

EVALUACIÓN DE LA VIABILIDAD DE CRECIMIENTO DE LA CEPA NATIVA *Lactobacillus plantarum* LPBM10 Y LA CEPA COMERCIAL *Lactobacillus casei* ATCC 393 EN PULPA DE UCHUVA Y EN SOLUCIÓN ISOTÓNICA DE GLUCOSA

EVALUATION OF THE VIABILITY OF GROWTH OF THE NATIVE STRAIN *Lactobacillus plantarum* LPBM10 AND COMMERCIAL STRAIN *Lactobacillus casei* ATCC393 IN CAPE GOOSEBERRY PULP AND GLUCOSE ISOTONIC SOLUTION

Zaira T. MARIN A.^{1*}, Misael CORTÉS R.¹, Olga I. MONTOYA C.²

Recibido: Enero 26 de 2009 Aceptado: Junio 13 de 2009

RESUMEN

El objetivo de este trabajo es evaluar la supervivencia de las cepas *Lactobacillus plantarum* LPBM10 y *Lactobacillus casei* ATCC 393, en los sustratos pulpa de uchuva y solución de glucosa (14% p/p). Se inocula una concentración 0.5 (escala McFarland) y se almacena a 4°C durante 15 días. Los conteos se realizan a partir de la dilución 10⁸ en agar MRS, se incuban a 37°C durante 72 horas en condiciones microaerófilas. A los 15 días se obtienen conteos en pulpa y solución de glucosa, con promedios para *L. plantarum* de 3.23 ± 3.35 x 10⁹ y 1.64 ± 1.57 x 10⁹ UFC/mL, y para *L. casei* de 5.40 ± 2.36 x 10⁸ y 7.34 ± 7.88 x 10⁸ UFC/mL, respectivamente. Los resultados indican un buen comportamiento de ambas cepas en los sustratos, con niveles superiores a 10⁶, criterio considerado en lácteos para definir un alimento con probióticos. El desarrollo de estos alimentos o sustratos representan alternativas para consumo directo o en soluciones de impregnación, permitiendo de este modo el desarrollo de nuevos productos.

Palabras clave: alimentos funcionales, probióticos, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei*, uchuva.

ABSTRACT

The aim of this work is to evaluate the survival of the strains *Lactobacillus plantarum* LPBM10 and *Lactobacillus casei* ATCC 393 in substrates of cape gooseberry pulp and glucose isotonic solution (14% w/w). A concentration of 0.5 is inoculated (McFarland scale) and it is stored at 4°C during 15 days. The counts were made from the dilution 10⁸ in MRS agar, incubated at 37°C for 72 hours in microaerobic conditions. After 15 days counts in pulp and glucose solution are obtained, with averages for *L. plantarum* 3.23 ± 3.35 x 10⁹ and 1.64 ± 1.57 x 10⁹ CFU/mL and *L. casei* of 5.40 ± 2.36 x 10⁸ and 7.34 ± 7.88 x 10⁸ CFU/mL, respectively. The results show a good performance of both strains in the substrates, with levels above 10⁶, approach considered in lacteous to define a food with probiotics. The development of these foods or substrates, are alternatives for direct consumption or impregnation solutions. This way allows the development of new products.

Keywords: functional foods, probiotics, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei*, cape gooseberry.

¹ Facultad de Ciencias Agropecuarias, Departamento de Ingeniería Agrícola y de Alimentos, Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín, A.A. 568. Medellín, Colombia.

² Escuela de Biociencias, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín.

* Autor a quien se debe dirigir la correspondencia: ztmarina@unalmed.edu.co

INTRODUCCIÓN

Los probióticos son microorganismos vivos que causan efectos benéficos al huésped, son resistentes a pH de 2.5 y 0.3%p/v de las sales biliares (1), capaces de adherirse a las células epiteliales humanas, colonizar el intestino, producir metabolitos como ácido láctico, ácido acético, diacetilo, peróxidos, péptidos con función antimicrobiana y sustancias anticancerígenas; aumentar la resistencia a la invasión de bacterias patógenas intestinales, al presentar propiedades de co-agregación y adhesión (2-7); bajar el nivel de colesterol en sangre; reforzar los mecanismos de defensa natural del cuerpo (8, 9); estimular el crecimiento de microorganismos benéficos; aligerar la intolerancia a la lactosa y, en general, disminuir la incidencia, duración y severidad de algunas enfermedades intestinales, entre otros (10-12).

Al grupo de los probióticos pertenecen diferentes géneros microbianos: *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Saccharomyces*, *Bacillus*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, entre otros (2, 4, 6, 13, 14). En general, para que el microorganismo se implante y colonice los enterocitos, es indispensable tener una dieta rica en sustratos prebióticos, algunos de estos son de naturaleza lignocelulósica (oligosacáridos, fructooligosacáridos, fibra, cereales), derivados de la lactosa (galactooligosacáridos, lactulosa, lactitol), inulina entre otros (12, 15-20), que en conjunto ayudan a mejorar los efectos probióticos. La mayoría de los alimentos funcionales con microorganismos probióticos pertenecen a los lácteos, principalmente el yogurt (21-25); por esto se hace necesario explorar en diferentes sustratos a los que se les pueda inocular estos microorganismos y así tener acceso a los beneficios que proporcionan.

