

CAMBIOS EN LA RESISTENCIA GÁSTRICA DE *L. casei* EN LECHE FERMENTADAS COMERCIALES DURANTE LA CONSERVACIÓN EN FRÍO

**Mario Céspedes, Diamela Mateolli, Pamela Cárdenas,
Mariano Lescano, Nora Aimaretti y Gabriel Vinderola***

RESUMEN: La adición de bacterias probióticas a leches fermentadas plantea, entre numerosos desafíos tecnológicos, la necesidad de mantener la viabilidad celular durante la vida de estante y el tránsito intestinal. Existe evidencia científica reciente que sugiere que en ciertos casos, la preservación de la viabilidad celular en un producto almacenado en frío no siempre implica la preservación de la funcionalidad del probiótico. El objetivo de este trabajo fue 1) poner a punto un modelo de digestión gástrica para 2) estudiar la influencia de distintas variedades comerciales de leches fermentadas y de la temperatura (5°C y 12°C) y el tiempo de almacenamiento, sobre la resistencia a la acidez gástrica (RAG) de *L. casei*. Se determinó la RAG de una cepa de *L. casei* incluida en una leche fermentada comercial por exposición a solución de NaCl 0,5% (pH 2,50; 2,70 y 3,00, con HCl) en presencia/ausencia de 0,3% (p/v) de dos pepsinas porcinas, durante 90 min, con determinaciones periódicas (30 min) de viabilidad celular (recuentos en medio sólido). En relación al objetivo 2) se estudió la RAG (a t = 0, 10 y 20 días de almacenamiento a 5°C y 12°C) en dos sabores (natural y frutilla) de dos marcas comerciales de leches fermentadas adicionadas de *L. casei*. Se eligió trabajar a pH 2,70, utilizando pepsina Sigma, debido a que indujo una pérdida de viabilidad celular moderada (entre 1 y 1,5 órdenes log), lo que podría poner en evidencia, durante el almacenamiento, cambios en la RAG. La RAG se modificó durante la vida de estante, tanto en función de la temperatura como de la marca comercial y del sabor del producto. En algunos casos, la cepa de *L. casei* incrementó su RAG (1-2 órd. log) hacia el final de la vida de estante (marca 1, sabor natural), lo que podría interpretarse como una inducción de tolerancia a un factor de estrés (acidez gástrica) por una exposición prolongada a niveles subletales de otro factor de estrés (acidez láctica). Sin embargo, en otros casos, la RAG se mantuvo a lo largo del almacenamiento refrigerado (marca 2, sabor frutilla) o incluso, disminuyó (1-2 órd. log, marca 2, sabor natural). Estos resultados demuestran que una misma cepa puede modificar su resistencia a las barreras biológicas del tracto digestivo en función de la composición del producto usado como vehículo o de la temperatura de conservación hasta el consumo. En consecuencia, la incidencia de estos

* *Mario Céspedes* es docente e investigador de la Universidad del Centro Educativo Latinoamericano en la cátedra de Microbiología y Bioquímica de la Clínica San Cayetano. E-mail: cespedesjm@gmail.com

Diamela Mateolli, Pamela Cárdenas, Mariano Lescano son alumnos de la carrera de Ingeniería en Alimentos y ayudantes de investigación de la Universidad del Centro Educativo Latinoamericano.

Nora Aimaretti es Bioquímica, Lic. en Biotecnología y Mgtr. en Ciencia y Tecnología de Alimentos por UNL. Es docente e investigadora en la Facultad de Química (UCEL); docente e investigadora en la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas (UNL). email: naimaretti@ucel.edu.ar

Gabriel Vinderola es Dr. en Química de la UNL, Profesor Adjunto (Cátedra de Microbiología, Facultad de Ingeniería Química, Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe), Investigador Adjunto de CONICET en el Instituto de Lactología Industrial (UNL-CONICET, Santa Fe) e Investigador Asociado del Departamento de Química y Bioquímica de la Universidad de Moncton (NB, Canada). E-mail: gvinde@fiq.unl.edu.ar

M. Céspedes, D. Mateolli, P. Cárdenas, M. Lescano, N. Aimaretti, G. Vinderola

fenómenos debería considerarse al momento de definir la funcionalidad de una cepa probiótica, en relación a la matriz alimenticia utilizada como vehículo.

Palabras claves: probióticos - viabilidad - funcionalidad - resistencia gástrica.

ABSTRACT: *Changes in gastric resistance of L. casei*

The addition of probiotic bacteria to fermented milks implies, among many other technological challenges, the need of maintaining cell viability throughout the shelf life of the product and during the gastrointestinal transit. Recent scientific reports suggest that, in certain cases, the maintenance of cell viability during the refrigerated storage is not always an indicator of maintenance of effectiveness or functionality of the product after consumption. The aim of this work was 1) to optimize a model for the *in vitro* determination of gastric acid resistance (GAR) to 2) study the influence of different commercial varieties of fermented milks and the storage temperature (5°C y 12°C) on the GAR of *L. casei* during the refrigerated storage. The GAR of a strain of *L. casei*, included in a commercial fermented milk, was studied by the exposure to a solution of 0.5% NaCl pH 2.50; 2.70 or 3.00 (with HCl) in presence/absence of 0.3% (w/v) of two commercial porcine pepsins for 90 min. Cell viability was assessed every 30 min (colony count technique). In relation to the objective 2) the GAR (time = 0, 10 and 20) of refrigerated storage at 5°C and 12°C of *L. casei* was studied in two commercial products (of two different savours: natural and vanilla). Experiments were carried out in duplicate in two independent assays. The condition pH 2.70-pepsin Sigma was chosen for further studied in commercial samples since it induced a lost of cell viability between 1 and 1.5 log orders after 90 min of gastric digestion. The choice was made considering that this mild condition of digestion might evidence changes in GAR in *L. casei* during the refrigerated storage of products. We observed that GAR of *L. casei* changed during the shelf life, in relation to the storage temperature as well as the savour and the commercial variety of the product studied. For example *L. casei* increased its RAG by day 20 of storage at 12°C in one commercial variety with natural savour. This result might be explained as an induction of tolerance to a stress factor (gastric acidity) by a long-term exposition to sublethal levels of another stress factor (lactic acid). In other samples, the GAR did not change throughout refrigerated storage or even, it diminished. These results show that the same strain of a probiotic bacterium might change its gastric resistance as a function of the physicochemical characteristics of the product used as vehicle or as a function of the storage temperature. The incidence of these phenomena in cell resistance to gastric digestion should be further studied and considered at the moment of determining the functionality of a commercial probiotic strain in a particular food matrix.

