisis. Esto podría explicarse por la naturaleza del probiótico, los ingredientes de la base o las características del proceso. El microorganismo es anaerobio estricto y el proceso de elaboración tiene pasos que incorporan aire lo cual afecta directamente su viabilidad. Particularmente las bases de coco y almendra (a diferencia de las de soja y quínoa) fueron reconstituidas mediante hidratación y agitación constante hasta lograr una mezcla líquida y homogénea. Sin embargo, en la base de almendra no se observaron problemas en el desarrollo de BB12® a pesar de haber sido sometida al mismo proceso. Esto indicaría que la diferencia en los recuentos de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB12 en la base de coco, podría deberse a los ingredientes y no al proceso.

En los productos que contenían el probiótico *Lactobacillus rhamnosus* GG, los recuentos se mantuvieron por encima del mínimo (10^9 UFC/porción) en todas las matrices de análisis durante 45 días desde la fecha de elaboración. Estudios demuestran que una cepa probiótica de *Lacticaseibacillus rhamnosus*, inoculada junto con otras cepas de bacterias ácido lácticas seleccionadas como iniciadores para la fermentación, fue capaz de sobrevivir a una densidad celular superior a 10^8 ufc/mL en análogos de yogur a base de cereal/leguminosa durante 30 días de almacenamiento en frío (Montemurro *et al*., 2021)

Se realizó un estudio similar en bebida de almendra, la cual fue fermentada con los probióticos *Lactobacillus reuteri* y *Streptococcus thermophilus.* El producto final se caracterizó durante el tiempo de almacenamiento en frío (28 días) en cuanto a pH, acidez, retención de suero y viabilidad iniciadora. La leche fermentada permitió supervivencias probióticas in vitro por encima del nivel sugerido como mínimo para asegurar beneficios para la salud durante todo el tiempo controlado y, por lo tanto, puede ser considerada como un alimento funcional (Bernat *et al.*, 2015).

La utilización de BB12® en futuros desarrollos presenta un mayor desafío debido a su sensibilidad al oxígeno y es importante tener en cuenta que en el desarrollo de un producto fermentado probiótico de base vegetal es necesario verificar la viabilidad de la cepa ya que, como se observó en el caso de la base de coco, puede verse afectada por los ingredientes de la base. A pesar de esto, se han obtenido recuentos de bifidobacterias por arriba del límite inferior hasta 30 días luego de la elaboración en todas las matrices excepto en la de coco y hasta 45 días para la base de almendra. En cuanto a los lactobacilos, los recuentos se mantuvieron por encima del mínimo en todas las bases hasta los 45 días posteriores a la elaboración. Esto indica que ambos probióticos poseen una elevada capacidad de supervivencia.

Analizando la post-acidificación, en general fue baja por parte de ambos cultivos en prácticamente todas las matrices de estudio. Observando las mediciones de pH al D+0 y D+45 (Tabla XXI) se puede observar la prolongada estabilidad en los valores obtenidos. A su vez, los valores de pH medidos al día 45 se encuentran dentro de los parámetros esperados ya que en un yogur tradicional el pH en este mismo período es aproximadamente de 4,3. La excepción a lo mencionado anteriormente se observa en la base de quínoa con el cultivo GY-101, en donde el pH final está por debajo de lo esperado y en menor medida en la base de coco con el mismo

cultivo. En ambos casos, tuvieron un pH al D+0 cercano a 4,6 lo cual podría haber influido en dicho comportamiento.

Comparando la estabilidad de pH entre cultivos, el BY-101 presentó una menor post-acificación en comparación con el cultivo GY-101. Esto corresponde a lo esperado, pues *L. rhamnosus*, siendo mesófilo, tiene actividad acidificante a temperaturas bajas, mientras que el termófilo *Bifidobacterium* es más estable. La baja post-acidificación de los cultivos se considera un beneficio para la estabilidad de los probióticos ya que una elevada producción de ácido láctico durante el almacenamiento podría afectar la viabilidad de estos microorganismos.

Los análisis de esfuerzo de corte en las bases de coco y almendra muestran que independientemente de qué base está siendo analizada, la medición es mayor para aquellas que fueron inoculadas con el cultivo GY-101 (Figura 36 y 37). A medida que se aumenta la tasa de corte, esta característica se hace más notoria. Esto es importante cuando se desea lograr el desarrollo de un producto con características reológicas similares a las de un yogur batido tradicional. Este comportamiento merece un estudio más profundo sobre la interacción entre LGG® y los componentes de las bases vegetales en el desarrollo de textura.

La diferencia de esfuerzo de corte mencionada anteriormente también se vio reflejada los resultados del análisis sensorial realizado en ambas bases, específicamente en los atributos cremosidad, “mouth thickness” y “mouth coating” (Figura 40). Otro parámetro relevante dentro de los evaluados es la grumosidad. Para el tipo de alimento en estudio, se espera obtener un resultado bajo, ya que los grumos son una característica indeseable en la elaboración de yogur. Las matrices que contenían GY-101 resultaron menos grumosas que las que contenían BY-101.

En el análisis de reología correspondiente a la base de quinoa, se observó el mismo comportamiento que en coco y almendra, donde toma protagonismo la influencia del cultivo GY-101 para otorgar mayor resistencia (Figura 38 y 39). En el caso de las bases de soja, el comportamiento frente a un estrés mecánico a los 7 días de su elaboración, fue contrario al resto de las bases, siendo el cultivo BY-101 el que otorgó mayor esfuerzo al corte. Esta situación se revirtió en la siguiente medición, a los 14 días de la elaboración.

En cuanto a los resultados del análisis sensorial, no se obtuvieron diferencias entre ambas bases que respalden el comportamiento observado en el análisis reológico (Figura 41).

Finalmente, luego de analizar en conjunto los datos obtenidos en esta investigación se puede concluir que, en todas las matrices de estudio, el probiótico LGG® logró mantener el recuento mínimo durante los 45 días de estudio siendo viable su adición en futuros desarrollos de alimentos vegetales fermentados. A su vez, BB12® logró sobrevivir alcanzando los recuentos necesarios hasta 30 días posteriores a la fecha de elaboración en todas las matrices excepto en la de coco. Esto podría atribuirse a los ingredientes utilizados en la elaboración de dicha matriz, aunque es necesario profundizar acerca del impacto de los ingredientes en la viabilidad de los microorganismos probióticos.

Por último, al observar los resultados de los análisis complementarios a los recuentos microbiológicos, se concluye que los microorganismos probióticos tendrían cierta influencia en el proceso de fermentación, en la post-acidificación, y en ciertos casos en las características organolépticas del producto final.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

5. Referencias bibliográficas

- Álvarez, J., Real, J. M. F., Guarner, F., Gueimonde, M., Rodríguez, J. M., de Pipaon, M. S., & Sanz, Y. (2021). Microbiota intestinal y salud. Gastroenterología y Hepatología, 44(7), 519-535. https://doi.org/10.1016/j.gastrohep.2021.01.009
- Araya, H., & Lutz, M. (2003). Alimentos funcionales y saludables. Revista Chilena de Nutrición, Vol. 30, Nº1, abril 2003, 8-14. http://dx.doi.org/10.4067/S0717-75182003000100001
- Aschemann-Witzel, J., Gantriis, R. F., Fraga, P., & Perez-Cueto, F. (2021). Plant-based food and protein trend from a business perspective: markets, consumers, and the challenges and opportunities in the future. Critical reviews in food science and nutrition, 61(18), 3119–3128. https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1793730
- Asioli, D., Aschemann-Witzel, J., Caputo, V., Vecchio, R., Annunziata, A., Næs, T., & Varela, P. (2017). Making sense of the "clean label" trends: A review of consumer food choice behavior and discussion of industry implications. Food Research International, 99, 58-71. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.07.022
- Baud, D., V. Dimopoulou, G. Gibson, G. Reid, & Giannoni E. (2020). Using probiotics to flatten the curve of coronavirus disease COVID-2019 pandemic. frontiers in public health: 8: Article 186. https://doi.org/10.3389/fpubh.2020.00186
- Begley, M., Hill, C., & Gahan, C. G. (2006). Bile salt hydrolase activity in probiotics. Applied and Environmental Microbiology, 72(3), 1729-1738. https://doi.org/10.1128/AEM.72.3.1729-1738.2006
- Bengoa, A. A., Garrote, G. L. & Abraham, A. G. (2020), Kefir y los Alimentos fermentados artesanales. Instituto Danone. . 135-164 https://ri.conicet.gov.ar/handle/11336/120178. Consultado el 05 de agosto de 2021.
- Bernal Castro, C. A., Díaz-Moreno, C., & Gutiérrez-Cortés, C. (2017). Probióticos y prebióticos en matrices de origen vegetal: Avances en el desarrollo de bebidas de frutas. Revista Chilena de Nutrición, 44(4), 383-392. http://dx.doi.org/10.4067/s0717-75182017000400383