Los *Lactobacillus plantarum* y *casei* se caracterizan por ser microorganismos auxótrofos, porque no son capaces de sintetizar todos los factores de crecimiento, como las bases nitrogenadas, aminoácidos y vitaminas del complejo B, requiriendo un sustrato ácido; hacen parte de la microbiota de la leche, la carne, los vegetales, las frutas, los vinos, las mucosas intestinales y vaginales (11, 26, 27), de donde toman sus requerimientos nutricionales; son genéticamente estables, capaces de alcanzar el intestino humano y multiplicarse sin producir daños al huésped (28-30). Estos, para considerarse probióticos, deben ser viables en el alimento en

concentraciones de 10^6 - 10^{11} UFC/mL, durante el tiempo de vida útil (2, 3, 6, 7, 25, 27).

La cepa nativa utilizada en esta investigación fue aislada de repollo fermentado, a la cual le hicieron pruebas de coloración (gram), morfología, esporulación, catalasa, bioquímicas, resistencia a pH de 2 y concentración de sales biliares de 0.3%p/v; los resultados de este trabajo permitieron determinar que el microorganismo es del género *Lactobacillus*, especie *plantarum*, y que tiene características probióticas (31)

La uchuva (*Physalis peruviana* L.) pertenece a la familia de las Solanaceas y al género *Physalis*, es una baya redonda y pequeña cuyo peso varía entre 4 y 10 g; se encuentra dentro de un capacho que la cubre completamente protegiéndola del entorno durante la etapa de poscosecha. Cuenta además con más de ochenta variedades (32, 33). En Colombia, el Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural la considera como una fruta exótica promisoriosa de exportación. Su fruto es importante por su contenido de azúcar y vitaminas A, B y C; además, su aroma y su sabor *sui generis* la hacen de gran aceptación en los mercados.

El fruto maduro presenta características físico-químicas, como el pH alrededor de 3.7; sólidos solubles entre 13-15 °Brix y el % acidez 1.6-2.0. En el caso de los frutos pintones, el pH está alrededor de 3.7; sólidos solubles entre 9-13 °Brix y el % acidez 2.0-2.1. Es eficaz en el tratamiento de ciertas afecciones de la garganta, destruye tricocéfalos, parásitos intestinales y amebas, es aconsejable en el tratamiento de la próstata y la pueden consumir los diabéticos (34).

El objetivo de este trabajo es evaluar la viabilidad de crecimiento de la cepa nativa *Lactobacillus plantarum* LPBM10 y la cepa comercial *Lactobacillus casei* ATCC 393 en pulpa de uchuva y en solución isotónica de glucosa.

MATERIALES Y MÉTODOS

Microorganismos y medio de cultivo

Se utilizaron dos cepas de bacterias lácticas, el *Lactobacillus plantarum* LPBM10, cepa nativa aislada de repollo fermentado en el laboratorio de Microbiología Industrial de la Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín, y el *Lactobacillus casei* ATCC 393, de la casa comercial MDM. Ambas

cepas se activaron en caldo Man, Rogosa y Sharpe (MRS Sharlou) a 37°C, durante 72 h y bajo condiciones microaerófilas. Se partió de inóculos en fase exponencial, equivalentes a una concentración de 0.5 en la escala de McFarland, medidos por espectrofotometría a una λ de 560 nm.

Sustratos

- Pulpa de uchuva (PU): la uchuva ecotipo Colombia, procedente del municipio de la Unión (Antioquia), fue lavada y desinfectada con hipoclorito de sodio (100 ppm); se centrifugó en un equipo marca Cervall Sangle a 5000 rpm, 10 min a 22°C, se filtró y pasteurizó en un autoclave (marca Cosolodated Stills & Sterilizers) a 121°C, 4 min y a 4°C por 10 min.
- Solución isotónica de glucosa (G): se preparó teniendo como base la actividad de agua (a_w) de la uchuva (0.988 ± 0.002), correspondiente a una concentración del 14%p/p, la cual se esterilizó en un autoclave (marca Cosolodated Stills & Sterilizers) a 121°C durante 15 min.

Proceso de viabilidad

Para cada microorganismo se utilizaron 9 mL de sustrato/tubo de ensayo para cada tiempo de control (0, 5, 10 y 15 días). Cada tubo de ensayo se inoculó con 1 mL de la solución 0.5 del patrón McFarland (150 millones bacterias/mL). Los sustratos inoculados se almacenaron a 4°C y se les realizaron las pruebas fisicoquímicas y microbiológicas paralelamente durante el almacenamiento. Este proceso se realizó por triplicado.