Key words: probiotics – viability – functionality - gastric resistance.

Introducción

Los alimentos funcionales son aquellos que ejercen efectos benéficos en el consumidor más allá de la nutrición básica y debido a la presencia (natural o agregada) de uno o más componentes que determinan la funcionalidad (ácido fólico, ácido linoleico conjugado, lactulosa, bacterias probióticas) (Hahn, 2005). En particular, las bacterias probióticas son microorganismos que poseen efectos benéficos sobre la salud del consumidor cuando son administrados vivos y en dosis adecuadas (FAO/WHO, 2002). Las cepas de bacterias probióticas más utilizadas en alimentos funcionales pertenecen al género *Bifidobacterium* o a los grupos *L. casei* y *L. acidophilus* (Vinderola y col., 2009a). La utilización de bacterias

probióticas en leches fermentadas plantea, entre otras cosas, la necesidad de mantener la viabilidad de las mismas hasta el consumo y de implementar un sistema muy organizado de almacenamiento y distribución de los productos donde la cadena de frío es de vital importancia para mantener la viabilidad de estos microorganismos, condición imprescindible para asegurar su rol como probióticos (Ross y col., 2005). La viabilidad celular está condicionada, entre otros factores, por los diferentes tipos de producto (Birolo y col., 2000), los ingredientes químicos utilizados (Vinderola y col., 2002a), las interacciones entre las cepas de bacterias lácticas y probióticas intervinientes (Vinderola y col., 2002b). La viabilidad celular es un factor determinante de la funcionalidad, es decir de la efectividad del probiótico, siendo ésta evaluada, por ejemplo, como la capacidad de activar la respuesta inmune de la mucosa intestinal (Vinderola y col., 2005a y 2005b).

Estudios recientes permiten inferir que la viabilidad celular de los cultivos probióticos no sería el único parámetro como para garantizar el papel funcional de los mismos. Por ejemplo, Tuomola y col. (2001) determinaron que una cepa de *L. acidophilus*, aislada con iguales recuentos al comienzo y al final de la línea de producción del producto que la contenía, presentó una drástica disminución de la adhesión al epitelio intestinal entre estos dos puntos de muestreo, a pesar de tener el mismo número de células viables en ambos. Esta disminución de la capacidad de adhesión al epitelio implica una menor capacidad de interacción con las células inmunes y por lo tanto una diferente capacidad de activar la respuesta inmune de la mucosa intestinal, en relación a la misma cepa apenas agregada al producto (Sánchez y col., 2008). Saarela y col. (2006) demostraron que cultivos de bifidobacterias conservados en solución tampón fosfato o en leche, también pueden presentar igual número de células viables durante el almacenamiento refrigerado pero diferente resistencia a las sales biliares, una importante barrera biológica del tracto intestinal, a lo largo de la conservación en frío. De este contexto se desprende que el control de la viabilidad celular de un microorganismo probiótico no sería un parámetro suficiente que garantice la funcionalidad del probiótico in vivo. Si bien la viabilidad celular puede conservarse, la tolerancia de los probióticos a las barreras biológicas del tracto gastrointestinal pueden modificarse durante el almacenamiento en frío.

Existen diferentes factores tecnológicos, microbiológicos y fisicoquímicos que estarían gobernando la funcionalidad de un microorganismo probiótico, más allá del nivel de células viables, a lo largo de la cadena de producción, distribución y consumo del producto. La hipótesis de este estudio es que existen factores tecnológicos que condicionarían ya no sólo la viabilidad celular de las bacterias probióticas en las leches fermentadas sino, además, su funcionalidad. Los objetivos de este trabajo fueron: 1) poner a punto un modelo de digestión gástrica capaz de evidenciar cambios en la funcionalidad debido a factores tecnológicos; 2) determinar los niveles de células viables de cepas del grupo *L. casei* en diferentes variedades comerciales de leches fermentadas probióticas durante la vida de estante del producto y 3) determinar la resistencia a la acidez gástrica simulada de cepas de este grupo en diferentes variedades comerciales de leches fermentadas probióticas durante la vida de estante del producto.

Materiales y métodos

a) Muestras

Se obtuvieron muestras de leches fermentadas (marcas A y B) de reciente elaboración y de diferentes sabores: natural y frutilla, en supermercados de la ciudad de Rosario, las cuales

M. Céspedes, D. Mateolli, P. Cárdenas, M. Lescano, N. Aimaretti, G. Vinderola

declaraban contener cepas del grupo *L. casei* (*L. casei* o *L. paracasei*). Las muestras se conservaron a 5°C (temperatura de heladera) y a 12°C (simulando temperatura de góndola) hasta la fecha de vencimiento indicada en el envase (vida de estante). Teniendo en cuenta que la vida de estante de este tipo de productos es de 30 días y que las muestras llegan a los supermercados aproximadamente luego de una semana de ser elaborados, los estudios de determinación de resistencia a la acidez gástrica se realizaron considerando t = 0: 20 días antes de la fecha de vencimiento, t = 10d: 10 días antes de la fecha de vencimiento y t = 20d: fecha de vencimiento.

