

Universidad Católica de Santa María
Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y
Biotechnológicas
Escuela Profesional de Ingeniería Biotechnológica



**Evaluación de la supervivencia de *Bifidobacterium sp.* en yogur
suplementado con inulina como prebiótico y comparación con un
yogur probiótico comercial mediante el modelo *in vitro* INFOGEST**

Tesis presentada por la Bachiller:

Cusirramos Montesinos, Romina de Lourdes

ORCID: 0000-0002-0659-022X

Para optar el Título Profesional de Ingeniero Biotechnólogo

Asesor:

Mg. Barreda del Carpio, Jaime Ernesto

ORCID: 0000-0003-4050-7466

Arequipa - Perú

2026

UCSM-ERP

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

INGENIERIA BIOTECNOLOGICA

TITULACIÓN CON TESIS

DICTAMEN APROBACIÓN DE BORRADOR

Arequipa, 15 de Diciembre del 2025

Dictamen: 011783-C-EPIB-2025

Visto el borrador del expediente 011783, presentado por:

2018245782 - CUSIRRAMOS MONTESINOS ROMINA DE LOURDES

Titulado:

**EVALUACIÓN DE LA SUPERVIVENCIA DE BIFIDOBACTERIUM SP. EN YOGUR SUPLEMENTADO
CON INULINA COMO PREBIÓTICO Y COMPARACIÓN CON UN YOGUR PROBIÓTICO COMERCIAL
MEDIANTE EL MODELO IN VITRO INFOGEST**

Nuestro dictamen es:

APROBADO

Título Profesional/Título de Segunda Especialidad/Grado Académico a optar:

INGENIERO BIOTECNOLOGO

**29630612 - TERAN DIANDERAS ADILMI MILAGRO
DICTAMINADOR**



**44810251 - TERAN HILARES RULY
DICTAMINADOR**



**45945764 - YUGRA CONDORI MONICA MEYLIN
DICTAMINADOR**



Evaluación de la supervivencia de Bifidobacterium sp. en yogur suplementado con inulina como prebiótico y comparación con un yogur probiótico comercial mediante el modelo in vitro INFOGEST

INFORME DE ORIGINALIDAD

16%

INDICE DE SIMILITUD

14%

FUENTES DE INTERNET

6%

PUBLICACIONES

6%

TRABAJOS DEL
ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1	hdl.handle.net Fuente de Internet	1 %
2	Submitted to Universidad Católica de Santa María Trabajo del estudiante	1 %
3	sedici.unlp.edu.ar Fuente de Internet	<1 %
4	Submitted to Singapore Polytechnic Trabajo del estudiante	<1 %
5	www.coursehero.com Fuente de Internet	<1 %
6	Submitted to University for Business and Technology Trabajo del estudiante	<1 %
7	apps.ucsm.edu.pe Fuente de Internet	<1 %
8	www.slideshare.net Fuente de Internet	<1 %
9	repositorio.uchile.cl Fuente de Internet	<1 %
10	pdffox.com Fuente de Internet	<1 %