Propiedades fisicoquímicas

Se llevaron a cabo pruebas de acidez por titulación con NaOH 0.1N, utilizando como indicador fenolftaleína (35), determinación de pH con un potenciómetro Schott CG840B (36), de sólidos solubles con un refractómetro Leica auto ABBE (escala 0-32 °Brix) (35) y la densidad utilizando un picnómetro a 20°C (36). Cada valoración se repitió 4 veces.

Recuento en placa (UFC/mL)

Se hicieron diluciones sucesivas hasta 10^8 con peptona universal (0.1% p/v) de las muestras inoculadas en proporción 1:9, luego se aplicó el método de siembra en profundidad con agar MRS y las cajas se incubaron a 37°C, por 72 h en condiciones de anaerobiosis (37). El conteo de células viables se realizó como UFC/100g UF y el resultado se expresó en unidades logarítmicas (LogUFC/100 g UF). El recuento para cada sustrato en los tiempos de control se realizó por triplicado.

Microscopía

El análisis microestructural se llevó a cabo en un microscopio electrónico de barrido (SEM), marca JEOL, referencia JSM 5950 LV. Las muestras de los sustratos inoculados son ubicadas y distribuidas a lo largo de un portaobjeto, luego se secan al ambiente, se recubren con oro y se someten a las condiciones de operación del equipo (25 Pa de vacío y 15 kv de corriente eléctrica). Se tomaron micrografías con diferentes aumentos para identificar los microorganismos en las estructuras de estudio.

Análisis de datos

Los resultados fueron analizados a partir de ANOVA, utilizando el método LSD (mínimas diferencias significativas) como método de comparaciones múltiples, con un nivel de confianza del 95% ($\alpha = 0.05$). El análisis de varianza se efectuó con el paquete estadístico STATGRAPHICS PLUS versión 5.1.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización fisicoquímica

Los valores medios con intervalos LSD (95%) del % de acidez, el pH, °Brix y densidad en pulpa de uchuva, pulpa de uchuva inoculada con *L. casei* y pulpa de uchuva inoculada con *L. plantarum*, almacenados a 4°C durante 15 días se presentan en la figura 1.

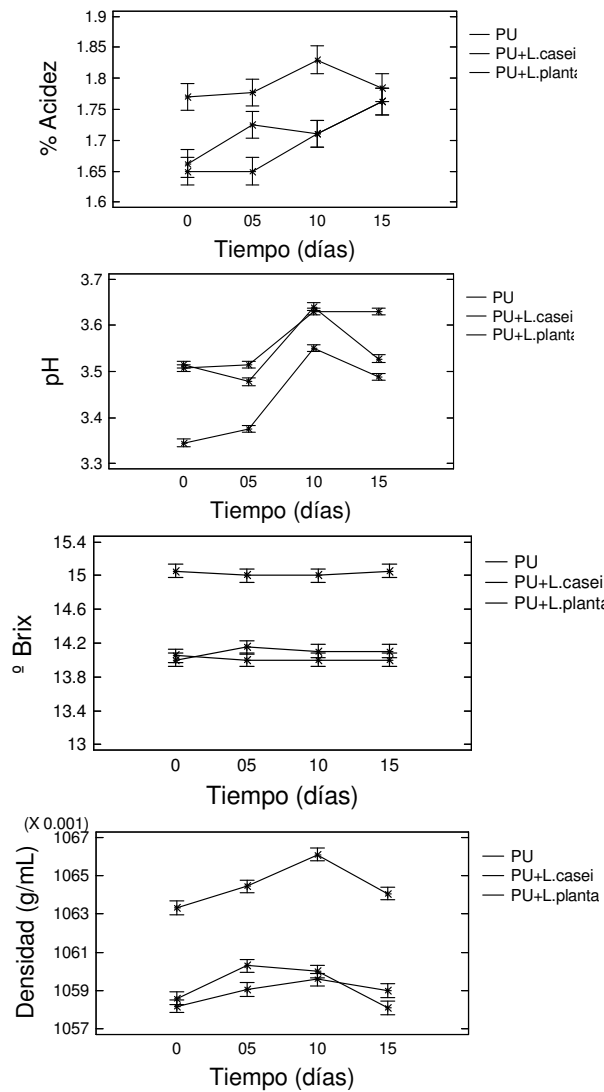


Figura 1. Características fisicoquímicas de % acidez, pH, °Brix y densidad en pulpa de uchuva (PU), pulpa de uchuva inoculada con *Lactobacillus casei* (PU + *L. casei*) y *Lactobacillus plantarum* (PU+ *L. plantarum*), durante 15 días de almacenamiento a 4°C.