- Bernat, N., Cháfer, M., Chiralt, A., & González Martínez, C. (2015). Probiotic fermented almond "milk" as an alternative to cow-milk yoghurt. International Journal of Food Studies, 4(2).
- Bertazzoni, E., Donelli, G., Midtvedt, T., Nicoli, J., & Sanz, Y. (2013). Probiotics and clinical effects: is the number what counts? Journal of chemotherapy, 25(4), 193-212. https://doi.org/10.1179/1973947813Y.0000000078
- Bezkorovainy, A. (2001). Probiotics: determinants of survival and growth in the gut. The American journal of clinical nutrition, 73(2), 399s-405s. https://doi.org/10.1093/ajcn/73.2.399s
- Boirivant, M., & Strober, W. (2007). The mechanism of action of probiotics. Current Opinion in Gastroenterology, 23(6), 679-692. doi: 10.1097/MOG.0b013e3282f0cffc
- Cáceres, P., & Gotteland, M. (2010). Alimentos probióticos en Chile: ¿Qué cepas y qué propiedades saludables? Revista Chilena de Nutrición, 37(1), 97-109. http://dx.doi.org/10.4067/S0717-75182010000100010
- Cadaval, A., Escauriaza, B. A., Barrutia, U. G., Rodrigo, C. P., Aranceta, J., & Majem, L. S. (2005). Alimentos funcionales. Para una alimentación más saludable. Guia funcional Naturlinea. https://www.yakult.mx/uploads_yakult/pdf/Alimentos%20funcionales_31.pdf. Consultado el 15 de mayo de 2021
- Capurso, L. (2019). Thirty years of Lactobacillus rhamnosus GG: a review. Journal of Clinical Gastroenterology, 53, S1-S41. doi: 10.1097/MCG.0000000000001170
- Castañeda Guillot, C. (2018). Probióticos, puesta al día. Revista Cubana de Pediatría, 90(2). http://www.revpediatria.sld.cu/index.php/ped/article/view/500/195. Consultado el 6 de junio de 2022.
- Chalbaud, E. & Mogollón, L. (2020). Potencialidades de los probióticos en el escenario de pandemia COVID19. Observador Del Conocimiento Vol. 5 Nº 3 septiembre. https://docs.bvsalud.org/biblioref/2020/09/1120106/art3-chabauld.pdf

- Claes, I. J., Segers, M. E., Verhoeven, T. L., Dusselier, M., Sels, B. F., De Keersmaecker, S. C., Vanderleyden, J. & Lebeer, S. (2012). Lipoteichoic acid is an important microbe-associated molecular pattern of Lactobacillus rhamnosus GG. Microbial Cell Factories, 11(1), 1-8. https://doi.org/10.1186/1475-2859-11-161
- Clúster alimentario de Galicia, Tendencias Globales sector lácteo, (2020). 17-22 Leches. https://www.clusteralimentariodegalicia.org/wp-content/uploads/2020/07/informe-tendencias-globales-sector-lacteo-clusaga.pdf. Consultado el 22 de mayo de 2021.
- Código Alimentario Argentino (2006). Capítulo VIII: Alimentos lácteos. Art. 576. Buenos Aires. https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/capitulo_viii_lacteos_actualiz_2020-01.pdf. Consultado el 3 de julio de 2021.
- Código Alimentario Argentino (2011). Capítulo XVII: Alimentos de régimen o dietéticos. Artículo 1389 (Res. Conj. 261/2011 SPReI y 22/2011 SAGyP. https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/anmat_caa_capitulo_xvii_dieteticosactualiz_2021-07.pdf. Consultado el 20 de julio de 2021.
- Collado Amores, M. C. (2004). Caracterización de cepas del género Bifidobacterium con carácter probiótico (Doctoral dissertation, Universitat Politècnica de València). https://
- Collado, M. C., Grześkowiak, Ł., & Salminen, S. (2007). Probiotic strains and their combination inhibit in vitro adhesion of pathogens to pig intestinal mucosa. Current microbiology, 55(3), 260–265. https://doi.org/10.1007/s00284-007-0144-8
- Costa, A. L., Antunes, L. A. F & Mitsuo Saito, M., (2020). Revista HA-LA Biotec, La ciencia detrás de LGG. Número 1, Chr. Hansen. Consultado el 17 de mayo de 2021.
- Del Greco, N. (2010). Estudio sobre tendencias de consumo de alimentos. Primera parte-Generalidades y casos. Datos relevantes para la toma de decisiones en la Agroindustria de Alimentos y Bebidas. http://bvs.minsa.gob.pe/local/MINSA/2603.pdf. Consultado el 20 de julio de 2021.

- Dey G. (2018) Non-dairy Probiotic Foods: Innovations and Market Trends. In: Panda S., Shetty P. (eds) Innovations in Technologies for Fermented Food and Beverage Industries. Food Microbiology and Food Safety. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-74820-7_9
- Díaz, L. G., Tarifa P. G., Olivera S., Gerje, F. L., Benitez, M. B. & Ercoli, P. H. (2014). Alimentos: historia, presente y futuro /1a ed. - Ciudad Autónoma de Buenos Aires: Ministerio de Educación de la Nación.
- Douillard, F. P., Ribbera, A., Jïrvinen, H. M., Kant, R., Pietilï, T. E., Randazzo, C., & de Vos, W. M. (2013). Comparative genomic and functional analysis of Lactobacillus casei and Lactobacillus rhamnosus strains marketed as probiotics. Applied and environmental microbiology, 79(6), 1923-1933. https://doi.org/10.1128/AEM.03467-12
- Falguera V., Aliguer N. & Falguera M. (2012) An integrated approach to current trends in food consumption: Moving toward functional and organic products? Food Control, 26 274. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.01.051
- Feil, A. A., Schreiber, D., Haetinger, C., Haberkamp, Â. M., Kist, J. I., Rempel, C., Maehler, A. E., Gomes M. C. & da Silva, G. R. (2020). Sustainability in the dairy industry: a systematic literature review. Environmental science and pollution research, 27(27), 33527-33542. https://doi.org/10.1007/s11356-020-09316-9
- Fuentes Cuiñas, A. A. (2019). Cambios en el consumo y percepciones en torno a la alimentación saludable de la leche tradicional y bebidas de origen vegetal. RIVAR, 6(17), 1-14. http://dx.doi.org/10.35588/rivar.v6i17.3910
- Fuentes Cuiñas, A. A., Vailati, P. A., & Lazzatti, G. L. (2020). Vegetarianismo y veganismo: percepciones en el consumo de bebidas de origen vegetal en el Área Metropolitana de Buenos Aires. RIVAR, 7(21), 124-135. https://dx.doi.org/10.35588/rivar.v7i21.4641
- García-Hernández, A., & Rodríguez-Hernández, G. (2021). Ciencia e innovación agroalimentaria de la universidad de Guanajuato. Bebidas vegetales y sus aportes

funcionales. Vol. 3, Núm. 1, pp. 31-48. http://www.reiagro.ugto.mx/images/pdf/vol5/Numero-completo.pdf#page=34. Consultado el 10 de junio de 2021.

- Gómez Gallego C., Gueimonde M., Karlund A. & Salminen S. (2020). El papel de los alimentos fermentados en la alimentación. https://digital.csic.es/bitstream/10261/238276/1/El%20papel%20de%20los%20alimentos%20fermentados%20en%20la%20alimentaci%c3%b3n.pdf. Consultado el 07 de mayo de 2021.
- Grasso, N., Alonso-Miravalles, L. & O'Mahony, J.A. (2020) Composition, physicochemical and sensorial properties of commercial plant-based yogurts foods 9 252.
- Gupta, A., Sharma, R., & Sharma, S. (2020). Almond. In Antioxidants in Vegetables and Nuts-Properties and Health Benefits (pp. 423-452). Nayik G. A. & Gull A (Ed.). Springer, Singapore.
- Hemaiswarya, S., Raja, R., Ravikumar, R., & Carvalho, I. S. (2013). Mechanism of action of probiotics. Brazilian archives of Biology and technology, 56, 113-119.
- Hurtado Escamilla M.L. & Hurtado Escamilla M.G., (2007). Los alimentos fermentados que comían nuestros bisabuelos prehispánicos. Ciencia. https://revistaciencia.amc.edu.mx/images/revista/58_2/PDF/11-419.pdf. Consultado el 07 de mayo de 2021.
- Iniesta, M., Zurbriggen, M., Montero, E., & Herrera, D. (2011). Los probióticos y sus beneficios terapéuticos. Periodoncia y Osteointegración, 21(3), 171-179.
- Interián-Gómez, L., Aguila-Gutiérrez, S. E., Esquivias-López, K. M., Pulido-De la Cruz, V. A., Silva-Arzola, N. J., & González-Becerra, K. (2021). Food components, mood and their relationship with the immune system in covid-19. Revista Salud Pública y Nutrición, 20(4), 73-86.
- Iñiguez-Palomares, C., & Acedo-Félix, E. (2006). Mecanismos de adhesión al tracto intestinal y antagonismo de Bifidobacterium. Revista Salud Pública y Nutrición, 7(2).

https://www.medigraphic.com/pdfs/revsalpubnut/spn-2006/spn062f.pdf. Consultado el 15 de septiembre de 2021.