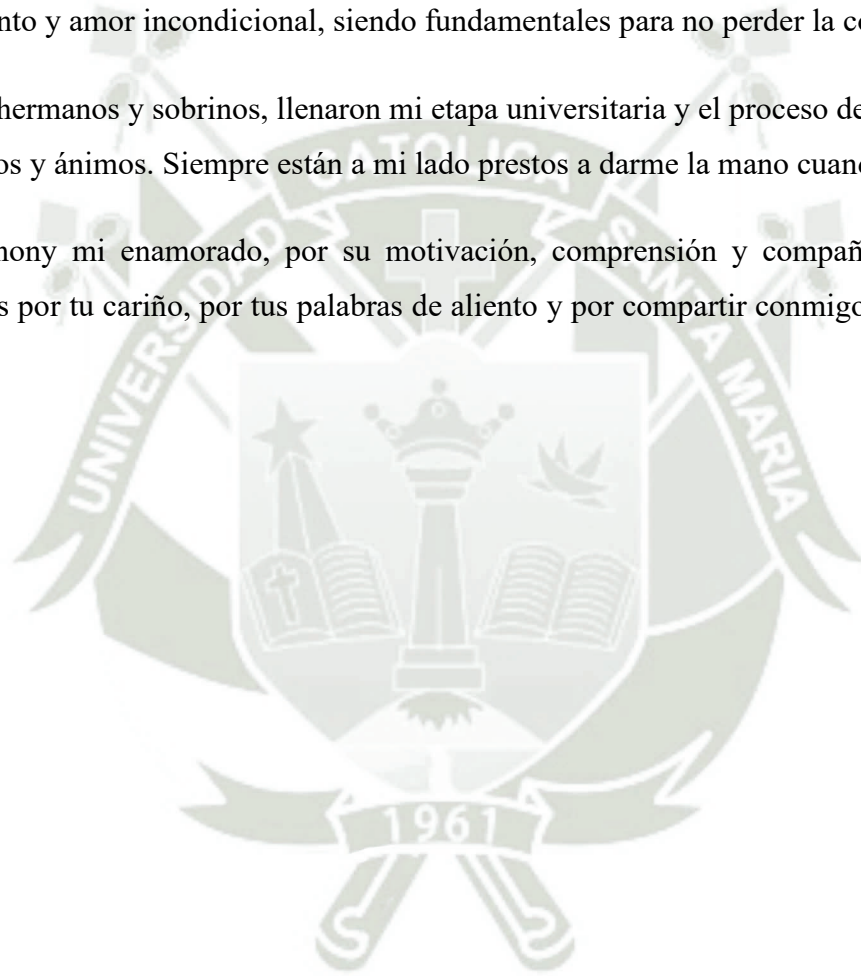
DEDICATORIA

Dedico la presente investigación a Dios, por darme la fortaleza, sabiduría y perseverancia para mantener mis objetivos claros y culminar con éxito esta etapa.

A mis padres Néstor y Consuelo, por ser mi pilar e inspiración que me llenaron con palabras de aliento y amor incondicional, siendo fundamentales para no perder la confianza en mí.

A mis hermanos y sobrinos, llenaron mi etapa universitaria y el proceso de investigación de consejos y ánimos. Siempre están a mi lado prestos a darme la mano cuando los necesito.

A Anthony mi enamorado, por su motivación, comprensión y compañía incondicional. Gracias por tu cariño, por tus palabras de aliento y por compartir conmigo este y todos mis logros.

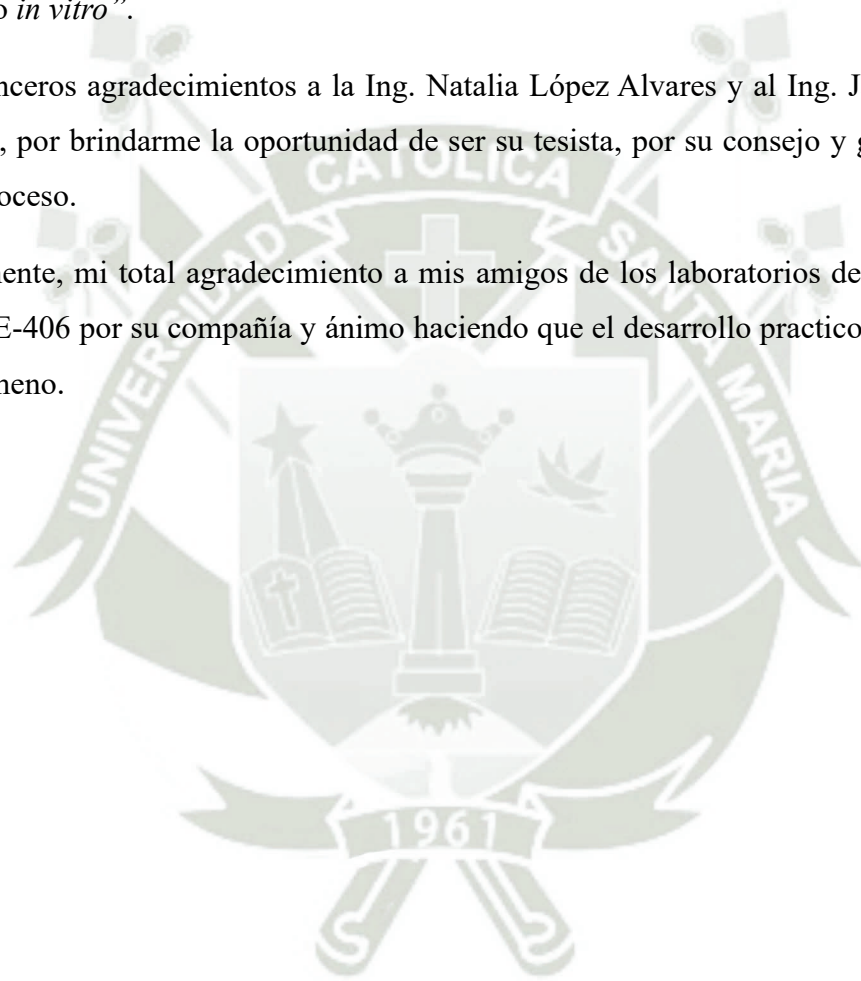


AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi profundo agradecimiento al Vicerrectorado de Investigación de la Universidad Católica de Santa María que financió el desarrollo de la investigación –tipo 2, resolución N° 29002-R2022 “Elaboración de una nueva línea de yogur Nalé de la UCSM adicionado con prebióticos, probióticos y su evaluación en condiciones gástricas en un modelo *in vitro*”.

Mis sinceros agradecimientos a la Ing. Natalia López Alvares y al Ing. Jaime Barreda del Carpio, por brindarme la oportunidad de ser su tesista, por su consejo y guía durante todo este proceso.

Igualmente, mi total agradecimiento a mis amigos de los laboratorios de investigación E-405 y E-406 por su compañía y ánimo haciendo que el desarrollo práctico de mi tesis fuera más ameno.