Para el % acidez, el ANOVA no reportó diferencias significativas ($p > 0.05$) en la pulpa de uchuva por efecto del factor tiempo, pero sí reportó ($p < 0.05$) para las pulpas inoculadas con ambos microorganismos, posiblemente por la incorporación del caldo MRS que, al contener sales amortiguadoras, afecta directamente la acidez, disminuyéndola; se observan diferencias significativas por efecto del tipo de microorganismo ($p < 0.05$), es decir, la cepa nativa presenta una fase de adaptación más corta que la de la cepa comercial, aunque con el tiempo

tienden a comportarse igual. Esta diferencia contribuye a obtener procesos más cortos y rentables. El incremento de la acidez se atribuye al desdoblamiento que producen los microorganismos de los azúcares en ácido láctico (12, 37).

En cuanto al pH, el ANOVA reportó diferencias significativas ($p < 0.05$) en la pulpa de uchuva y en las pulpas inoculadas por efecto del factor tiempo, aunque los rangos de variación, 3.35-3.55 en la pulpa de uchuva y 3.48-3.64 en las pulpas inoculadas, son mínimos. Se presentan diferencias significativas ($p < 0.05$) por efecto de la inoculación, en todos los casos el pH es mayor en las pulpas inoculadas; durante la fase de adaptación la cepa nativa presenta una ligera disminución en el pH, lo que se puede interpretar como una mejor aceptabilidad del sustrato para su crecimiento. Por otra parte, en las pulpas inoculadas no se encontró una correspondencia entre el pH y la acidez, lo cual se asocia, por un lado, con las variaciones propias de la pulpa, y por el otro, con la influencia de las sales amortiguadoras presentes en el caldo MRS, que hacen que el pH aumente. La acidez del caldo MRS, utilizado fue 0.35 ± 0.035 , el pH de 6.14 ± 0.06 y los °Brix de 6.32 ± 0.26 .

Para los sólidos solubles (°Brix) y la densidad de los sustratos, el ANOVA no reportó diferencias significativas ($p > 0.05$) en la pulpa de uchuva y la pulpa inoculada, por efecto del factor tiempo ni por el tipo de microorganismo. Sin embargo, sí hay diferencias significativas ($p < 0.05$) por efecto de la inoculación, la cual se hizo en fase exponencial, lo que conlleva una disminución de los carbohidratos presentes, ya que éstos son la fuente principal de energía para la reproducción de los microorganismos (37). Con el tiempo, el sostenimiento de los sólidos solubles se considera más por el efecto que produce la temperatura de almacenamiento en los lactobacilos al provocar la fase de latencia. La densidad disminuye, posiblemente debido a la incorporación del medio de cultivo y al desdoblamiento de los azúcares en moléculas más pequeñas, oxidadas y de pesos moleculares menores (38, 39).

Los valores medios con intervalos LSD (95%) del % de acidez, el pH, °Brix y densidad en solución de glucosa, glucosa inoculada con *L. casei* y glucosa inoculada con *L. plantarum*, almacenados a 4°C durante 15 días se presentan en la figura 2.

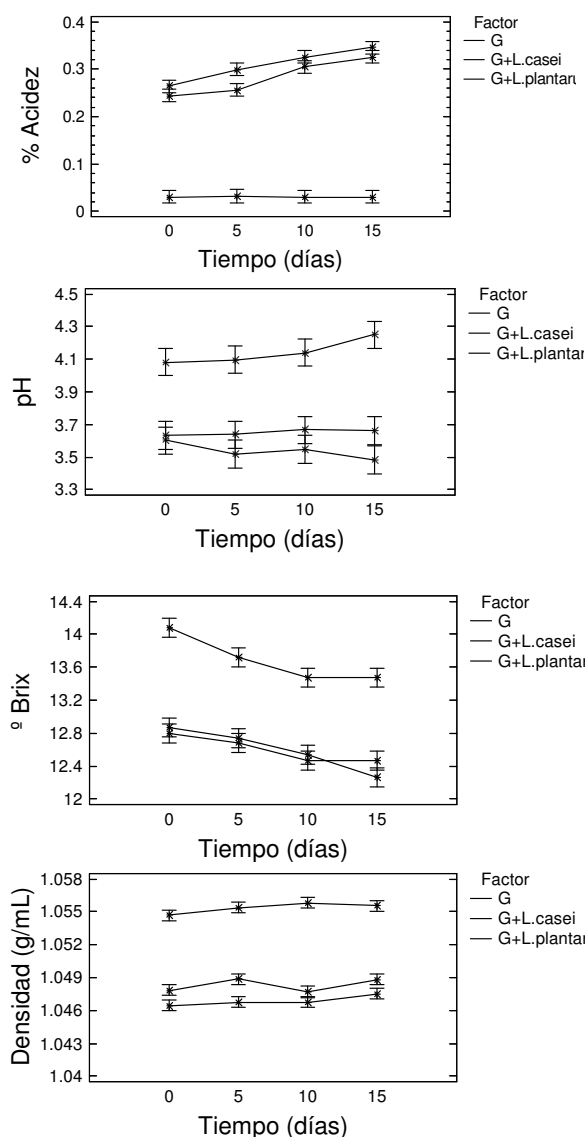


Figura 2. Características fisicoquímicas del % acidez, pH, °Brix y densidad en solución de glucosa (G), solución de glucosa inoculada con *Lactobacillus casei* (G + *L. casei*) y *Lactobacillus plantarum* (G + *L. plantarum*), durante 15 días de almacenamiento a 4°C.