- Izquierdo, E., Medina, M., Ennahar, S., Marchioni, E., & Sanz, Y. (2008). Resistance to simulated gastrointestinal conditions and adhesion to mucus as probiotic criteria for Bifidobacterium longum strains. Current Microbiology, 56(6), 613-618
- Joergensen, L. V. (2020) Revista Tecnología Láctea Latinoamericana, año XXV - Edición 109 / Julio 2020. https://publitec.com/2020/10/edicion-109/. Consultado el 27 de abril de 2021.
- Johnson-Henry, K. C., Donato, K. A., Shen-Tu, G., Gordanpour, M., & Sherman, P. M. (2008). Lactobacillus rhamnosus strain GG prevents enterohemorrhagic Escherichia coli O157: H7-induced changes in epithelial barrier function. Infection and immunity, 76(4), 1340-1348. https://doi.org/10.1128/IAI.00778-07
- Jungersen, M., Wind, A., Johansen, E., Christensen, J. E., Stuer-Lauridsen, B., & Eskesen, D. (2014). The science behind the probiotic strain Bifidobacterium animalis subsp. lactis BB-12®. Microorganisms, 2(2), 92-110. https://doi.org/10.3390/microorganisms2020092
- Jurado Gámez, H., Ramírez, C., & Aguirre, D. (2013). Cinética de fermentación de Lactobacillus plantarum en un medio de cultivo enriquecido como potencial probiótico. Veterinaria y Zootecnia, 7(2), 37-53. http://190.15.17.25/vetzootec/downloads/v7n2a03.pdf. Consultado el 25 de enero de 2022.
- Kankainen, M., Paulin, L., Tynkkynen, S., von Ossowski, I., Reunanen, J., Partanen, P., ... & de Vos, W. M. (2009). Comparative genomic analysis of Lactobacillus rhamnosus GG reveals pili containing a human-mucus binding protein. Proceedings of the National Academy of Sciences, Luchette F.A., & Yelon J.A. (Ed.), 106(40), 17193-17198. https://doi.org/10.1073/pnas.0908876106
- Kim, Y., & Pritts, T. A. (2017). The gastrointestinal tract. In Geriatric Trauma and Critical Care (pp. 35-43). Springer, Cham.

- Koskenniemi, K., Laakso, K., Koponen, J., Kankainen, M., Greco, D., Auvinen, P., & Varmanen, P. (2011). Proteomics and transcriptomics characterization of bile stress response in probiotic Lactobacillus rhamnosus GG. Molecular & Cellular Proteomics, 10(2), S1-S18. https://doi.org/10.1074/mcp.M110.002741
- Lara López, I. M., Santiesteban-López, N. A., Ceróncarrillo, T. G., & Morales-Paredes, Y. R. (2020). The role of probiotics in times of the COVID-19 pandemic El papel de los probióticos en tiempos de la pandemia COVID-19. Journal-Republic of Guatemala, 6(10), 12-23.
- Lebeer, S., Claes, I. J., Verhoeven, T. L., Vanderleyden, J., & De Keersmaecker, S. C. (2011). Exopolysaccharides of Lactobacillus rhamnosus GG form a protective shield against innate immune factors in the intestine. Microbial biotechnology, 4(3), 368-374. https://doi.org/10.1111/j.1751-7915.2010.00199.x
- López-Calleja, I. M., de la Cruz, S., Pegels, N., González, I., Martín, R., & García, T. (2014). Sensitive and specific detection of almond (Prunus dulcis) in commercial food products by real-time PCR. LWT-Food Science and Technology, 56(1), 31-39. https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643813003940
- Martínez Cuesta, M. C., Peláez, C., & Requena, T. (2012). Probióticos en la salud humana. Grupo de Biología Funcional de Bacterias Lácticas. Departamento de Biotecnología y Microbiología de Alimentos. Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación, CIAL (CSIC-UAM) Campus Cantoblanco, CEI UAM+CSIC, Madrid.
- Martins, F. S., Silva, A. A., Vieira, A. T., Barbosa, F. H., Arantes, R. M., Teixeira, M. M., & Nicoli, J. R. (2009). Comparative study of Bifidobacterium animalis, Escherichia coli, Lactobacillus casei and Saccharomyces boulardii probiotic properties. Archives of microbiology, 191(8), 623–630. https://doi.org/10.1007/s00203-009-0491-x
- Mättö, J., Alakomi, H. L., Vaari, A., Virkajärvi, I., & Saarela, M. (2006). Influence of processing conditions on Bifidobacterium animalis subsp. lactis functionality with a special focus on acid tolerance and factors affecting it. International Dairy Journal, 16(9), 1029-1037. https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2005.10.014

- Meybodi, N. M., Mortazavian, A. M., Arab, M., & Nematollahi, A. (2020). Probiotic viability in yoghurt: A review of influential factors. International Dairy Journal, 109, 104793. https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2020.104793
- Ministerio de consumo de España (2020). Agencia española de seguridad alimentaria y nutrición. Probióticos en los alimentos. https://www.ipaeurope.org/wp-content/uploads/2020/11/202010-QA-SpainProbioticos_alimentos.pdf. Consultado el 15 de junio de 2022.
- Ministerio de salud de Italia (2018). Dirección general de higiene y seguridad de los alimentos y la nutrición. Directrices sobre probióticos y prebióticos. https://www.salute.gov.it/imgs/C_17_pubblicazioni_1016_ulteriorialegati_ulteriorealegato_0_alleg.pdf. Consultado el 15 de junio de 2022.
- Montemurro, M., Pontonio, E., Coda, R., & Rizzello, C. G. (2021). Plant-based alternatives to yogurt: State-of-the-art and perspectives of new biotechnological challenges. Foods, 10(2), 316. https://doi.org/10.3390/foods10020316
- Nascimento, A. C., Mota, C., Coelho, I., Gueifão, S., Santos, M., Matos, A. S., ... & Castanheira, I. (2014). Characterisation of nutrient profile of quinoa (Chenopodium quinoa), amaranth (Amaranthus caudatus), and purple corn (Zea mays L.) consumed in the North of Argentina: Proximates, minerals and trace elements. Food chemistry, 148, 420-426. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.09.155
- Nayik, G. A., & Gull, A. (Eds.). (2020). *Antioxidants in Vegetables and Nuts-Properties and Health Benefits*. Springer.
- Nyanzi, R., Jooste, P. J., & Buys, E. M. (2021). Invited review: Probiotic yogurt quality criteria, regulatory framework, clinical evidence, and analytical aspects. Journal of Dairy Science, 104(1), 1-19. https://doi.org/10.3168/jds.2020-19116
- Ouwehand, A. C., Kirjavainen, P. V., Grönlund, M. M., Isolauri, E., & Salminen, S. J. (1999). Adhesion of probiotic micro-organisms to intestinal mucus. International Dairy Journal, 9(9), 623-630.