RESUMEN

El consumo de probióticos en productos lácteos ha aumentado progresivamente los últimos diez años, por lo que es necesario conocer si estos microorganismos son capaces de sobrevivir a las condiciones del sistema gastrointestinal y colonizar la microbiota intestinal. El objetivo de la presente investigación fue evaluar la supervivencia de la cepa *Bifidobacterium sp.* presente en yogur suplementado con prebiótico inulina al 5% y 6.5% y compararla con un yogur comercial, frente a las condiciones gastrointestinales simuladas mediante el método *in vitro* INFOGEST.

En la presente investigación se empleó un protocolo descrito por Minekus (2014) y posteriormente actualizado por Brodkorb (2019), el cual fue modificado dividiendo la fase intestinal en fase duodenal y fase intestinal. Durante la fase duodenal se evaluó la tolerancia de las bacterias al estrés ácido ocasionado por la exposición al jugo pancreático y a las sales biliares, mientras que la fase intestinal tiene como finalidad simular la colonización de las bacterias en el intestino distal, permitiendo observar su viabilidad a largo plazo.

Se observó que luego de cada fase la viabilidad bacteriana disminuía progresivamente, la muestra comercial YoG2 mostró gran estabilidad comparable al yogur suplementado con inulina al 6.5% que presentó una disminución del 11% en la viabilidad bacteriana en relación con el yogur comercial, lo que podría asociarse a las características optimizadas de los productos industriales, los cuales suelen incorporar estabilizantes y conservantes que favorecen la estabilidad del producto y la viabilidad de las bacterias durante el almacenamiento. La muestra preparada mostró un crecimiento estable, indicando su potencial para colonizar con éxito la microbiota intestinal.

Palabras clave: *Bifidobacterium sp.*, INFOGEST, viabilidad bacteriana.

ABSTRACT

Over the past decade, the consumption of probiotic-enriched dairy products has steadily increased, highlighting the importance of determining whether these microorganisms can withstand gastrointestinal conditions and successfully colonize the intestinal microbiota. The purpose of this study was to assess the survival of a *Bifidobacterium* sp. strain present in yogurt supplemented with 5% and 6.5% inulin, and to compare it with a commercial yogurt under simulated gastrointestinal conditions using the INFOGEST in vitro digestion model.

This study followed the protocol proposed by Minekus (2014) and Brodkorb (2019), with a modification that separated the intestinal stage into a duodenal phase and a distal-intestinal phase. The duodenal phase was used to evaluate bacterial tolerance to acid stress caused by exposure to pancreatic secretions and bile salts, while the distal-intestinal phase aimed to simulate the conditions needed for potential colonization and to assess long-term bacterial viability.

Overall, bacterial viability decreased progressively across each digestive phase. The commercial sample (YoG2) demonstrated greater stability, showing higher survival levels than the sample supplemented with 6.5% inulin, which exhibited an approximately 11% reduction in viability compared to the commercial yogurt. This lower survival may be linked to the degree of optimization typically found in industrially processed products, which often include stabilizers and preservatives that help maintain bacterial stability and viability throughout storage.. Nonetheless, the formulated yogurt showed consistent growth, suggesting a promising ability to successfully colonize the intestinal microbiota.

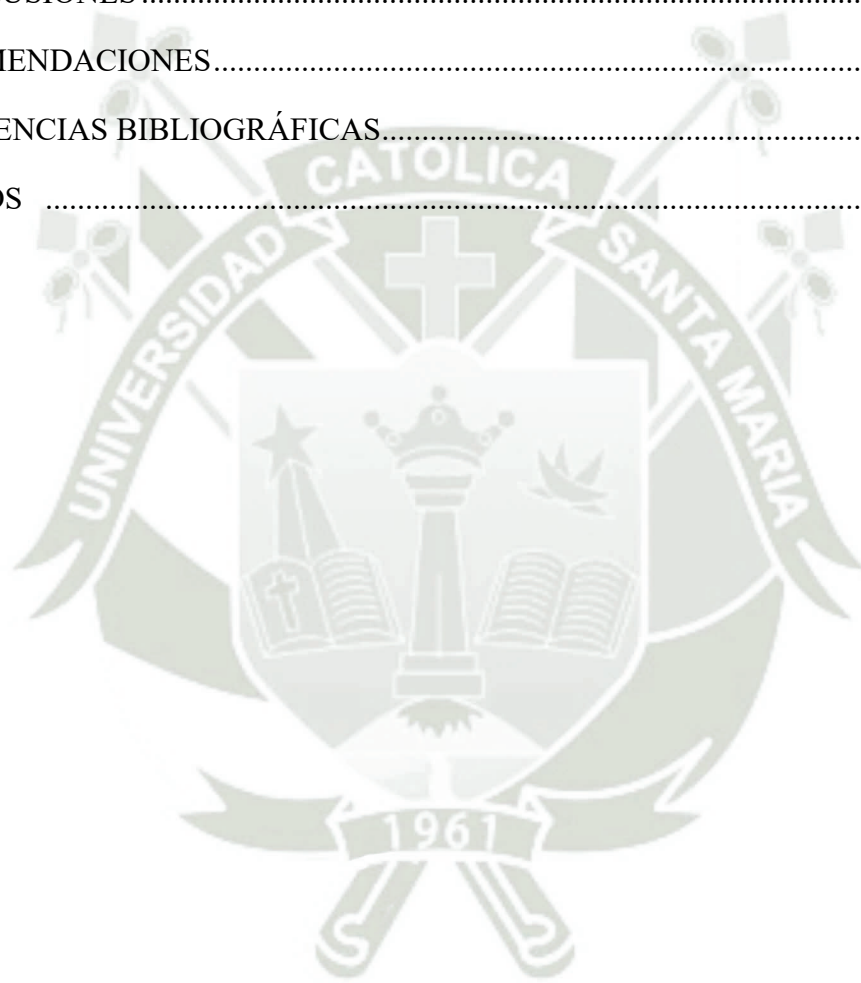
Keywords: *Bifidobacterium* sp., INFOGEST, bacterial viability