b) Determinación del nivel de células viables

Diluciones seriales de las muestras (agua de peptona 0,1%) se sembraron en superficie en agar MRS-LP, según Vinderola y Reinheimer (2000). Para la formulación del medio agarizado MRS-LP, se utilizó agar MRS (Britania, Argentina) con el agregado de 0,2% (p/v) de cloruro de litio (Sigma) y 0,3% (p/v) de propionato de sodio (Sigma). Las placas se incubaron durante 72hs a 37°C en aerobiosis.

c) Determinación de la funcionalidad

Se estudió la sobrevida de *L. casei* a la digestión gástrica simulada de células viables contenidas en los productos comerciales. Las muestras se mezclaron en volúmenes iguales con una solución cuya composición de sales minerales es similar a la de la saliva bucal (0,22 g/l CaCl₂, 16,2 g/l NaCl, 2,2 g/l KCl y 1,2 g/l NaHCO₃) (Marteau y col., 1997). Las muestras luego se acidificaron hasta pH 3; 2,70 o 2,5 (con HCl 5 y 1 M) en ausencia o presencia de 0,3% (p/v) de pepsina porcina (Merck o Sigma) y se mantuvieron a 37°C durante 90 min. Se realizaron determinaciones de la viabilidad celular (recuentos en medio agarizado) cada 30 min. Los ensayos se realizaron por duplicado y en dos experiencias independientes.

d) Análisis estadístico

Los datos de recuentos de células viables fueron analizados con el test ANOVA de una vía, con el software SPSS (1996). Las diferencias significativas entre los valores promedios se detectaron mediante el test de Duncan de rango múltiple.

Resultados y discusión

Elección de las condiciones de la digestión gástrica simulada

Numerosas y muy diversas han sido las metodologías para determinar la resistencia a barreras biológicas, como la acidez gástrica, aplicadas a cultivos probióticos puros o incluidos en matrices alimenticias (Morelli, 2007). Estas metodologías difieren notablemente en los valores adoptados para variables como los tiempos de exposición a la acidez (de 30 a 180 min), el valor de pH (de 1,8 a 3), el tipo y concentración de enzimas gástricas y las sales minerales utilizadas. Por otro lado, mientras algunos autores utilizan métodos estáticos (exposición a un mismo valor de pH durante un determinado período de tiempo), los trabajos más recientes utilizan equipos capaces de disminuir gradualmente el pH durante el tiempo que dura la digestión gástrica simulada, desde un valor inicial de 5 - 5,5 hasta 1,8 - 2. Sin embargo, cada una de las metodologías empleadas ha sido aparentemente útil para los objetivos propuestos en cada uno de los trabajos donde han sido descriptas. A pesar de la gran variedad de metodologías propuestas, no existe hasta el momento una metodolo-

Cambios en la resistencia gástrica de *L. casei* en leches fermentadas

gía oficial y única, o que al menos tenga un consenso científico internacional, para la determinación *in vitro* de la resistencia a la acidez gástrica en bacterias probióticas. En ese contexto, se decidió para este estudio, poner a punto una metodología para la determinación de resistencia gástrica, que induzca una moderada pérdida de viabilidad celular de *L. casei* en muestras frescas (aproximadamente 2 órdenes logarítmicos), y que a su vez permita determinar si ésta se modifica en respuesta a factores tecnológicos tales como las cepas, las variedades comerciales de leche fermentada y la temperatura, a lo largo del almacenamiento refrigerado del producto.

Las Figuras 1-4 muestran los resultados para la puesta a punto de las condiciones de digestión gástrica *in vitro* para la cepa de *L. casei* contenida en la muestra marca A sabor frutilla. Para la digestión gástrica a pH 3 y 2,5, en ausencia de pepsina (Fig. 1), se observó que un valor de pH de 3 no afectó la viabilidad celular de esta cepa durante los 90 min de digestión gástrica simulada, mientras que un valor de 2,5 indujo una pérdida de viabilidad celular de aproximadamente 5 órdenes logarítmicos. Por otro lado, cuando la digestión se condujo a pH 2,5 en presencia de pepsina (Merck), la pérdida de viabilidad celular fue total (más de 8 órdenes log) luego de 90 min (Fig. 2), lo que para nuestro modelo significó una pérdida de viabilidad celular extrema, y que no sería de utilidad para los objetivos planteados. Los órdenes de magnitud de las pérdidas de viabilidad hasta aquí observados confirman resultados previos (Vinderola y Reinheimer, 2003) para cepas probióticas del grupo *L. casei*.

En función de estos resultados se decidió utilizar un valor de pH intermedio (2,70) para llevar adelante la digestión gástrica simulada en presencia de pepsina (Merck). En este caso, se observó una pérdida de viabilidad celular de aproximadamente 4,5 órdenes logarítmicos (Fig. 3). Finalmente, se evaluó comparativamente el efecto de diferentes marcas comerciales de pepsina porcina (Merck y Sigma) sobre la viabilidad celular durante la digestión gástrica (Fig. 4). Se observó que, mientras la combinación pH 2,70-pepsina Merck indujo una pérdida de viabilidad celular de aproximadamente 4,5 órdenes logarítmicos, la combinación pH 2,70-pepsina Sigma indujo una pérdida de viabilidad celular de aproximadamente 2 órdenes logarítmicos. Conforme a los objetivos planteado se adoptaron entonces estas condiciones de digestión gástrica simulada para los estudios en muestras comerciales, ya que logró inducir una pérdida de viabilidad celular moderada en *L. casei* en la muestra de leche fermentada recién elaborada.