- Papies, E., Johannes, N., Daneva T., Semyte G. & Kauhanen L. (2020) Using consumption and reward simulations to increase the appeal of plant-based foods, Appetite, 155, 104812. https://doi.org/10.1016/j.appet.2020.104812
- Pérez-Leonard, H., Bueno-García, G., Brizuela-Herrada, M. A., Tortoló-Cabañas, K., & Gastón-Peña, C. (2013). Microencapsulación: una vía de protección para microorganismos probióticos. ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar, 47(1), 14-25. https://www.redalyc.org/pdf/2231/223126409003.pdf. Consultado el 10 de octubre de 2022.
- Pichihua Roman, L. (2016). Influencia de la sustentación parcial de lactosuero y harina de quinua chenopodium quinoa willd) en las propiedades organolépticas y fisicoquímicas del yogur sustituido. Tesis de grado de Ingeniería Agroindustrial. Universidad Nacional José María Arguedas. Perú.
- Plaza-Diaz, J., Ruiz-Ojeda, F. J., Gil-Campos, M., & Gil, A. (2019). Mechanisms of action of probiotics. Advances in Nutrition, 10(suppl_1), S49-S66.
- Ponnusha, B. S., Subramaniyam, S., & Pasupathi, P. (2011). Antioxidant and antimicrobial properties of Glycine max-A review. International Journal of Current Biological and Medical Science., 1(2), 49-62.
- Pot, B., Felis, G. E., Bruyne, K. D., Tsakalidou, E., Papadimitriou, K., Leisner, J., & Vandamme, P. (2014). The genus Lactobacillus. Lactic acid bacteria: biodiversity and taxonomy, Holzapfel, W. H., Wood B. J. B. (Eds.), Chapter 19, 249-353. https://doi.org/10.1002/9781118655252.ch19
- Quesada, D., & Gómez, G. (2019). ¿Proteínas de origen vegetal o de origen animal?: Una mirada a su impacto sobre la salud y el medio ambiente. Revista de Nutrición Clínica y Metabolismo, 2(1), 79-86.
- Rasika, D. M., Vidanarachchi, J. K., Rocha, R. S., Balthazar, C. F., Cruz, A. G., Sant'Ana, A. S., & Ranadheera, C. S. (2020). Plant-based milk substitutes as emerging probiotic carriers. Current Opinion in Food Science. https://doi.org/10.1016/j.cofs.2020.10.025

- Reunanen, J., Von Ossowski, I., Hendrickx, A. P., Palva, A., & de Vos, W. M. (2012). Characterization of the SpaCBA pilus fibers in the probiotic Lactobacillus rhamnosus GG. Applied and Environmental Microbiology, 78(7), 2337-2344. https://doi.org/10.1128/AEM.07047-11
- Roy, D. (2001). Media for the isolation and enumeration of bifidobacteria in dairy products. International Journal of Food Microbiology, 69(3), 167-182.
- Rufino Pallás, N. (2021). Fermentation of plant-based milk substitutes: state of the art and future research opportunities. Universitat Politècnica de València. http://hdl.handle.net/10251/171075. Consultado el 14 de junio de 2021.
- Ruiz Álvarez, V., Puig Peña, Y., & Rodríguez Acosta, M. (2010). Microbiota intestinal, sistema inmune y obesidad. Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas, 29(3), 364-397. Recuperado en 13 de febrero de 2022, de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-03002010000300007&lng=es&tlng=es.
- Saccaro, D. M., Hirota, C. Y., Tamime, A. Y., & de Oliveira, N. (2011). Evaluation of different selective media for enumeration of probiotic micro-organisms in combination with yogurt starter cultures in fermented milk. African Journal of Microbiology Research, 5(23), 3901-3906. https://doi.org/10.5897/AJMR11.598
- Salvo-Romero, E., Alonso-Cotoner, C., Pardo-Camacho, C., Casado-Bedmar, M., & Vicario, M. (2015). Función barrera intestinal y su implicación en enfermedades digestivas. Revista Española de Enfermedades Digestivas, 107(11), 686-696.
- Sánchez Huerta, D. (2020). Análisis Foda o Dafo. Bubok publishing S.L. Madrid (Ed.).
- Sebastián-Domingo, J. J., & Sánchez-Sánchez, C. (2018). De la flora intestinal al microbioma. Revista Española de Enfermedades Digestivas, 110(1), 51-56. https://dx.doi.org/10.17235/reed.2017.4947/2017
- Seth, A., Yan, F., Polk, D. B., & Rao, R. K. (2008). Probiotics ameliorate the hydrogen peroxide-induced epithelial barrier disruption by a PKC-and MAP kinase-dependent

mechanism. American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology, 294(4), G1060-G1069. https://doi.org/10.1152/ajpgi.00202.2007

- Stage, M., Whicmann A., Jørgensen, M., Vera-Jimenéz, N. I., Wielje, M., Nielsen, D. S., Sandelin, A., Chen, Y. & Baker, A. (2020). *Lactobacillus rhamnosus* GG Genomic and Phenotypic Stability in an Industrial Production Process. Applied and Environmental Microbiology, Vol. 86, No. 6. https://doi.org/10.1128/AEM.02780-19
- Strada Rodríguez, J., & Vila, I. (2015). La producción de soja en Argentina: causas e impactos de su expansión. Centro Cultural de la Cooperación Floreal Gorini; La Revista del CCC; 23; 12-2015; 1-11.
- Taranto, M. P., Medici, M. G., Font, G. M., (2005). Alimentos funcionales probióticos; Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Departamento de Química Biológica; Química Viva; 4; 1; 5-2005; 26-34. http://www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar/v4n1/taranto.html. Consultado el 29 de mayo de 2021.
- Terpou, A., Papadaki, A., Lappa, I. K., Kachrimanidou, V., Bosnea, L. A., & Kopsahelis, N. (2019). Probiotics in food systems: significance and emerging strategies towards improved viability and delivery of enhanced beneficial value. nutrients, 11(7), 1591. https://doi.org/10.3390/nu11071591
- Tormo Carnicé, R. (2006). Universidad Autónoma de Barcelona. Hospital Vall d'Hebron. Gastroenterología y Nutrición Infantil. Barcelona. España. Probióticos. Concepto y mecanismos de acción. An. pediart, Monogr. 4(1): 30-41.
- Tripathi, M. K., & Giri, S. K. (2014). Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage. Journal of functional foods, 9, 225-241. https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.04.030
- Trujillo Sánchez, A. F., & Arias Maya, L. S. (2013). El coco, recurso renovable para el diseño de materiales verdes. Entre Ciencia e Ingeniería, 7(14), 93-100. https://revistas.ucp.edu.co/index.php/entrecienciaeingenieria/article/view/637. Consultado el 04 de febrero de 2022.

- Uusitupa, H. M., Rasinkangas, P., Lehtinen, M. J., Mäkelä, S. M., Airaksinen, K., Anglenius, H., Maukonen, J. (2020). Bifidobacterium animalis subsp. lactis 420 for Metabolic Health: Review of the Research. Nutrients, 12(4), 892. https://doi.org/10.3390/nu12040892
- Uzcátegui U, Ofelia. (2016). Microbioma humano. Revista de Obstetricia y Ginecología de Venezuela, 76(1), 1-3. Recuperado en 05 de septiembre de 2021, de http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0048-77322016000100001&lng=es&tlng=es.
- Vargas, M. C. A., & Simsek, S. (2021). Clean Label in Bread. Foods, 10(9), 2054. Thierry Aussenac (Ed.). https://doi.org/10.3390/foods10092054
- Vinderola, C. G. (2011). Bacterias probióticas en productos lácteos fermentados. Academia Nacional de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales; Anales de la Academia Nacional de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales de Buenos Aires; 63; 12-2011; 55-65. https://ri.conicet.gov.ar/handle/11336/100774. Consultado el 25 de noviembre de 2021
- Wacher Rodarte C., (2014) La biotecnología alimentaria antigua: los alimentos fermentados, Revista digital universitaria, 15 64. https://biblat.unam.mx/hevila/Revistadigitaluniversitaria/2014/vol15/no8/art64.pdf. Consultado el 17 de abril de 2021.
- Wischmeyer, P. E., Tang, H., Ren, Y., Bohannon, L., Ramirez, Z. E., Andermann, T. M., ... & Sung, A. D. (2022). Daily Lactobacillus Probiotic versus Placebo in COVID-19-Exposed Household Contacts (PROTECT-EHC): A Randomized Clinical Trial. medRxiv. https://doi.org/10.1101/2022.01.04.21268275

ANEXOS

6. Anexos

6.1 Anexo A. Especificaciones del cultivo Vega™ nu-trish® BY-101

CHR HANSEN
Improving food & health

Vega™ nu-trish® BY-101

Product Information
Version: 7 PI EU EN 04-12-2021

Description
Thermophilic lactic acid culture.
Contains the documented probiotic strain BB-12®. The strain has a long history of safe use and substantial clinical documentation on possible health benefits is available upon request. Likewise are certificates of identification and certificates of safety and origin.

BB-12® is a registered trademark of Chr. Hansen.

This culture has been produced without the use of dairy derived ingredients in any part of the production steps. The culture is manufactured in an environment where dairy ingredients are handled. However, the process equipment is cleaned according to our GMP standard before production of this culture.

Culture composition:
Bifidobacterium
Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus
Streptococcus thermophilus

Material No:	716885	**Color:**	Off-white to slightly reddish or brown
Size	10X500 U	**Format:**	F-DVS
Type	Bag(s) in box	**Form:**	Frozen pellets

Storage and handling
< -45 °C / < -49 °F

Shelf life
At least 12 months from date of manufacture when stored according to recommendations.

Application

Usage
The culture is used in the production of drinking, stirred or set fermented products made from dairy alternatives. The dairy alternative base should have a pH ≤7 to ensure sufficient activity of the culture and it should contain enough fermentable sugar to reach pH ≤ 4.5 in the final product. Fermentation temperature should be 38°C - 43 °C. The final product should be stored at ≤8 °C.