INDICE

DEDICATORIA	
AGRADECIMIENTOS	
RESUMEN	
ABSTRACT	
INTRODUCCIÓN	1
HIPOTESIS.....	3
OBJETIVOS	4
Objetivo general.....	4
Objetivos específicos	4
TABLA DE VARIABLES E INDICADORES	5
CAPITULO I	6
1. MARCO TEORICO	7
1.1. Probiótico	7
1.1.1. Antecedentes históricos	7
1.1.2. Microbiota y Microbioma.....	7
1.1.3. Mecanismo de acción de los probióticos.....	8
1.1.4. Efecto de los probióticos en el microbiota intestinal.....	9
1.1.5. Filogenia de las bacterias ácido lácticas	10
1.1.6. Selección de cepas probióticas	11
1.1.7. Determinación de probióticos FAO/WHO ^[36]	12
1.1.8. Criterios para un probiótico ideal	21
1.2. Bifidobacterium	22
1.2.1. Taxonomía del género Bifidobacterium	22
1.2.2. Características fisiológicas	24
1.2.3. Fermentación láctica.....	24
1.3. Yogur	25
1.3.1. Valor nutricional	25
1.3.2. Proceso de elaboración	26

1.3.3.	Beneficios	27
1.4.	Sistema gastrointestinal	28
1.4.1.	Métodos de digestión <i>in vitro</i>	30
1.4.2.	Método de digestión <i>in vitro</i> estático INFOGEST	30
CAPITULO II		31
2.	MATERIALES Y METODOLOGIA	32
2.1.	Lugar de ejecución.....	32
2.2.	Materiales	32
2.2.1.	Muestra biológica	32
2.2.2.	Material de laboratorio	32
2.2.3.	Insumos y reactivos químicos	32
2.2.4.	Enzimas	33
2.2.5.	Equipos	33
2.3.	Metodología.....	34
2.3.1.	Cálculo de cultivo para la preparación del yogur.....	34
2.3.3.	Método <i>in vitro</i> INFOGEST	36
2.3.4.	Preparación de soluciones stock	36
2.3.5.	Preparación de fluidos simulados	37
2.3.6.	Preparación de enzimas	38
2.3.7.	Preparación de mesa y lugar de trabajo	38
2.3.8.	Preparación de medio de cultivo	39
2.3.9.	Técnica de sembrado	40
2.3.10.	Método <i>in vitro</i> INFOGEST	41
2.3.10.1.	Fase Oral.....	41
2.3.10.2.	Fase Gástrica.....	42
2.3.10.3.	Fase Duodenal	43
2.3.10.4.	Fase Intestinal	44
2.3.11.	Cuantificación de colonias ácido lácticas	44

CAPITULO III.....	46
3. RESULTADOS Y DISCUSION.....	47
3.1. Evaluación sensorial de yogur probiótico suplementado con inulina	47
3.2. Evaluación microbiológica luego de la fermentación y almacenamiento	48
3.3. Supervivencia de <i>Bifidobacterium sp.</i> luego de la digestión.....	49
3.4. Comparar la viabilidad de <i>Bifidobacterium sp.</i> en yogur prebiótico comercial ..	51
CONCLUSIONES	54
RECOMENDACIONES.....	55
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	56
ANEXOS	67



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Filogenia de bacterias LAB	11
Tabla 2.	Microorganismos empleados como probióticos ^a	14
Tabla 3.	Efecto anticancerígeno de los probióticos ^c	17
Tabla 4.	Taxonomía del género <i>Bifidobacterium</i> (44).....	22
Tabla 5.	Especies <i>Bifidobacterium</i> , periodo de su descripción y su hábitat (75)	22
Tabla 6.	Tabla de nutricional en 100gr y 245gr de yogur (2)	25
Tabla 7.	Cuadro de tasa de inoculación	34
Tabla 8.	Componentes de soluciones stock	36
Tabla 9.	Concentraciones de Fluidos Simulados	37
Tabla 10.	Preparación de stocks de enzimas y sales biliares	38
Tabla 11.	Diluciones sembradas de cada Fase del método INFOGEST	45
Tabla 12.	Comparación de la viabilidad en yogur con inulina 6.5% y yogur YoG2	52