Viabilidad y resistencia gástrica de *L. casei* durante el almacenamiento refrigerado

Las Figuras 5-8 muestran los resultados obtenidos al analizar la concentración de células viables de *L. casei* y la resistencia a la acidez gástrica simulada (RAG) (exposición por 90 min a pH 2,70 en presencia de pepsina Sigma) en muestras de leches fermentadas comerciales (marcas A y B) sabor natural y frutilla. En nuestro país, el Código Alimentario Argentino no contempló aún la incorporación de bacterias probióticas en alimentos. La concentración de células viables en un determinado producto debería fijarse en función de la alegación de salud, teniendo en cuenta los efectos son dosis-dependientes (Vinderola y col. 2005a, Minelli y Benini, 2008, Fang y col., 2009). Sin embargo, la comunidad científica internacional generaliza y considera que las leches fermentadas deberían contener un mínimo de entre 10⁷ y 10⁸ UFC/ml (Champagne y Gardner, 2005). En este contexto, todas las muestras comerciales analizadas se ajustaron a estos criterios, tanto en muestras recién elaboradas como a lo largo de la vida de estante. Adicionalmente, las muestras sabor natural de

M. Céspedes, D. Mateolli, P. Cárdenas, M. Lescano, N. Aimaretti, G. Vinderola

ambas marcas estudiadas, experimentaron un aumento significativo en la concentración de *L. casei* (de entre 0,5 y 1 orden logarítmico) hacia el final de la vida de estante de las muestras conservadas a 12°C. La capacidad de *L. casei* de desarrollar en un producto lácteo durante la vida de estante a temperaturas de refrigeración normalmente encontradas en las góndolas de supermercados, 12° a 14°C según Willcox y col. (1994) y Evans y col. (2007), ha sido recientemente descrita por Vinderola y col. (2009b). No obstante no es un fenómeno siempre deseable ya que podría modificar negativamente las características sensoriales del producto.

Para todas las muestras estudiadas se observó que, a pesar de mantenerse la viabilidad celular a lo largo del almacenamiento refrigerado, la RAG de *L. casei* se modificó respecto a la que presentaba el microorganismo en el producto fresco, tanto en función de la variedad comercial (marca y sabor) como de la temperatura de conservación. Con excepción de las muestras conservadas durante 10 días a 5°C, la cepa de *L. casei* incluida en las muestras de sabor natural de la marca A experimentó un aumento de RAG (de entre 1,2 y 2 órdenes log) hacia el final de la vida de estante a 5°C y para los 10 y 20 días para las muestras almacenadas a 12°C (Fig. 5). Sin embargo, para la misma cepa incluida en el producto sabor frutilla (Fig. 6), el aumento de RAG fue significativo, pero de menor magnitud (1 orden log) y solamente registrado para el día 20 a 12°C. El aumento de la RAG se podría explicar como una inducción de tolerancia por un factor de estrés (acidez gástrica) durante la exposición prolongada (10 ó 20 días) a niveles subletales de otro factor de estrés, como lo es la acidez láctica (Sanders y Huis in't Veld, 1999). En los casos donde no se observó aumento de la RAG, se podría deber a la competencia entre fenómenos de inducción de resistencia con factores inhibitorios que podrían ejercer ciertos componentes químicos (saborizantes, colorantes) de la leche fermentada (Vinderola y col., 2002a). Si bien la inducción de RAG fue menor en las muestras sabor frutilla, el valor absoluto de la misma fue mayor en las muestras sabor frutilla (aprox. 1,2 órdenes log de diferencia entre los recuentos a $t = 0$ y $t = 90$ min) respecto a las muestras sabor natural (aprox. 3 órdenes log de diferencia entre los recuentos a $t = 0$ y $t = 90$ min), lo que podría deberse a una inducción de RAG en las muestras sabor frutilla a partir de la elaboración de estas muestras, por la exposición a niveles subletales de colorantes y saborizantes de frutilla o exposición a la fruta misma, ya que son conocidas sus propiedades antimicrobianas debido a su contenido en compuestos fenólicos (Puupponen-Pimiä y col., 2005). Para las muestras de la marca B, por el contrario, se observó también una mayor RAG de *L. casei* a tiempo 0 en las muestras sabor natural (aprox. 2 órdenes log de diferencia entre los recuentos a $t = 0$ y $t = 90$ min) respecto a las muestras sabor frutilla (aprox. 4 órdenes log de diferencia entre los recuentos a $t = 0$ y $t = 90$ min). En las muestras sabor natural se observó una disminución de la RAG de entre 1 y 3 órdenes log a lo largo del almacenamiento en frío, mientras que en las muestras sabor frutilla, solamente hubo disminución de la RAG en las muestras conservadas durante 10 días a 12°C, lo que también podría deberse a una inducción cruzada de tolerancia a factores de estrés para el resto de las condiciones ensayadas.

La variabilidad de comportamientos de la RAG en *L. casei* observada en este estudio podría deberse a la cantidad de parámetros que influyen la resistencia gástrica, a sus interacciones y a la competencia simultánea de factores inhibitorios e inductores de resistencia, tales como la cepa empleada, la composición fisicoquímica del alimento, el proceso fermentativo llevado a cabo y las cepas starters o acidificantes empleadas, además de la temperatura y el período de conservación en frío y la cadena de frío desde la industria hasta el supermercado.

Conclusiones

Cambios en la resistencia gástrica de *L. casei* en leches fermentadas

La concentración de células viables de *L. casei* en las leches fermentadas estudiadas que se comercializan en Argentina se ajustan a los criterios internacionales, tanto en muestras recién elaboradas como en muestras conservadas a temperaturas de heladera o góndola. La resistencia gástrica de estas cepas está fuertemente condicionada por el tipo de producto, tanto en las muestras recién elaboradas como durante el almacenamiento refrigerado. La resistencia gástrica puede aumentar, mantenerse sin cambios, o incluso disminuir en función del tipo de producto y de la temperatura de conservación. Estos resultados demuestran que una misma cepa puede modificar su resistencia a las barreras biológicas del tracto digestivo en función de la composición del producto usado como vehículo o de la temperatura de conservación hasta el consumo. En consecuencia estos fenómenos deberían ser considerados al momento de definir la funcionalidad de una cepa probiótica en relación a la matriz alimenticia utilizada como vehículo.