Recommended inoculation rate

Amount of dairy alternative base to be inoculated	2,500 l/ 660 gal	5,000 l/ 1,300 gal	10,000 l/ 2,600 gal
Amount of DVS culture	500 U	1000 U	2000 U

The information contained herein is to the best of our knowledge and belief, true and accurate and the product(s) mentioned herein do(es) not infringe the intellectual property rights of any third party. The product(s) may be covered by pending or issued patents, registered or unregistered trademarks, or similar intellectual property rights. All rights reserved.

CHR HANSEN
Improving food & health

Vega™ nu-trish® BY-101

Product Information
Version: 7 PI EU EN 04-12-2021

Designed for optimal performance, the composition and recommended inoculation rate for this culture were carefully developed by use of unique microbial strains, advanced biotechnological principles and more than 140 years of accumulated experience from the dairy industry.

Warning: Applying lower than recommended inoculation rate may cause undesired variation in product quality, lower production efficiency, product yield losses, potential fermentation failures and an increased risk of bacteriophage attacks.

Directions for Use
Remove cultures from the freezer just prior to use. Do not thaw. Disinfect the package prior to opening. Open the package and pour the frozen pellets directly into the pasteurized product. Agitate the mixture slowly for 10-15 minutes to distribute the culture evenly. The recommended incubation temperature is 35-45°C (95-113°F). For more information on specific applications please refer to our technical brochures and suggested recipes.

Analytical Methods
References and analytical methods are available upon request.

Dietary information

Kosher:	Kosher Dairy Equip. Excl. Passover
Halal:	Certified
VLOG:	Conform

Legislation
Chr. Hansen's cultures comply with the general requirements on food safety laid down in Regulation 178/2002/EC. Lactic acid bacteria are generally recognized as safe and can be used in food, however, for specific applications we recommend to consult national legislation.

The product is intended for use in food.

Food Safety
No guarantee of food safety is implied or inferred should this product be used in applications other than those stated in the Usage section. Should you wish to use this product in another application, please contact your Chr. Hansen representative for assistance.

Labeling
Suggested labeling "lactic acid culture" or "starter culture", however, as legislation may vary, please consult national legislation.

Trademarks

Product names, names of concepts, logos, brands and other trademarks referred to in this document, whether or not appearing in large print, bold or with the ® or TM symbol are the property of Chr. Hansen A/S or an affiliate thereof or used under license. Trademarks appearing in this document may not be registered in your country, even if they are marked with an ®.

Technical support

Chr. Hansen's Application and Product Development Laboratories and personnel are available if you need further information.

---

www.chr-hansen.com Page: 2 (3)

The information contained herein is to the best of our knowledge and belief, true and accurate and the product(s) mentioned herein do(es) not infringe the intellectual property rights of any third party. The product(s) may be covered by pending or issued patents, registered or unregistered trademarks, or similar intellectual property rights. All rights reserved.

CHR HANSEN
Improving food & health

Vega™ nu-trish® BY-101

Product Information
Version: 7 PI EU EN 04-12-2021

GMO Information

In accordance with the below mentioned legislation of the European Union we can inform that:

Vega™ nu-trish® BY-101 is not a GM (genetically modified) food *.
It does not contain or consist of GMOs and is not produced from GMOs in accordance with Regulation 1829/2003* on GM food and feed.
As such GM labelling is not required for Vega™ nu-trish® BY-101 or the food it is used to produce**. Moreover, the product does not contain any GM labelled raw materials.

** Regulation (EC) No 1829/2003 of the European Parliament and of the Council of 22 September 2003 on genetically modified food and feed.*
*** Regulation (EC) No 1830/2003 of the European Parliament and of the Council of 22 September 2003 concerning the traceability and labelling of genetically modified organisms and the traceability of food and feed products produced from genetically modified organisms and amending Directive 2001/18/EC.*

Please note the information presented here does not imply that the product can either be used in, or is externally certified to be used in, food or feed labelled as 'organic' or 'GMO free'. Requirements to make these claims vary per country, please contact us for more information.

Allergen Information

List of common allergens in accordance with the US Food Allergen Labeling and Consumer Protection Act of 2004 (FALCPA) and EU Regulation 1169/2011/EC with later amendments	Present as an ingredient in the product
Cereals containing gluten* and products thereof	No
Crustaceans and products thereof	No
Eggs and products thereof	No
Fish and products thereof	No
Peanuts and products thereof	No
Soybeans and products thereof	No
Milk and products thereof (including lactose)	No
Nuts* and products thereof	No
List of allergens in accordance with EU Regulation 1169/2011/EC only	
Celery and products thereof	No
Mustard and products thereof	No
Sesame seeds and products thereof	No
Lupine and products thereof	No
Mollusks and products thereof	No
Sulphur dioxide and sulphites (added) at concentrations of more than 10 mg/kg or 10 mg/litre expressed as SO_2	No

* *Please consult the EU Regulation 1169/2011 Annex II for a legal definition of common allergens, see European Union law at: www.eur-lex.europa.eu*

www.chr-hansen.com Page: 3 (3)

The information contained herein is to the best of our knowledge and belief, true and accurate and the product(s) mentioned herein do(es) not infringe the intellectual property rights of any third party. The product(s) may be covered by pending or issued patents, registered or unregistered trademarks, or similar intellectual property rights. All rights reserved.

6.2 Anexo B. Especificaciones del cultivo Vega™ nu-trish® GY-101

CHR HANSEN
Improving food & health

Vega™ nu-trish® GY-101

Product Information
Version: 1 PI EU EN 03-10-2021

Description

Thermophilic lactic acid culture.
Contains the documented probiotic strain LGG ®. The strain has a long history of safe use and substantial clinical documentation on possible health benefits is available upon request. Likewise are certificates of identification and certificates of safety and origin.
LGG ® is a registered trademark of Chr. Hansen.

This culture has been produced without the use of dairy derived ingredients in any part of the production steps. The culture is manufactured in an environment where dairy ingredients are handled. However, the process equipment is cleaned according to our GMP standard before production of this culture.

Culture composition:
Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus
Lactobacillus rhamnosus
Streptococcus thermophilus

Material No:	722783	**Color:**	Off-white to slightly reddish or brown
Size	10X500 U	**Format:**	F-DVS
Type	Bag(s) in box	**Form:**	Frozen pellets

Storage and handling

< -45 °C / < -49 °F

Shelf life

At least 12 months from date of manufacture when stored according to recommendations.

Application

Usage
The culture is used in the production of drinking, stirred or set fermented products made from dairy alternatives. The dairy alternative base should have a pH ≤7 to ensure sufficient activity of the culture and it should contain enough fermentable sugar to reach pH ≤ 4.5 in the final product. Fermentation temperature should be 38°C - 43 °C. The final product should be stored at ≤8 °C.

Recommended inoculation rate

Amount of dairy alternative base to be inoculated	2,500 l/ 660 gal	5,000 l/ 1,300 gal	10,000 l/ 2,600 gal
Amount of DVS culture	500 U	1000 U	2000 U

www.chr-hansen.com Page: 1 (3)

The information contained herein is to the best of our knowledge and belief, true and accurate and the product(s) mentioned herein do(es) not infringe the intellectual property rights of any third party. The product(s) may be covered by pending or issued patents, registered or unregistered trademarks, or similar intellectual property rights. All rights reserved.

CHR HANSEN
Improving food & health

Vega™ nu-trish® GY-101

Product Information
Version: 1 PI EU EN 03-10-2021

Designed for optimal performance, the composition and recommended inoculation rate for this culture were carefully developed by use of unique microbial strains, advanced biotechnological principles and more than 140 years of accumulated experience from the dairy industry.

Warning: Applying lower than recommended inoculation rate may cause undesired variation in product quality, lower production efficiency, product yield losses, potential fermentation failures and an increased risk of bacteriophage attacks.

Directions for Use
Remove cultures from the freezer just prior to use. Do not thaw. Disinfect the package prior to opening. Open the package and pour the frozen pellets directly into the pasteurized product. Agitate the mixture slowly for 10-15 minutes to distribute the culture evenly. The recommended incubation temperature is 35-45°C (95-113°F). For more information on specific applications please refer to our technical brochures and suggested recipes.

Additional usage information
Under conditions of accelerated storage temperatures and high levels of malic acid, facultative heterofermentative bacteria like *L. rhamnosus* are capable of producing gas. Furthermore, this species is capable of degrading some synthetic food colors (azo dyes) which might cause decolorization of the product, especially at elevated storage temperatures.

Please consult your Chr. Hansen representative for the specific intention of using this culture in products with added fruit preparations containing high levels of malic acid like sour cherry and rhubarb and/or in products added synthetic food color (azo dye).