Para el % acidez, el ANOVA no reportó diferencias significativas ($p > 0.05$) en la solución de glucosa por efecto del factor tiempo, pero sí las reportó ($p < 0.05$) para la solución de glucosa inoculada con ambos microorganismos, posiblemente por la incorporación de los microorganismos que vienen en fase exponencial y empiezan sus procesos metabólicos produciendo ácido láctico principalmente, aumentando la acidez del medio. Se observan diferencias significativas por efecto del tipo de microorganismo ($p < 0.05$), es decir, la cepa nativa sigue en su fase de crecimiento, mientras la cepa

comercial presenta una fase de adaptación hasta el 5° día, y posteriormente la acidez aumenta por el desdoblamiento que producen los microorganismos de los azúcares en ácido láctico (12, 37).

Para el pH, el ANOVA no reportó diferencias significativas ($p > 0.05$) por efecto del tiempo en las muestras, pero sí las reportó ($p < 0.05$) por efecto de la inoculación de los microorganismos, disminuyendo el pH al inocular la solución; esto coincide con el efecto que produce la acidez, que al aumentar hace que el pH disminuya, lo cual está asociado con los procesos metabólicos de las cepas, ya que estos son homo y heterofermentativos, produciendo principalmente ácido láctico (6, 29).

Para los sólidos solubles (°Brix), el ANOVA reportó diferencias significativas ($p < 0.05$) por efecto del tiempo y de la inoculación de las cepas, principalmente asociadas con el consumo de los carbohidratos de la solución por parte de los microorganismos como fuente de energía para realizar sus procesos metabólicos (12, 37).

Para la densidad de los sustratos, el ANOVA no reportó diferencias significativas ($p > 0.05$) por efecto del factor tiempo ni por el tipo de microorganismo. Sin embargo, si hay diferencias significativas ($p < 0.05$) por efecto de la inoculación, la cual disminuye posiblemente como se comentó anteriormente al desdoblamiento de los azúcares en moléculas de menor peso molecular (38, 39).

Recuento de microorganismos viables

La figura 3 presenta los valores medios con intervalos LSD (95%) de la población de microorganismos expresados como el Logaritmo de las Unidades Formadoras de Colonias/mL (log UFC/mL), durante 15 días de almacenamiento, a 4°C, en los sustratos pulpa de uchuva y solución isotónica de glucosa.

En la pulpa de uchuva, el mayor recuento de microorganismos viables lo presentó la cepa nativa *L. plantarum*, la cual mostró diferencias estadísticamente significativas con los tiempos de control y con una tendencia a crecer en el sustrato, obteniendo recuentos en 15 días de 9.28 ± 0.50 log UFC/mL; la cepa comercial *L. casei* no presentó diferencias significativas con el tiempo, por lo que se considera una población que se mantiene viable en fase estacionaria en el sustrato, con recuentos del orden de 8.69 ± 0.62 log UFC/mL a los 15 días de almacenamiento.

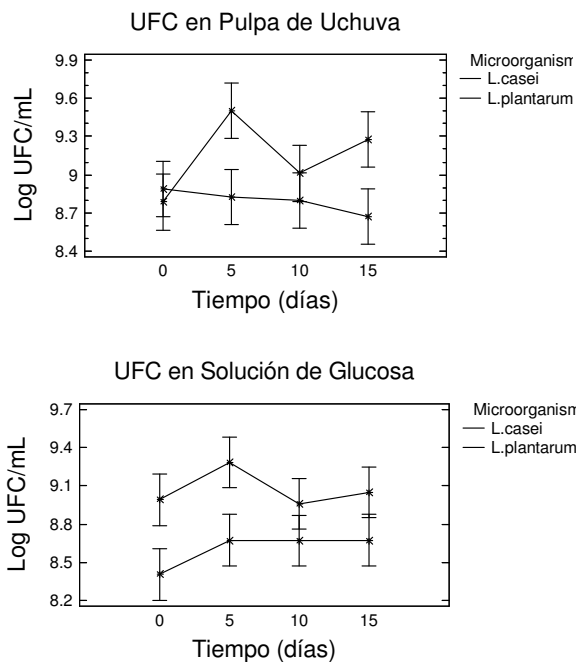


Figura 3. Logaritmo de las Unidades Formadoras de Colonias (log UFC/mL) de *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus plantarum* en pulpa de uchuva y solución de glucosa, almacenados a 4°C durante 15 días.