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.	(A)Vista 40X <i>Bifidobacterium sp.</i> (B) <i>Bifidobacterium sp.</i> luego de 48 h 37°C	24
Figura 2.	Fotografía del diagrama de flujo de la elaboración de yogur	27
Figura 3.	Diagrama del Sistema digestivo	29
Figura 4.	Diferencia de color entre cultivos	35
Figura 5.	Curva de acidificación durante la fermentación	36
Figura 6.	Fotografía de los materiales en la campana extractora	39
Figura 7.	Técnica de sembrado en placa vertida con 100 µL de muestra por placa	40
Figura 8.	Temperatura ideal para sembrar las muestras	40
Figura 9.	Protocolo del método de digestión <i>in vitro</i> INFOGEST	41
Figura 10.	Digestión <i>in vitro</i> fase oral	42
Figura 11.	Fotografía del ajuste de pH a 3 usando potenciómetro	42
Figura 12.	Fotografía del ejemplo de rotulado de placas	42
Figura 13.	Digestión fase gástrica	43
Figura 14.	Fotografía de la corrección de pH a 7	43
Figura 15.	Digestión fase duodenal	44
Figura 16.	Digestión fase intestinal	44
Figura 17.	Fotografía de placas con diluciones 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} de la Fase Oral	45
Figura 18.	Viabilidad de <i>Bifidobacterium sp.</i> en Fase oral y gástrica	49
Figura 19.	Viabilidad de <i>Bifidobacterium sp.</i> en Fase intestinal y duodenal	50
Figura 20.	Comparación de viabilidad en yogur con inulina 6.5% y yogur YoG2	53

LISTADO DE ABREVIATURAS

- BAL Bacterias ácido lácticas
- Agar MRS Man, Rogosa y Sharpe Agar
- GRAS Generally Recognized As Safe (Generalmente reconocido como seguro)
- SCFAs Short-Chain Fatty Acids (Ácidos grasos de cadena corta)
- pH Indicador de potencial de Hidrogeno
- μm Micrómetro
- mL Mililitro
- mg Miligramo
- U Unidad enzimática
- UFC Unidades Formadoras de Colonias
- DVS Direct Vat Set (Cultivo de adición directa)
- SSF Fluido Salival Simulado
- SGF Fluido gástrico Simulado
- SIF Fluido Intestinal Simulado

INTRODUCCIÓN

Se considera que el yogur se descubrió accidentalmente entre los años 5000 y 10000 a.C. con la domesticación de animales productores de leche. En esa época, los pastores en el Oriente medio transportaban la leche en sacos elaborados con intestinos de animales, lo que provocaba que esta se cuajara y agriara debido a las secreciones intestinales. Este proceso permitió prolongar el tiempo de conservación de la leche (2). La fermentación constituye uno de los procesos de preservación de alimentos más antiguos, ya que extiende su vida útil y mejora sus características sensoriales y nutricionales. Se trata de una serie de procesos metabólicos que obtienen energía a partir de sustratos orgánicos en condiciones de anaerobiosis (3). El yogur y otras bebidas fermentadas se producen por la fermentación y la acidificación de la leche, donde intervienen principalmente las cepas de *Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*. Como resultado, se obtiene un producto rico en calcio y una importante fuente de fósforo, potasio, vitamina A, vitamina B2 y vitamina B12 (2).

El yogur es un portador de probióticos, los cuales son definidos como microorganismos que, al ser administrados en cantidades adecuadas, confieren beneficios a la salud del hospedador (3). Estos se pueden clasificar en dos grupos: los cultivos estándar y los cultivos probióticos. Los cultivos estándar corresponden a los yogures que contienen *Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*, mientras que los cultivos probióticos son lo que trabajan con cultivos adicionales conocidos como cepas probióticas son *Bifidobacteria* y *Lactobacillus acidophilus* (2). Asimismo, desde 1901 se reconoce a *Lactobacillus delbrueckii* como la primera especie descrita dentro del género *Lactobacillus*. En los últimos años, los investigadores agruparon más de 250 especies por su taxonomía bajo el género *Lactobacillus* (3).

La importancia de la incorporación de probióticos en el yogur reside en su capacidad para mejorar el balance nutricional y microbiológico del tracto digestivo humano. Estos microorganismos actúan como vectores que transportan componentes activos a muchos sitios objetivos en el tracto digestivo. Sus efectos varían dependiendo de la cepa. La mayoría de los efectos ocurren solo cuando se ingiere los microorganismos vivos (4). Para que un probiótico sea efectivo, debe sobrevivir el ambiente ácido del estómago y atravesar el intestino delgado. Por este motivo, se recomienda que su consumo sea en cantidades elevadas, dado que la supervivencia de las bacterias probióticas puede verse afectada por diferentes factores como la acidez gástrica, las sales biliares y las secreciones pancreáticas (4).