Technical Data

Analytical Methods
References and analytical methods are available upon request.

Dietary information

Kosher:	Kosher Dairy Equip. Excl. Passover
Halal:	Certified
VLOG:	Conform

Legislation
Chr. Hansen's cultures comply with the general requirements on food safety laid down in Regulation 178/2002/EC. Lactic acid bacteria are generally recognized as safe and can be used in food, however, for specific applications we recommend to consult national legislation.

The product is intended for use in food.

Food Safety
No guarantee of food safety is implied or inferred should this product be used in applications other than those stated in the Usage section. Should you wish to use this product in another application, please contact your Chr. Hansen representative for assistance.

Labeling
Suggested labeling "lactic acid culture" or "starter culture", however, as legislation may vary, please consult national legislation.

www.chr-hansen.com Page: 2 (3)

The information contained herein is to the best of our knowledge and belief, true and accurate and the product(s) mentioned herein do(es) not infringe the intellectual property rights of any third party. The product(s) may be covered by pending or issued patents, registered or unregistered trademarks, or similar intellectual property rights. All rights reserved.

CHR. HANSEN
Improving food & health

Vega™ nu-trish® GY-101

Product Information
Version: 1 PI EU EN 03-10-2021

Trademarks

Product names, names of concepts, logos, brands and other trademarks referred to in this document, whether or not appearing in large print, bold or with the ® or TM symbol are the property of Chr. Hansen A/S or an affiliate thereof or used under license. Trademarks appearing in this document may not be registered in your country, even if they are marked with an ®.

Technical support

Chr. Hansen's Application and Product Development Laboratories and personnel are available if you need further information.

GMO Information

In accordance with the below mentioned legislation of the European Union we can inform that:

Vega™ nu-trish® GY-101 is not a GM (genetically modified) food *.
It does not contain or consist of GMOs and is not produced from GMOs in accordance with Regulation 1829/2003* on GM food and feed.
As such GM labelling is not required for Vega™ nu-trish® GY-101 or the food it is used to produce**. Moreover, the product does not contain any GM labelled raw materials.

** Regulation (EC) No 1829/2003 of the European Parliament and of the Council of 22 September 2003 on genetically modified food and feed.*
*** Regulation (EC) No 1830/2003 of the European Parliament and of the Council of 22 September 2003 concerning the traceability and labelling of genetically modified organisms and the traceability of food and feed products produced from genetically modified organisms and amending Directive 2001/18/EC.*

Please note the information presented here does not imply that the product can either be used in, or is externally certified to be used in, food or feed labelled as 'organic' or 'GMO free'. Requirements to make these claims vary per country, please contact us for more information.

Allergen Information

List of common allergens in accordance with the US Food Allergen Labeling and Consumer Protection Act of 2004 (FALCPA) and EU Regulation 1169/2011/EC with later amendments	Present as an ingredient in the product
Cereals containing gluten* and products thereof	No
Crustaceans and products thereof	No
Eggs and products thereof	No
Fish and products thereof	No
Peanuts and products thereof	No
Soybeans and products thereof	No
Milk and products thereof (including lactose)	No
Nuts* and products thereof	No
List of allergens in accordance with EU Regulation 1169/2011/EC only	
Celery and products thereof	No
Mustard and products thereof	No
Sesame seeds and products thereof	No
Lupine and products thereof	No
Mollusks and products thereof	No
Sulphur dioxide and sulphites (added) at concentrations of more than 10 mg/kg or 10 mg/litre expressed as SO_2	No

* *Please consult the EU Regulation 1169/2011 Annex II for a legal definition of common allergens, see European Union law at: www.eur-lex.europa.eu*

www.chr-hansen.com Page: 3 (3)

The information contained herein is to the best of our knowledge and belief, true and accurate and the product(s) mentioned herein do(es) not infringe the intellectual property rights of any third party. The product(s) may be covered by pending or issued patents, registered or unregistered trademarks, or similar intellectual property rights. All rights reserved.

6.3 Anexo C Método de recuento microbiológico para *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB12®

CHR. HANSEN

Enumeration of Bifidobacteria in fermented milk products - Guideline

Technical bulletin P-11

This guideline describes media and methods for counting of Chr. Hansen's Bifidobacterium BB-12 as single strain and in different culture combinations in fermented milk. The method is based on Draft for International standard ISO/WD …. I IDF 220 but is adapted for counting of Bifidobacterium BB-12.
This guideline can be used in combination with P-9 Guideline for sample preparation, dilution and plating of microorganisms in fermented milk products.

Bifidobacteria as single culture

Medium	MRS agar with addition of 5 ml of CyHCl stock solution* pr. liter of medium
Technique	Pour plate Anaerobic incubation, 37°C (99°F), 3 days

Bifidobacteria in products fermented with AB, BC, BY, ABC, ABT, ABY, BCT culture blends or with B mixed with mesophilic lactic acid bacteria.

Medium	MRS agar with addition of 5 ml CyHCl stock solution* and 2.5 ml Mupirocin stock solution** pr. liter of medium.
Technique	Pour plate Anaerobic incubation, 37°C (99°F), 3 days
Comments	**All** colonies are counted as bifidobacteria Mupirocine inhibit most lactic acid bacteria.

Generally it is always recommended to verify some of the colonies by microscopy to ensure that they represent the correct bacteria.

Abbreviations:

A: *Lactobacillus acidophilus*
B: Bifidobacteria
C: *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*
T: *Streptococcus thermophilus*
Y: Yoghurt culture with *Lactobacillus bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus*

P-11 Bifidobacteria enumeration mupirocin nov2007.doc/1:2

Chr. Hansen A/S, 10-12 Bøge Allé, DK-2970 Hørsholm. Tel: +45 45 747474. Fax: +45 45 748813. Web: chr-hansen.com

Preparation of media and stock solutions

Preparation of MRS agar:

Suspend 70 gram of MRS Agar powder (Difco 288210) in 1000 ml of distilled water. Heat to boiling point with frequent agitation until a complete solution is obtained. Distribute the medium into bottles and sterilise by autoclaving at 121˚C (250˚F) for 15 min.

pH after autoclaving: 6.5 ± 0.2 at 25 ˚C

The prepared MRS Agar may be stored dark for 3 months at 5 ± 3˚C.
Poured plates may be stored dark for 10 days at 5 ± 3˚C.

***Preparation of cystein hydrochloride (CyHCl) stock solution**

Cysteine hydrochloride	10 g	Merck No 2839
Distilled water to make	100 ml	

Sterilise by autoclaving
The solution should be stored at room temperature. Shelf life is maximum 2 month and solution should be discarded if precipitated.

****Preparation of mupirocin stock solution:**

Li-Mupirocin	100 mg	(www.lgcpromochem.com, art.no: EPM3806000)
Distilled water to make	10 ml	

Sterilize by filtration (0.45 µm)

If solution is not used immediately, distribute into small sterile cryotubes and keep the tubes at -20 ˚C.

Note: When adding different solutions to the agar, please note that the agar must be used immediately after preparation.

References:

DRAFT ISO/WD... I IDF 220 2007-01-23: Milk products - Enumeration of presumptive bifidobacteria - Colony count technique at 37 ˚C

The information contained herein is to our knowledge true and correct and presented in good faith. However, no warranty, guarantee or freedom from patent infringement is implied or inferred. This information is offered solely for your consideration and verification.

P-11 Bifidobacteria enumeration mupirocin nov2007.doc/2:2

6.4 Anexo D. Método de recuento microbiológico para *Lactobacillus rhamnosus* GG, LGG®

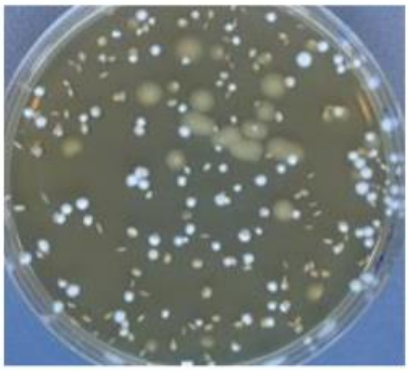
This guideline describes media and method for counting Chr. Hansen's *Lactobacillus rhamnosus*, LGG® as pure culture and in different culture combinations in fermented milk products.

Lactobacillus rhamnosus, LGG® is a gram positive, catalase negative rod, generally in chains. The LGG® strain does not ferment lactose and it is resistant to vancomycin.