En la solución de glucosa 14% p/p, los microorganismos observan comportamientos similares durante los primeros cinco días con una tendencia creciente, de igual forma que en la pulpa de uchuva. El *L. plantarum* presenta mayores valores que el *L. casei*, con conteos promedio para 15 días de 9.05 ± 0.42 log UFC/mL, sin presentar diferencias estadísticamente significativas en los tiempos; para el *L. casei*, no existen diferencias significativas ($p > 0.05$) con respecto al tiempo de almacenamiento, presentando recuentos a los 15 días de 8.67 ± 0.41 log UFC/mL. Las diferencias en los recuentos entre los dos sustratos se deben principalmente a la fase de adaptación de cada microorganismo en los primeros cinco días.

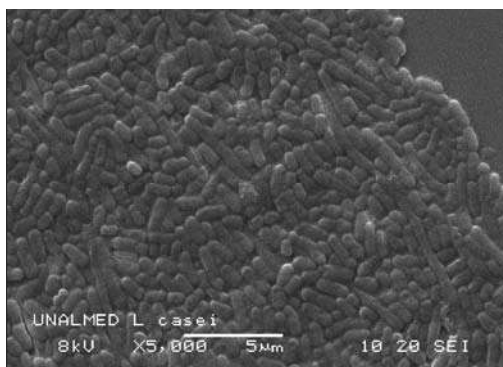
Aunque los sustratos favorecen de manera distinta a los microorganismos, se obtienen conteos por encima del criterio identificado para la industria láctea (1×10^6 UFC/mL). Teniendo en cuenta esto, se pueden considerar los alimentos desarrollados como alimentos con probióticos (40).

Son pocas las investigaciones realizadas en vegetales inoculados con microorganismos probióticos, estas hacen referencia a procesos fermentativos, lo cual no ocurre en esta investigación y hasta el momento en uchuva no se ha reportado

ningún trabajo. Investigaciones realizadas con *L. plantarum* en jugo de col y remolacha fermentados, almacenados a 4°C, alcanzaron a los 15 días, poblaciones correspondientes a $10.40 \pm 2.32 \times 10^7$ y $15.40 \pm 4.38 \times 10^7$ UFC/mL respectivamente; mientras que el *L. casei* en col no fue detectado y en remolacha se obtuvo $71.5 \pm 7.05 \times 10^7$ UFC/mL (22, 41). Otra investigación realizada con *L. casei* inoculado en caldo MRS con 1% de fibras cítricas (fibras de naranja y limón) y almacenadas durante 15 días a 4°C, obtuvieron niveles de crecimiento de 10^8 y 10^9 UFC/g (15). Es importante tener en cuenta que el caldo MRS es un sustrato altamente nutritivo para los lactobacilos, mientras que los sustratos evaluados (pulpa y solución de glucosa) están garantizando suficientes nutrientes para su viabilidad, alcanzando niveles de 9 unidades logarítmicas.

Microscopía

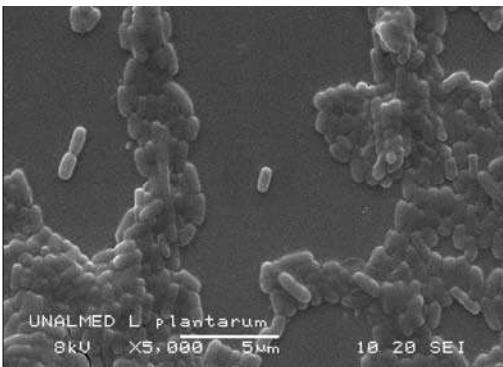
La figura 4 presenta microfotografías a 5.000 y 40.000 aumentos, en pulpa de uchuva y solución de glucosa 14%, inoculadas con *L. casei* y *L. plantarum*. Se observan las bacterias ácido lácticas ovaladas de borde redondo, con tamaños (largo x ancho) promedio de $1.65 \times 0.60 \mu\text{m}$ (*L. casei*) y $1.54 \times 0.59 \mu\text{m}$ (*L. plantarum*).



(a)



(b)



(c)



(d)

Figura 4. Microscopía en pulpa de uchuva y solución de glucosa inoculadas con *L. casei* (a y b) y *L. plantarum* (c y d), obtenidas por SEM.

Las microfotografías presentadas son coherentes con otras investigaciones en las cuales se presenta la morfología de ambos microorganismos, las cuales muestran al *Lactobacillus casei* (42) y al *Lactobacillus plantarum* (43) de igual forma y tamaño que las referenciadas.