Esta dinámica comunidad de microorganismos, que conforma la microbiota intestinal, cumple un papel fundamental al mantener la homeostasis inmunitaria y metabólica, así como la protección frente a patógenos. Además, participa en la síntesis de vitaminas esenciales que el hospedador no puede producir. Las bacterias ácido lácticas son la clave para la producción de la vitamina B12, específicamente las especies del género *Bifidobacterium sp.* son las principales productoras de folato. Esta vitamina interviene en procesos metabólicos, además de participar en la síntesis y reparación de ADN.

Otras vitaminas también sintetizadas en la microbiota intestinal son la vitamina K, riboflavina, biotina, ácido nicotínico, ácido pantoténico, piridoxina y tiamina (9). Entre los principales géneros bacterianos que conforman la microbiota intestinal se encuentran: *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, y *Veillonella*, por lo general a una concentración de 10^3 a 10^4 UFC/mL en el duodeno y yeyuno. En el Íleon predominan los géneros *Enterobacteria*, *Enterococcus*, *Bacteroides*, *Clostridium*, *Lactobacillus*, y *Veillonella*, a una concentración de 10^6 a 10^8 UFC/mL. En el colon, las bacterias intervienen en la biotransformación de ácidos biliares secundarios, los que se reabsorben o se eliminan por las heces (5).

En la presente tesis se analizarán muestras de yogur suplementado con cepas probióticas mediante el método estático *in vitro* INFOGEST, utilizado para simular el proceso de la digestión gastrointestinal de los alimentos (6). Este método permitirá evaluar la supervivencia de las cepas en cada etapa de la digestión en función de la temperatura y el pH. Se considerará un resultado satisfactorio cuando luego de la fase gástrica la concentración de microorganismos sea superior a 10^4 UFC/mL, debido a que las condiciones químicas de esta fase resultan adversas para las bacterias. Por otro lado, en la fase Intestinal se espera un incremento significativo en la concentración de las cepas (7).

La amplia influencia de los probióticos en la microbiota intestinal y su importancia en el organismo plantea la interrogante de si la producción tradicional de productos lácteos, ampliamente descrita en la literatura, garantiza la viabilidad bacteriana desde la producción hasta su consumo. Por ello, la presente tesis tiene como objetivo evaluar la supervivencia de cepas probióticas del género *Bifidobacterium sp.* presentes en el yogur frente a las condiciones del sistema gastrointestinal, utilizando el método *in vitro* INFOGEST.

HIPOTESIS

Dado que la incorporación de inulina como prebiótico a concentraciones 5% y 6.5% al yogur podría incrementar la viabilidad y estabilidad de las cepas probióticas *Bifidobacterium sp.* durante su exposición a las condiciones simuladas del sistema gastrointestinal (método *in vitro* INFOGEST), es probable que superen al recuento bacteriano de un yogur probiótico comercial de referencia.



OBJETIVOS

Objetivo general

- Evaluar la supervivencia de *Bifidobacterium* sp. en un yogur suplementado con inulina como prebiótico y compararlo con un yogur probiótico comercial mediante el modelo de digestión *in vitro* INFOGEST.

Objetivos específicos

- Preparar un yogur probiótico suplementado con inulina como prebiótico.
- Aplicar el modelo de digestión *in vitro* INFOGEST para evaluar la supervivencia de *Bifidobacterium* sp. en yogur prebiótico preparado y yogur comercial.
- Comparar la viabilidad de la cepa probiótica *Bifidobacterium* sp. presente en el yogur prebiótico y yogur comercial bajo condiciones gastrointestinales simuladas.