Agradecimientos

Los resultados de este trabajo han sido obtenidos en el marco del Proyecto ALI 119 (2008-2009) “Estudio de la viabilidad y funcionalidad de bacterias probióticas durante la vida de estante en leches fermentadas comerciales”, financiado por UCEL-Rosario.

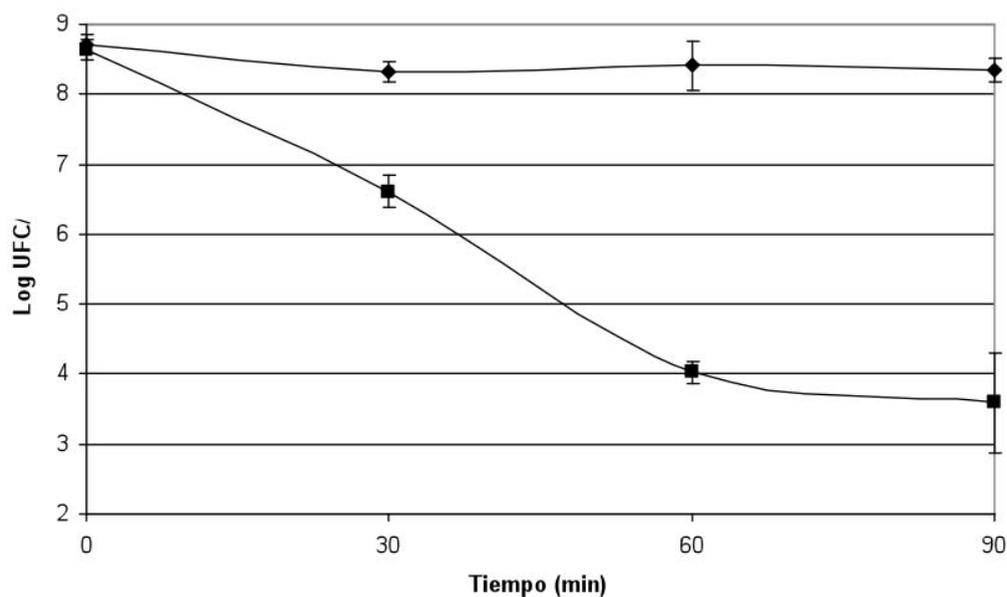


Figura 1 – Viabilidad de *L. casei* en leche fermentada comercial marca A sabor fresa sometida a digestión gástrica simulada a pH 3 (◆) y 2,5 (■) en ausencia de pepsina.

M. Céspedes, D. Mateolli, P. Cárdenas, M. Lescano, N. Aimaretti, G. Vinderola

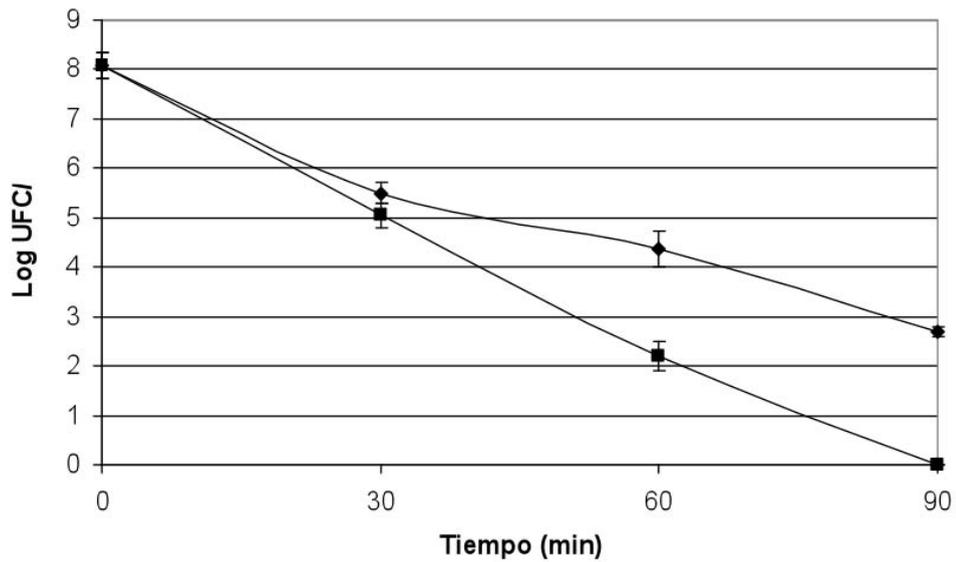


Figura 2 – Viabilidad de *L. casei* en leche fermentada comercial marca A sabor frutilla sometida a digestión gástrica simulada a pH 2,5 con (■) y sin (◆) pepsina (Merck).