CONCLUSIONES

Los microorganismos *L. plantarum* y *L. casei*, demostraron viabilidad en pulpa de uchuva y solución de glucosa 14% p/p en las condiciones de almacenamiento fijadas (4°C, 15 días). Las cepas fueron capaces de sobrevivir sin fermentación previa; en el caso del *L. plantarum*, fue capaz de utilizar los nutrientes y mantenerse viable durante los 15 días de almacenamiento, alcanzando poblaciones del orden de 9 ciclos Log UFC/mL. En el caso del *L. casei*, su población fue menor a la de *L. plantarum*; sin embargo, los promedios se mantuvieron por encima de las concentraciones inoculadas.

La pulpa de uchuva inoculada con *Lactobacillus* se puede considerar un alimento simbiótico, por las características nutricionales propias de la uchuva (prebiótico) y las adquiridas con el microorganismo (probiótico). Con la ingesta de 250 mL pulpa/día se pueden alcanzar niveles de *L. plantarum* de 11.91 ciclos log UFC y de *L. casei* de 11.13 log UFC. El consumo permanente de esta pulpa con microorganismos probióticos podría contribuir a mejorar la salud de la población.

La solución isotónica de glucosa 14% p/p, es un buen vehículo, ya que permite que los microorganismos se mantengan viables en el tiempo y, por lo tanto, se puede utilizar como solución de incorporación en diferentes matrices alimentarias.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Pennacchia C, Ercolini D, Blaiotta G, Pepe O, Mauriello G, Viliani F. Selection of *Lactobacillus* strains from fermented sausages for their potential use as probiotics. *Meat Sci.* 2004; 67 (2): 309-317.
2. Prado F, Parada J, Pandey A, Saccol C. Trends in non-dairy probiotic beverages. *Food Res Int.* 2008; 41 (2): 111-123
3. Collado M, Meriluoto J, Salminen S. Measurement of aggregation properties between probiotics and pathogens: *in vitro* evaluation of different methods. *J Microbiol Meth.* 2007; 71 (1): 71-74.
4. Shah N. Review functional cultures and health benefits. *Int Dairy J.* 2007; 17 (11): 1262- 1277.
5. Tuhoj MK, Probert HM, Smejkal CW, Gibson GR. Using probiotics and prebiotic to improve gut health. *Drug Discov Today.* 2003; 8 (15): 692-700.
6. Reuter G, Klein G, Goldberg M. Identification of probiotic cultures in food samples. *Food Res Int.* 2002; 35 (2-3): 117-124.