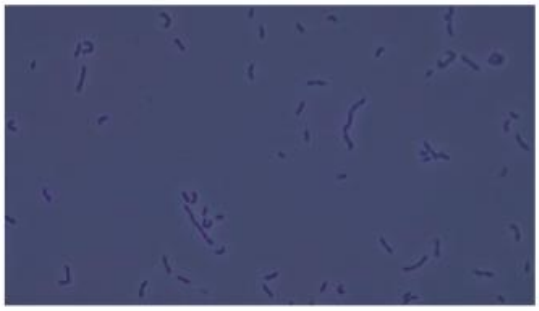
This guideline can be used in combination with Chr. Hansen's Guideline for sample dilution, plating and counting of lactic acid bacteria in fermented milk products.

Media and method:

***Lactobacillus rhamnosus*, LGG® as single culture**	
Medium	MRS agar
Technique	Pour or spread plate Anaerobic incubation, 37°C (99°F), 3 days
Comment	When grown on a solid medium under the conditions specified in this method *Lactobacillus rhamnosus*, LGG® forms smooth, white colonies with sharp edges. Colonies are round or oval with a diameter of 2 mm to 4 mm (depending on the number of colonies). All colonies are counted as the LGG® strain



MRS pour plate of with *L. rhamnosus*, LGG® from yogurt



Microscopy of *L. rhamnosus*, LGG® from yogurt. The rods are generally in chains. This is even more evident when microscopy is made on DVS culture.

***Lactobacillus rhamnosus*, LGG® in fermented milk products with *S. thermophilus, L. bulgaricus, Bifidobacteria, L. acidophilus* or in mixture with mesophilic O or LD type cultures**

Medium	MRS agar with 50 ppm vancomycin (addition of 0.5 ml vancomycin solution* per liter of medium) Vancomycin can be added before autoclaving or as a sterile filtrate to the agar.
Technique	Pour or spread plate Anaerobic incubation, 37°C (99°F), 3 days
Comment	Vancomycin inhibits most lactic acid bacteria but not other *L.rhamnosus* strains or *L.paracasei, L.fermentum, L.reuteri* or *L.plantarum* strains. All colonies are counted as *Lactobacillus rhamnosus*, LGG® It is generally recommended to verify some of the colonies by microscopy to ensure that they represent the correct bacteria.

Note:
Due to the large variety of fermented milks, this method may not be appropriate in every detail for certain products. All other vancomycin resistant lactic acid bacteria might grow on MRS with vancomycin (MRS-V) as well.

Lactobacillus rhamnosus, LGG® can therefore not be counted selectively on MRS-V when used in fermented milk products with other *Lactobacillus rhamnosus* strains, *Lactobacillus paracasei, Lactobacillus fermentum, Lactobacillus*

reuteri or Lactobacillus plantarum .
In case the identity of colonies is uncertain, pure cultures can be made from the colonies on MRS or MRS-V.

Lactobacillus rhamnosus, LGG® is lactose negative which enables it to be distinguished from other cultures which are lactose positive.

To test lactose fermentation ability, inoculate MRS-Lactose with Bromocresol purple (MRSL-BCP) agar with a pure colony and incubate at 37± 1°C for 1-2 days in anaerobic conditions. *Lactobacillus rhamnosus,* LGG® does not ferment lactose, so the agar does not turn yellow. Lactose fermenting isolates will turn the agar yellow. Use pure culture of *Lactobacillus rhamnosus*, LGG® and a lactose positive culture as references.

Preparation of media and stock solutions

Preparation of MRS agar:	Suspend 70 grams of MRS Agar powder (Difco: VWR 288210) in 1000 ml of distilled water. Heat to boiling point with frequent agitation until a complete solution is obtained. Distribute the medium into bottles and sterilize by autoclaving at 121°C (250°F) for 15 min. pH after autoclaving: 6.5 ± 0.2 at 25 °C The prepared MRS Agar may be stored in dark conditions for 3 months at 5 ± 3°C. Poured plates may be stored in dark conditions for 10 days at 5 ± 3°C.	
*Vancomycin solution:	Vancomycin hydrochloride ready made solution (100mg/ml) (Sigma-Aldrich: SBR00001) Thaw the solution and distribute into small cryo tubes in portions of 0.5-1.0 ml. Freeze again and keep the tubes at -20 °C. The frozen solution may be stored for 6 weeks. Sterilize by filtration (0.22 µm)	
Preparation of sugar free MRS agar: (For MRSL-BCP plate to test the lactose fermentation)	Peptone (tryptic digest of casein)	10.0 g
	Meat extract (Lab Lemco, Oxoid)	8.0 g
	Yeast extract	5.0 g
	Tween 80	1.0 ml
	Dipotassium hydrogen orthophosphate K2HPO4	2.0 g
	Sodium acetate trihydrate CH3COONa x 3H2O	5.0 g
	Triammonium citrate ((NH4)3C6H5O7)	2.0 g
	Magnesium sulfate heptahydrate MgSO4 x 7H2O*	0.2 g
	Manganese sulfate tetrahydrate MnSO4 x 4H2O*	0.05 g
	Agar	9.0-18.0 g
	Water	1000 ml
	*Dissolve separately pH 7.2-7.3 after autoclaving Autoclave at 121 ± 1 °C for 15 min.	
Lactose solution	Lactose	10.0 g
	Water up to	100 ml
	Dissolve the lactose in the water, sterilize at 112 ±1°C for 15 min	

Preparation of media and stock solutions:

Bromocresol purple solution	Bromocresol purple Ethanol	500.0 mg 100 ml
	Dissolve the bromocresol purple in the ethanol. Do not use flame.	
Complete MRSL-BCP medium	Sugar free MRS Bromocresol purple solution 10 % Lactose	150 ml 1.5 ml 7.5 ml
	Pour about 15 ml of the freshly prepared complete medium into Petri dishes . Allow to solidify. The agar plates may be stored refrigerated for up to 3 months. Use spot test to test the lactose fermentation.	

6.5 Anexo E: Seguimientos bases de coco y almendra

En la Tabla XXII se detalla los resultados obtenidos en los seguimientos de las bases de coco y almendra.

TABLA XXII: resultados obtenidos en las bases de coco y almendra durante la investigación.

Post-Acidificación a 6°C							
Cultivo	0	6	14	18	28	35	45
Coco BY-101	4,71	4,67	4,68	4,69	4,71	4,71	4,7
Coco GY-101	4,6	4,46	4,48	4,38	4,35	4,43	4,28
Almendra BY-101	4,65	4,6	4,61	4,64	4,63	4,65	4,64
Almendra GY-101	4,72	4,48	4,5	4,53	4,53	4,51	4,52

Post-Acidificación a 13°C							
Cultivo	0	6	14	18	28	35	45
Coco BY-101	4,71	4,52	3,98	3,77	3,65	3,61	3,57
Coco GY-101	4,6	3,89	3,7	3,62	3,54	3,51	3,48
Almendra BY-101	4,65	4,39	4,4	4,42	4,4	4,44	4,43
Almendra GY-101	4,72	4,36	4,36	4,37	4,32	4,48	4,32

Post-Acidificación a 25°C			
Cultivo	0	6	14
Coco BY-101	4,71	3,88	3,74
Coco GY-101	4,6	3,7	3,4
Almendra BY-101	4,65	4,18	4,12
Almendra GY-101	4,72	4,22	3,99

Recuento de LGG y Bifidobacterias a 6°C				
Cultivo	0	15	30	45
Coco BY-101	1,91E+06	6,00E+05	5,00E+04	3,00E+04
Coco GY-101	8,40E+07	2,34E+07	9,70E+06	2,60E+07
Almendra BY-101	6,40E+07	2,74E+07	2,29E+07	5,00E+07
Almendra GY-101	4,50E+07	1,63E+07	2,90E+07	4,80E+07

Esfuerzo de corte al D+7					
Cultivo	Tasa de corte 0,3	Tasa de corte 30	Tasa de corte 60	Tasa de corte 135	Tasa de corte 300
Coco BY-101	5,853	41,63	56,32	77,1	101,8
Coco GY-101	11,28	53,26	71,25	101,1	141,1
Almendra BY-101	14,8	50,68	56,12	64,06	79,21
Almendra GY-101	24,81	72,79	82,16	97,48	118,7

Esfuerzo de corte al D+14					
Cultivo	Tasa de corte 0,3	Tasa de corte 30	Tasa de corte 60	Tasa de corte 135	Tasa de corte 300
Coco BY-101	5,452	40,66	53,5	71,09	89,98
Coco GY-101	12,53	57,6	74,55	103,7	141,8
Almendra BY-101	17,17	52,26	57,02	61,44	73,74
Almendra GY-101	27,16	73,66	82,06	96,19	115,19

6.6 Anexo F: Seguimientos bases de soja y quinoa

En la Tabla XXIII se detalla los resultados obtenidos en los seguimientos de las bases de soja y quínoa

TABLA XXIII: resultados obtenidos en las bases de soja y quínoa durante la investigación.