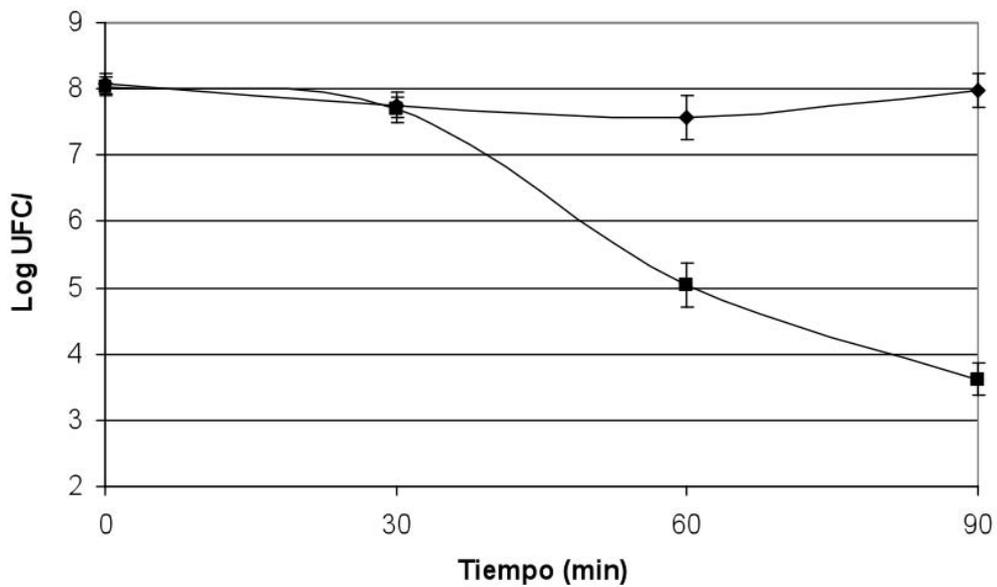


Figura 3 – Viabilidad de *L. casei* en leche fermentada comercial marca A sabor frutilla sometida a digestión gástrica simulada a pH 3 (◆) y 2,70 (■) con pepsina (Merck).

Cambios en la resistencia gástrica de *L. casei* en leches fermentadas

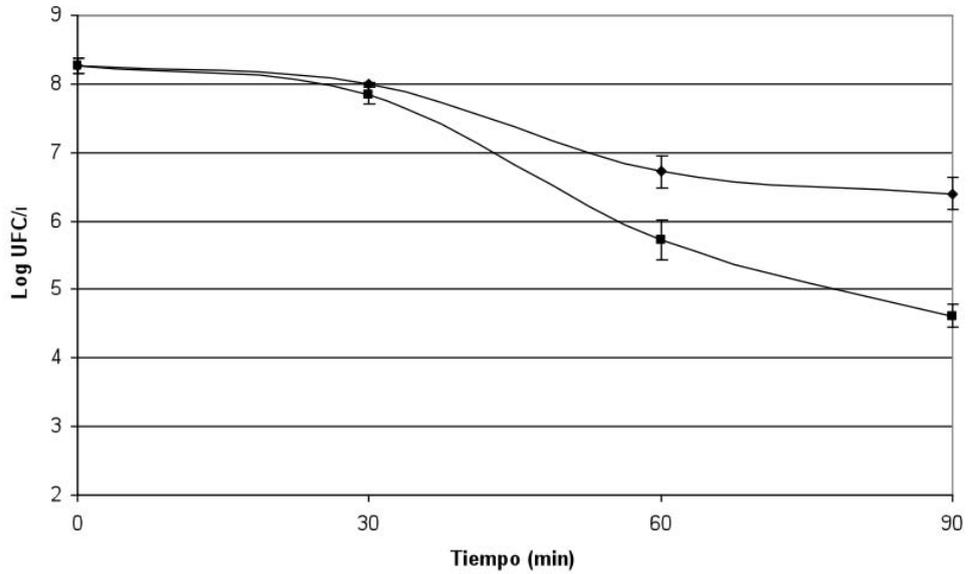


Figura 4 – Viabilidad de *L. casei* en leche fermentada comercial marca A sabor frutilla sometida a digestión gástrica simulada a pH 2,70 con pepsina Sigma (◆) y Merck (■).

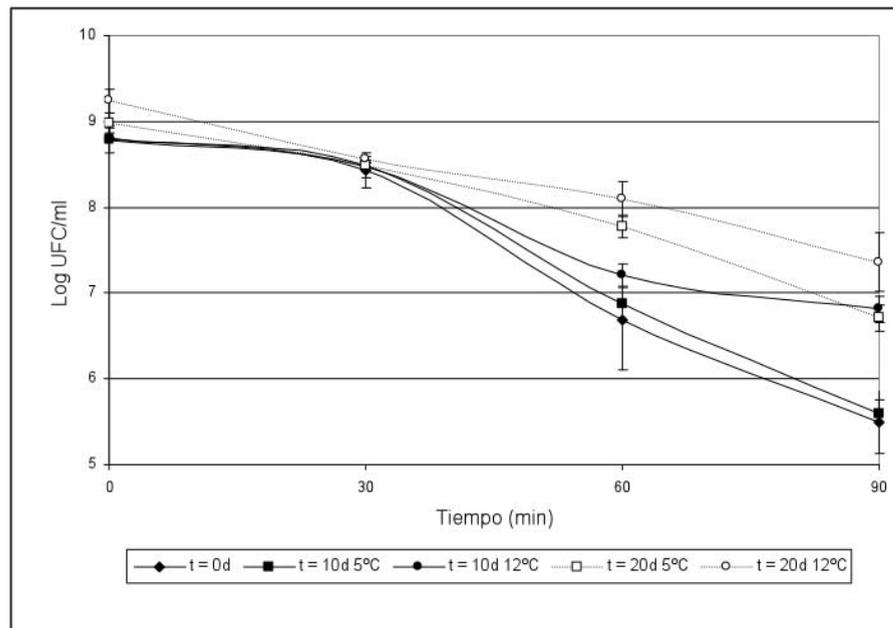


Figura 5 – Viabilidad de *L. casei* en leche fermentada marca A sabor natural durante la digestión gástrica simulada en muestras a tiempo cero y luego de 10 y 20 días de conservación a 5° y 12°C.