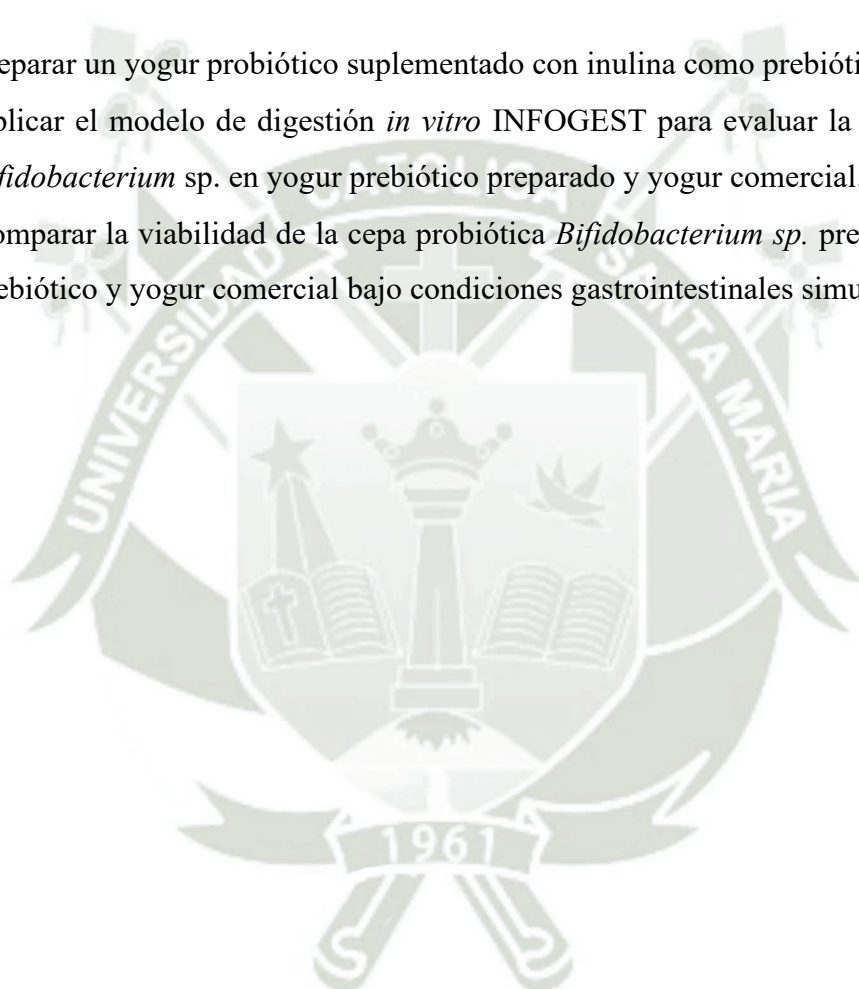


TABLA DE VARIABLES E INDICADORES

Tipo de variable	Variable	Definición	Indicadores	Unidad
Independiente	Concentración de Inulina	Porcentaje de Inulina agregada al yogur probiótico	5% y 6.5%	% (porcentual)
	Viabilidad inicial	Recuento luego de la fermentación	Log ₁₀ CFU/mL	Log ₁₀ UFC/mL
Dependiente	Supervivencia de <i>Bifidobacterium sp.</i>	Viabilidad bacteriana luego de la digestión <i>in vitro</i> .	Recuento bacteriano luego de cada fase	Log ₁₀ UFC/mL
	Cepa probiótica	Identidad de la cepa evaluada	Visualización de crecimiento de colonias	-
Controlada	Condiciones de fermentación	Parámetros de elaboración	Tiempo, temperatura, pH final	°C, h, pH
	Condiciones de digestión <i>in vitro</i>	Parámetros del modelo INFOGEST	pH, concentración enzimática, tiempo de digestión	pH U/mL, U/mg minutos



CAPITULO I

1. MARCO TEORICO

1.1.Probiótico

1.1.1. Antecedentes históricos

El término “probiótico” proviene del griego y significa “para la vida”. Fue empleado por Lilley y Stillwell en 1965, para describir las sustancias secretadas por los microorganismos que estimulan el crecimiento de otros. Existen registros que datan del año 2500 a.C. donde los sumerios inoculaban la leche para inducir la fermentación (1). Más adelante cerca de los años 5000-10000 a.C., en el Medio Oriente, la leche era transportada en sacos fabricados a partir de intestinos vacunos, lo que provoca que la leche se cuajara y se conservara de forma natural (2).

En 1901 los investigadores clasificaron diversas bacterias según la taxonomía microbiana, identificando a *Lactobacillus delbrueckii* como la primera especie dentro el género *Lactobacillus* (2,3). El investigador ruso Elie Metchnikoff, ganador de un premio nobel, investigó las especies probióticas encontrando que la longevidad en la población Bulgaria estaba relacionada al consumo del yogur que contenía lactobacilos, en otras palabras, concluyó que estas bacterias tenían un impacto positivo en la salud humana (9,10).

A inicios del siglo XXI, la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y Alimentación, Organización Mundial de la Salud (FAO & WHO 2001) definió a las especies probióticas como: “Microorganismos vivos que al ser consumidos en cantidades adecuadas benefician al hospedador mejorando su microbiota”. Luego la Asociación Científica Internacional de Probióticos y prebióticos (ISAPP) enfatizó en la relación de la especificidad de la cepa y los efectos probióticos, resaltando que los beneficios pueden ser compartidos entre la mayoría de las cepas del mismo grupo taxonómico (11,12).

1.1.2. Microbiota y Microbioma

La microbiota es una comunidad de microorganismos compuesta de aproximadamente 100 billones entre los que se incluyen bacterias, virus, hongos y protozoos (8). Esta comunidad microbiana se compone de anaerobios estrictos, anaerobios facultativos y aproximadamente 100 aerobios, se estima que se compone de 35000 especies bacterianas (15,16).

El conjunto de genomas de estos microorganismos se denomina microbioma, el cual es considerado como un órgano virtual en el cuerpo (8). El microbioma alberga más de tres millones de genes que tienen la capacidad de producir variedad de vitaminas, sintetizar

aminoácidos esenciales y no esenciales, así como llevar a cabo la biotransformación de los ácidos biliares (8,15).