7. Zubillaga M, Weill R, Postaire E, Goldman C, Caro R, Boccio J. Effect of probiotics and functional foods and their use indifferent diseases. *Nutr Res.* 2001; 21 (3): 569- 579.
8. Charalampopoulos D, Wang R, Pandiella S, Webb C. Application of cereals and cereal components in functional foods: a review. *Int J Food Microbiol.* 2002; 79 (1-2): 131-141.
9. Puupponen-Pimiä R, Aura A, Oksman-Caldentey K, Myllärinen P, Saarela M, Mattila-Sandholm T, *et al.* Development of functional ingredients for gut health. *Food Sci Technol.* 2002; 13 (1): 3-11.
10. Jenkins B, Holsten S, Bengmark S, Martindale R. Probiotics: A Practical Review of Their Role in Specific Clinical Scenarios. *Nutrition in Clinical Practice.* 2005; 20 (2): 262-270.
11. Hammes W, Hertel C. Research approaches for pre- and probiotics: challenges and outlook. *Food Res Int.* 2002; 35 (2-3): 165-170.
12. Holzapfel W, Schillinger U. Introduction to pre- and probiotics. *Food Res Int.* 2002; 35 (2-3): 109-116.
13. Isolauri E, Salminen S, Ouwehand A. Probiotics. *Best Practice and Research Clinical Gastroenterology.* 2004; 18 (2): 299-313.
14. Fooks L, Gibson G. In vitro investigations of the effect of probiotics and prebiotics on selected human intestinal pathogens. *FEMS Microbiol Ecol.* 2002; 39 (1): 67-75.
15. Sendra E, Fayos P, Lario Y, Fernández-López J, Sayas-Barberá E, Pérez-Alvarez J. Incorporation of citrus fibers in fermented milk containing probiotic bacteria. *Food Microbiol.* 2008; 25 (1): 13-21.
16. Akin B, Akin M, Kirmaci Z. Effects of inulin and sugar levels on the viability of yogurt and probiotic bacteria and the physical and sensory characteristics in probiotic ice cream. *Food Chem.* 2007; 104 (1): 93-99.
17. Özer D, Akin M, Özer B. Effect of inulin and lactulose on survival of *Lactobacillus acidophilus* LA-5 and *Bifidobacterium bifidum* BB-02 in acidophilus-bifidus yoghurt. *Food Sci Technol Int.* 2005; 11 (1): 19-24.
18. Shah N. Probiotics and prebiotics. *Agro Food industry Hi Tech* 2004; 15(11):13-16
19. Bielecka M, Biedrzycka E, Majkowska A. Selection of probiotics and prebiotics for synbiotics and confirmation of their in vivo effectiveness. *Food Res Int.* 2002; 35 (2-3): 125-131.
20. Bomba A, Nemcova R, Mudronova D, Guba P. The possibilities of potentiating the efficacy of probiotics. *Trends Food Sci Technol.* 2002; 13 (4): 121-126.
21. Jones P, Jew S. Functional food development: concept to reality. *Trends Food Sci Technol.* 2007; 18 (7): 387-390.
22. Yoon K, Woodams E, Hang Y. Production of probiotic cabbage juice by lactic acid bacteria. *Bioresource Technology.* 2006; 97 (12): 1427-1430.
23. Ouwehand A, Salminen S, Isolauri E. probiotics: an overview of beneficial effects. *Antonie van Leeuwenhoek.* 2002; 82 (1-4): 279-289.
24. Lourens-Hattingh A, Viljoen B. Growth and survival of a probiotic yeast in dairy products. *Food Res Int.* 2001; 34 (9): 791-796.
25. Lourens-Hatting A, Viljoen B. Yogurt as probiotic carrier food. *Int Dairy J.* 2001; 11 (1-2): 1-17.
26. Silvi S, Verdenelli M, Orpianesi C, Cresci A. EU project Crownalife: functional foods, gut microflora and healthy ageing Isolation and identification of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains from faecal samples of elderly subjects for a possible probiotic use in functional foods. *J Food Eng.* 2003; 56 (2-3): 195-200.
27. Betoret N, Puentes L, Díaz MJ, Pagán MJ, García MJ, Grass ML, *et al.* Development of probiotic-enriched dried fruits by vacuum impregnation. *J Food Eng.* 2003; 56 (2-3): 273-277.
28. García de los Ríos J, Jiménez S, Jiménez P, Reche M, Álvarez F, Rojas A. Estudio microbiológico comparativo de yogur fresco y termizado en un modelo animal in vivo. *Nutrición Hospitalaria.* 2003; 18 (4): 207-214.
29. Puente Díaz L. Aplicación de la técnica de impregnación a vacío en la obtención de alimentos funcionales con contenido probiótico a partir de manzana. [Tesis doctoral]. Valencia: Universidad Politécnica de Valencia; 2003.
30. Shortt C. The probiotic century: historical and current perspectives. *Trends Food Sci Technol.* 1999; 10 (12): 411- 417.
31. Salazar B. Aislamiento de cepas nativas de probióticos y comparación de la viabilidad por efecto de un prebiótico [Tesis de maestría]. Colombia: Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín; 2003. 77 p.
32. Salazar M, Jones J, Chaves B, Cooman A. A model for the potential production and dry matter distribution of Cape gooseberry (*Physalis peruviana* L.). *Sci. Hort.* 2008; 115 (2): 142-148.
33. Rojas M, Peñuela A, Chaparro M, Gómez C, Aristizábal G, López J. Caracterización y normalización de los recipientes de cosecha y empaques de la comercialización de frutas en Colombia. *Cenicafé.* 2005.
34. Osorio D, Roldán J. Volvamos al campo: Manual de la uchuva. Bogotá: Grupo Latino; 2003. 36 p.
35. Association of Official Analytical Chemists. AOAC. Official Methods of analysis. Basic calculations for chemical and biological analyses Bassey. B.J.S. Efiok. Arlington, VA. 1996
36. Association of Official Analytical Chemists. AOAC. Official Methods of analysis. 15th ed. Arlington, VA. 1990.
37. Madigan M, Martinko J, Parker J, Brock J. *Biología de los Microorganismos.* 10a ed. Madrid: Prentice Hall; 2004.
38. Leveau J-Y, Bouix M. *Microbiología industrial. Los microorganismos de interés industrial.* Zaragoza, España: Acribia; 2000. 595 p.
39. Mathews C, van Holde K, Ahern G. *Bioquímica.* 3ª ed. Madrid: Pearson Educación; 2002. 1335 p.
40. CODEX *Alimentarius.* Leches fermentadas 2007, Codex Stan 243- 2003. [Sitio en Internet]. Disponible en: <http://www.codexalimentarius.net> . Consultado: 20 de Noviembre de 2008.
41. Yoon K, Woodams E, Hang Y. Fermentation of beet juice by beneficial lactic acid bacteria. *Lebensm wiss U Technology.* 2005; 38 (1): 73-75.
42. Freitas R. Utilização de culturas lácticas probióticas no processamento de produto cárneo fermentado. [Tesis doctoral]. Curitiba: Universidade Federal do Paraná; 2005.
43. Michida H, Tamalampudi S, Pandiella S, Webb C, Fukuda H, Kondo A. Effect of cereal extracts and cereal fiber on viability of *Lactobacillus plantarum* under gastrointestinal tract conditions. *Biochem Eng J.* 2006; 28 (1): 73-78.