Post-Acidificación a 6°C							
Cultivo	0	6	14	18	28	35	45
Soja BY-101	4,81	4,6	4,56	4,55	4,6	4,46	4,52
Soja GY-101	4,77	4,56		4,5		4,5	4,45
Quínoa BY-101	5,08	4,39	4,77	4,75	4,79	4,73	4,7
Quínoa GY-101	4,61	4,18	4,01	3,92	3,98	3,88	3,81

Post-Acidificación a 13°C							
Cultivo	0	6	14	18	28	35	45
Soja BY-101	4,81	4,33	4,3	4,31	4,37	4,36	4,3
Soja GY-101	4,77	4,09	3,89	3,69	3,77	3,71	3,58
Quínoa BY-101	5,08	4,5	4,4	4,05	3,98	3,81	3,64
Quínoa GY-101	4,61	3,79	3,65	3,55	3,61	3,51	3,4

Post-Acidificación a 25°C			
Cultivo	0	6	14
Soja BY-101	4,81	4,07	4,09
Soja GY-101	4,77	3,55	3,54
Quínoa BY-101	5,08	3,44	3,42
Quínoa GY-101	4,61	3,38	3,39

Recuento de LGG y Bifidobacterias a 6°C					
Cultivo	0	15	30	45	55
Soja BY-101	2,18E+07	8,50E+06	1,39E+07	-	6,50E+06
Soja GY-101	5,40E+07	2,20E+07	1,48E+08	1,38E+07	-
Quínoa BY-101	3,90E+07	2,20E+07	1,84E+07	-	-
Quínoa GY-101	1,73E+08	8,70E+07	5,60E+07	3,68E+07	-

Esfuerzo de corte al D+7					
Cultivo	Tasa de corte 0,3	Tasa de corte 30	Tasa de corte 60	Tasa de corte 135	Tasa de corte 300
Soja BY-101	0,142	0,7624	1,049	1,611	2,677
Soja GY-101	0,08865	0,713	0,981	1,517	2,559
Quínoa BY-101	0,043	0,251	0,3757	0,6569	1,271
Quínoa GY-101	0,083	0,3972	0,5485	0,8701	1,557

Esfuerzo de corte al D+14					
Cultivo	Tasa de corte 0,3	Tasa de corte 30	Tasa de corte 60	Tasa de corte 135	Tasa de corte 300
Soja BY-101	0,06524	0,5169	0,7385	1,179	2,036
Soja GY-101	0,08494	0,5881	0,8263	1,28	2,149
Quínoa BY-101	0,04081	0,2592	0,3867	0,6758	1,288
Quínoa GY-101	0,08903	0,4364	0,6169	0,9845	1,716

6.7 Anexo G: Resultados del análisis sensorial

Las Tablas XXIV, XXV, XXVI y XXVII fueron elaboradas con la devolución del análisis sensorial de cada uno de los panelistas que participaron en la degustación de los prototipos terminados. En ellas se detallan los atributos a analizar, la calificación otorgada a cada uno de los parámetros evaluados por cada panelista, la suma total de la calificación de cada atributo, y el promedio a partir del cual se elaboró posteriormente el gráfico que resume el presente análisis.

Almendra y coco

TABLA XXIV: datos recolectados del análisis sensorial de las bases de coco y almendra.

Código	Atributos	Panelista 1	Panelista 2	Panelista 3	Panelista 4	Panelista 5	Panelista 6	Panelista 7	Panelista 8	Suma	Promedio
457	Cuchareabilidad	5	3	2	1	1	3	2	3	20	3
	Grumosidad	2	3	2	0	4	4	3	0	18	2
	Mouth coating	4	3	1	2	3	4	3	4	24	3
	Mouth thickness	4	2	3	1	3	4	3	1	21	3
	Cremosidad	4	1	4	2	5	2	1	3	22	3
	Sabor específico	4	1	4	1	4	3	4	5	26	3
	Acidez	3	3	0	1	2	2	2	2	15	2
	Dulzor	4	2	4	3	4	3	4	3	27	3
	Sabor a yogurt	3	1	1	0	3	2	1	4	15	2
901	Cuchareabilidad	5	4	4	3	4	4	3	4	31	4
	Grumosidad	1	1	0	1	4	3	1	0	11	1
	Mouth coating	5	5	2	3	4	5	3	4	31	4
	Mouth thickness	5	4	4	3	4	4	3	1	28	4
	Cremosidad	4	3	4	3	4	3	2	4	27	3
	Sabor específico	4	3	4	3	2	4	4	5	29	4
	Acidez	4	1	2	2	3	3	3	3	21	3
	Dulzor	3	2	3	2	3	3	4	2	22	3
	Sabor a yogurt	2	3	3	1	3	2	2	5	21	3
891	Cuchareabilidad	4	4	5	3	5	4	4	4	33	4
	Grumosidad	4	3	1	1	3	3	2	1	18	2
	Mouth coating	3	2	0	3	4	2	2	4	20	3
	Mouth thickness	2	3	2	3	4	2	2	1	19	2
	Cremosidad	4	1	2	3	3	1	1	2	17	2
	Sabor específico	3	3	5	3	4	4	3	2	27	3
	Acidez	3	4	1	2	3	3	2	1	19	2
	Dulzor	3	2	2	3	3	4	5	3	25	3
	Sabor a yogurt	2	3	0	0	4	3	2	2	16	2
368	Cuchareabilidad	5	5	5	3	5	5	4	5	37	5
	Grumosidad	2	1	0	1	5	1	1	0	11	1
	Mouth coating	4	4	1	2	4	3	3	4	25	3
	Mouth thickness	3	4	4	2	4	3	3	1	24	3
	Cremosidad	4	2	3	3	5	2	1	5	25	3
	Sabor específico	3	3	4	2	1	2	3	3	21	3
	Acidez	3	1	3	3	3	2	2	1	18	2
	Dulzor	3	3	3	2	3	4	4	3	25	3
	Sabor a yogurt	2	3	2	0	2	3	2	3	17	2

Con los promedios extraídos de la tabla anterior, se elaboró el siguiente cuadro de manera de poder comparar los resultados obtenidos de esta evaluación.

TABLA XXV: comparación de los resultados obtenidos del análisis sensorial de las bases de coco y almendra.

Código	Nombre de la muestra	Cuchareabilidad	Grumosidad	Mouth coating	Mouth thickness	Cremosidad	Sabor especifico	Acidez	Dulzor	Sabor a Yogurt
457	Base Coco BY-101	3	2	3	3	3	3	2	3	2
901	Base Coco GY-101	4	1	4	4	3	4	3	3	3
891	Base Almendras BY-101	4	2	3	2	2	3	2	3	2
368	Base Almendras GY-101	5	1	3	3	3	3	2	3	2

Soja y quinoa

TABLA XXVI: datos recolectados del análisis sensorial de las bases de coco y almendra.

Código	Atributos	Panelista 1	Panelista 2	Panelista 3	Panelista 4	Suma	Promedio
201	Sinéresis	5	5	4	4	18	5
	Mouth coating	0	1	2	1	4	1
	Sabor especifico	4	3	3	2	12	3
	Acidez	3	3	2	2	10	3
	Dulzor	2	1	1	3	7	2
	Sabor a yogur	1	1	1	1	4	1
	Filancia	0	1	1	0	2	1
195	Sinéresis	5	4	5	3	17	4
	Mouth coating	1	1	2	1	5	1
	Sabor especifico	3	4	2	3	12	3
	Acidez	5	4	5	4	18	5
	Dulzor	1	1	1	1	4	1
	Sabor a yogur	2	1	0	1	4	1
	Filancia	1	1	1	0	3	1
717	Sinéresis	5	3	5	3	16	4
	Mouth coating	1	1	2	1	5	1
	Sabor especifico	4	1	1	1	7	2
	Acidez	4	3	4	1	12	3
	Dulzor	1	2	3	1	7	2
	Sabor a yogur	2	1	1	1	5	1
	Filancia	1	0	2	1	4	1
478	Sinéresis	5	3	4	3	15	4
	Mouth coating	1	1	3	1	6	2
	Sabor especifico	3	1	2	1	7	2
	Acidez	4	3	5	1	13	3
	Dulzor	1	1	2	1	5	1
	Sabor a yogur	2	1	2	1	6	2
	Filancia	0	0	1	1	2	1

TABLA XXVII: comparación de los resultados obtenidos del análisis sensorial de las bases de soja y quínoa.

Código	Nombre de la muestra	Sinéresis	Mouth coating	Sabor especifico	Acidez	Dulzor	Sabor a yogur	Filancia
201	Base Quinoa BY-101	5	1	3	3	2	1	1
195	Base Quinoa GY-101	4	1	3	5	1	1	1
717	Base Soja BY-101	4	1	2	3	2	1	1
478	Base Soja GY-101	4	2	3	3	1	2	1