M. Céspedes, D. Mateolli, P. Cárdenas, M. Lescano, N. Aimaretti, G. Vinderola

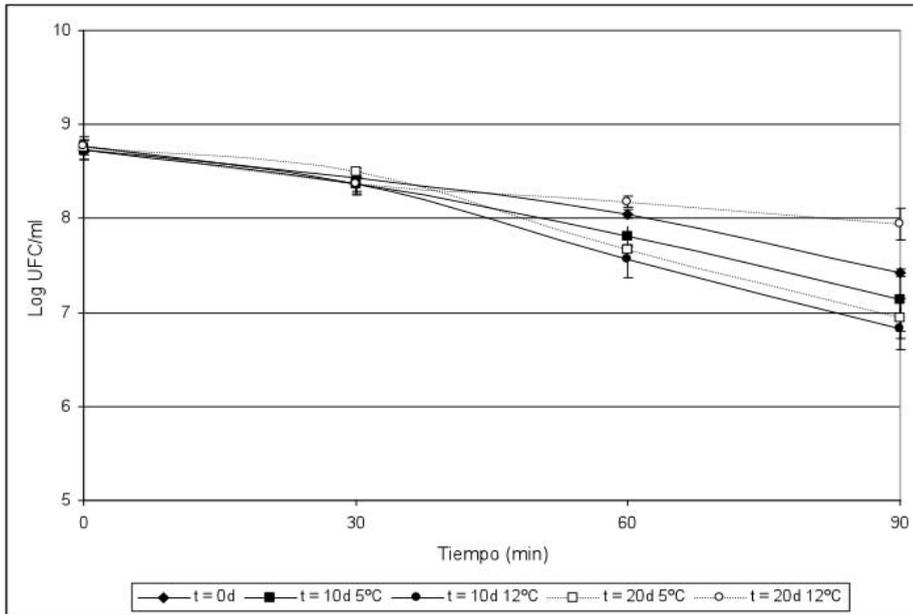


Figura 6 – Viabilidad de *L. paracasei* en leche fermentada marca A sabor frutilla durante la digestión gástrica simulada en muestras a tiempo cero y luego de 10 y 20 días de conservación a 5° y 12°C.

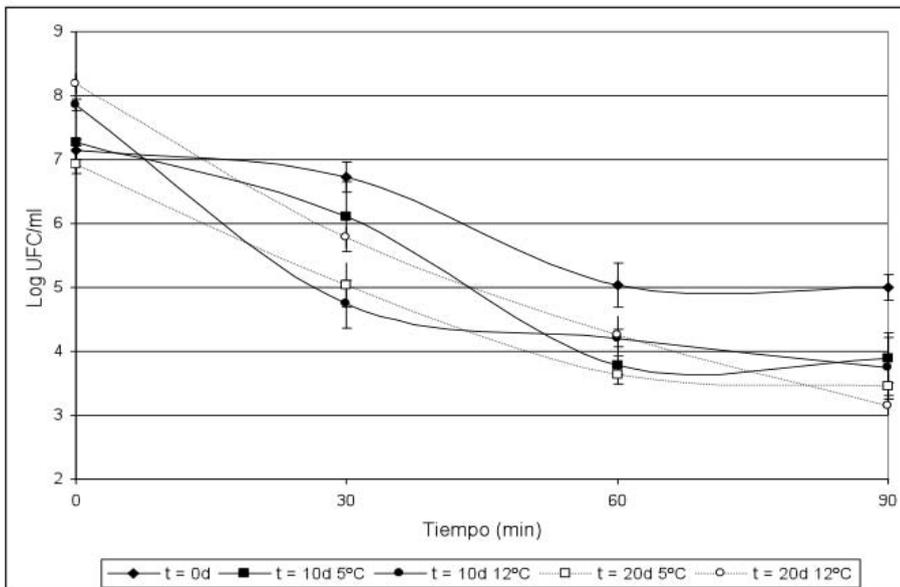


Figura 7 – Viabilidad de *L. casei* en leche fermentada marca B sabor natural durante la digestión gástrica simulada en muestras a tiempo cero y luego de 10 y 20 días de conservación a 5° y 12°C.

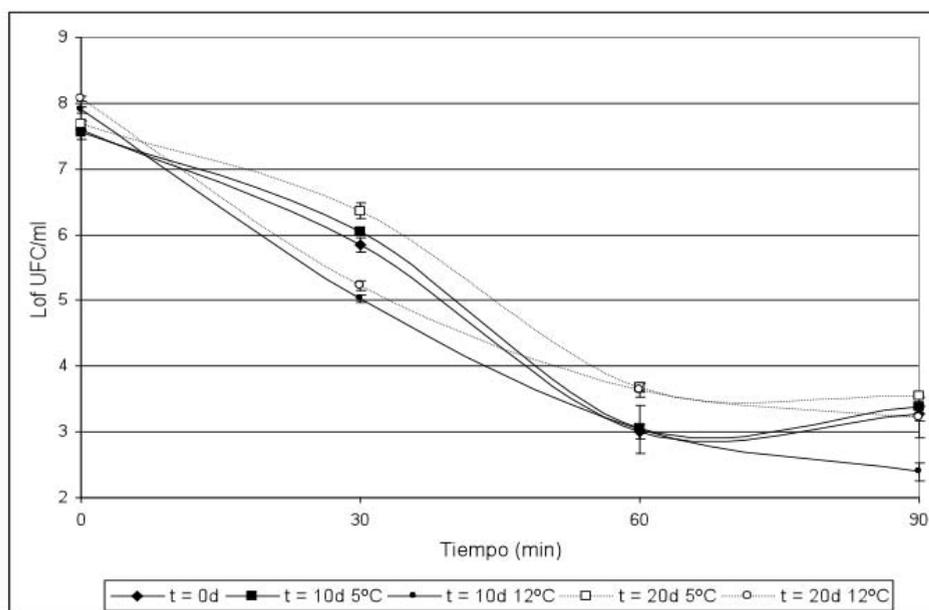
Cambios en la resistencia gástrica de *L. casei* en leches fermentadas

Figura 8 – Viabilidad de *L. casei* en leche fermentada marca B sabor frutilla durante la digestión gástrica simulada en muestras a tiempo cero y luego de 10 y 20 días de conservación a 5° y 12°C.

Recibido: 14/04/09. Aceptado: 28/05/09

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Birollo, G.A., Reinheimer, J. and Vinderola, G. 2000. "Viability of lactic acid microflora in different types of yoghurt" en *Food Res. Int.*, 33, 799-805.
- Champagne, C. and Gardner, N. 2005. "Challenges in the addition of probiotic cultures to foods" en *Crit. Reviews Food Sci. Nut.*, 45, 61-84.
- Evans, J.A., Scarcelli, S. and Swain, M.V.L. 2007. "Temperature and energy performance of refrigerated retail display and commercial catering cabinets under test conditions" en *Int. J. Refrig.*, 30, 398-408.
- Fang, S.B., Lee, H.C., Hu, J.J., Hou, S.Y., Liu, H.L. and Fang, H.W. 2009. "Dose-dependent effect of *Lactobacillus* GG on quantitative reduction of faecal rotavirus shedding in children" en *J. Trop. Pediatr.*, (E pub ahead of print).
- FAO/WHO (2002). "Guidelines for the evaluation of probiotics in food. Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization Working Group Report". http://www.fao.org/es/ESN/food/foodandfood_probio_en.stm
- Hahn, M. 2005. "Functional foods: what are they? How are they regulated? What claims can be made?" en *Am. J. Law & Med.*, 31, 305-340.
- Marteau, P., Minekus, A.M., Havenaar, R. and Huis in't Veld, J.H.J. 1997. "Survival of lactic acid bacteria in a dynamic model of the stomach and small intestine: validation and the effects of bile" en *J. Dairy Sci.*, 80, 1031-1037.
- Minelli, E.B. and Benini, A. 2008. "Relationship between number of bacteria and their probiotic effect" en *Microb. Ecol. Health Dis.*, 20, 180-183.
- Morelli, L. 2007. "In vitro assessment of probiotic bacteria: From survival to functionality". *Int. Dairy J.*, 17, 1278-1283.

- Puupponen-Pimi, R., Nohynek, L., Hartmann-Schmidlin, S., Khknen, M., Heinonen, M., Mtt-Riihinen, K. and Oksman-Caldentey, K.M. 2005. "Berry phenolics selectively inhibit the growth of intestinal pathogens" en *J. Appl. Microbiol.*, 98, 991-1000.
- Ross, R.P., Desmond, C., Fitzgerald, G.F. and Stanton, C. 2005. "Overcoming the technological hurdles in the development of probiotic foods – a review" en *J. Appl. Microbiol.*, 98, 1410-1417.
- Saarela, M., Virkajarvi, I., Alakomi, H.L., Sigvart-Mattila, P. and Matto, J. 2006. "Stability and functionality of freeze-dried probiotic *Bifidobacterium* cells during storage in juice and milk" en *Int. Dairy J.*, 16, 1477–1482.
- Snchez, B., Bressollier, P. and Urdaci, M.C. 2008. "Exported proteins in probiotic bacteria: adhesion to intestinal surfaces, host immunomodulation and molecular cross-talking with the host" en *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 54, 1-17.
- Sanders, M.E. and Huis in't Veld, J.H., 1999. "Bringing a probiotic-containing functional food to the market: microbiological, product, regulatory and labeling issues" en *Antoine van Leeuwenhoek*, 76, 293-315.
- Tuomola, E., Crittenden, R., Playne, M., Isolauri, E. and Salminen, S. 2001. "Quality assurance criteria for probiotic bacteria" en *Am. J. Clin. Nutr.* 73(suppl):393S–8S.
- Vinderola, C.G. and Reinheimer, J.A. 2000. "Enumeration of *Lactobacillus casei* in the presence of *L. acidophilus*, bifidobacteria and lactic starter bacteria in fermented dairy products" en *Int. Dairy J.*, 10, 271-275.
- Vinderola, C.G., Costa, G.A., Regenhardt, S. and Reinheimer, J.A. 2002a. "Influence of compounds associated with fermented dairy products on the growth of lactic acid starter and probiotic bacteria" en *Int. Dairy J.*, 12, 579-589.
- Vinderola, C.G., Mocchiutti, P. and Reinheimer, J.A. 2002b. "Interactions among lactic acid starter and probiotic bacteria used for fermented dairy products" en *J. Dairy Sci.*, 85, 721-729.
- Vinderola, C.G. and Reinheimer, J. 2003. "Lactic acid starter and probiotic bacteria: a comparative `in vitro´ study of probiotic characteristics and biological barriers resistance" en *Int. Dairy J.*, 36, 895-904.
- Vinderola, C.G., Duarte, J., Thangavel, D., Perdign, G., Farnworth, E. and Matar, C. 2005a. "Immunomodulating capacity of kefir" en *J. Dairy Res.*, 72, 195–202.
- Vinderola, C.G., Matar, C. and Perdign, G. 2005b. "Role of intestinal epithelial cells in the immune effects mediated by Gram positive probiotic bacteria. Involvement of Toll-like receptors" en *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 12, 1075–1084.
- Vinderola, G., de los Reyes-Gaviln, C. and Reinheimer, J. 2009a. "Probiotics and prebiotics in fermented milks" en: Ribeiro, C.P. and Passos, M.L. (eds.). *Contemporary Food Engineering*. CRC Press, Taylor & Francis Group (USA) (en prensa).
- Vinderola, G., Molinari, F., Prosello, W., Ghiberto, D. and Reinheimer J. 2009b. "Growth of *L. paracasei* A13 in argentinian probiotic cheese. Impact on the characteristics of the product" en *Int. J. Food Microbiol.* (enviado).
- Willcox, F. Hendrick, M. and Tobback P.1994. "A preliminary survey into the temperature conditions and residence time distribution of minimally processed MAP vegetables in Belgian retail display cabinets" en *Int. J. Refrig.*, 17, 436-444.