La colonización del tracto gastrointestinal ocurre después del nacimiento, debido a la exposición a enfermedades, antibióticos y cambios en la dieta lo que genera desequilibrios en la microbiota (). Asimismo, se ha observado que el tipo de alumbramiento influye en la composición de la microbiota, los bebés nacidos por vía vaginal presentan gran cantidad de lactobacilos debido a la carga de estos microorganismos en la flora vaginal materna. En cambio, los bebés nacidos por cesárea muestran una microbiota reducida y en su mayoría una colonización por el género *Bacteroides* y anaerobios facultativos como las especies de *Clostridium* (14).

Durante el primer año de vida, la población microbiana incrementa progresivamente y presenta una composición distinta en todos los individuos debido a factores genéticos y ambientales. Por otro lado, en la adultes la microbiota presenta una estabilidad relativa, sin embargo, a partir de los 65 años debido al cambio de dieta y el sistema inmune, las colonias *Clostridium cluster IV* y *XIVa* se incrementan y las colonias de *Bifidobacterium* decrecen considerablemente (9,13,17).

Generalmente, la microbiota se compone de 6 filos incluyendo *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Fusobacteria*, y *Verrucomicrobia*. Además de hongos como *Candida*, *Saccharomyces*, *Malassezia*, y *Cladosporium* (13,19). Además, Se presentan otros microorganismos como *eukarya* (levaduras), virus (fagos) y arqueas (*M. smithii*) (20). La densidad bacteriana aumenta en el intestino delgado y en el intestino grueso se eleva a un aproximado de 10^{11} - 10^{12} bacteria por gramo de contenido colónico, lo que representa el 60% de la masa fecal (21).

1.1.3. Mecanismo de acción de los probióticos

Existe un gran potencial en ascenso en el campo de los probióticos, gracias a sus mecanismos principales como lo son la exclusión competitiva de patógenos, mejora de las funciones de la barrera intestinal, inmunomodulación en el cuerpo del huésped y la producción de neurotransmisores (22).

La barrera intestinal es protegida por una capa mucosa, péptidos antimicrobianos, secreción de IgA y el complejo de adhesión de la unión epitelial. Si esta barrera se ve comprometida, los antígenos microbianos llegan a la submucosa y desencadenan un desorden intestinal concluyendo en la enfermedad inflamatoria intestinal (18).

Los probióticos pueden mejorar la respuesta inmune, activando células inmunes no específicas, las que contrarrestan a las células cancerígenas, induciendo a la producción de IL-12 y activando células NK. Además, contrarrestan las alergias mediante el balance de Th1 y Th2 (107).

Los mecanismos usados por las especies bacterianas probióticas para reducir el crecimiento de patógenos son variados e incluyen: la creación de un ambiente hostil para su crecimiento, eliminación de sitios receptores, competir por nutrientes esenciales, secreción de ácidos orgánicos y sustancias antibacteriales como el Bacitracin; un lipopéptido catiónico cíclico secretado por especies del grupo *B. subtilis* (87,108).

Algunas cepas de *Bifidobacterium* como *B. bifidum*, han demostrado producir compuestos antimicrobianos como Bifidocin B, el cual ha demostrado ser eficaz contra bacterias Gram positivas como *Listeria*, *Enterococcus*, *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, y *Pediococcus*. Sin embargo, no mostro efecto en las bacterias Gram negativas. Por otro lado, la cepa *B. bifidum* NCDO 1452, produce el compuesto Bifidin, el cual inhibe el crecimiento de bacterias gran negativas como *E. coli*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus flavus* y *Pseudomonas fluorescens* (23,109).

1.1.4. Efecto de los probióticos en el microbiota intestinal

La colonización microbiana depende de diferentes factores, como la cantidad de oxígeno, condiciones químicas, intervención del sistema inmune y la nutrición del hospedador. Los beneficios del consumo de probióticos dependen del tipo de cepa y la microbiota del hospedador, sus interacciones pueden ser metabólicas, microbiológicas, fisiológicas, neurológicas, endocrinológicas e inmunológicas (24). Al ser ingeridos pueden modificar la microbiota del hospedador, suprimir patógenos, inducir a la inmunomodulación, simular la proliferación de células epiteliales, intervenir en la diferenciación y fortalecimiento de la barrera intestinal (25).

Se ha observado que la inestabilidad de la microbiota intestinal favorece el desarrollo de desórdenes de adicción, siendo el más común es el alcoholismo, si se excede su consumo durante la adolescencia puede provocar alteraciones inmediatas y perennes afectando la población microbiana (26). La regulación adecuada de la flora intestinal fortalece el sistema inmunológico, contribuye al ajuste de desórdenes metabólicos y enfermedades intestinales.

El consumo del yogur suplementado con cepas probióticas de *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* ha demostrado una mejora en pacientes con la enfermedad inflamatoria intestinal (IBD) (27). Uno de los principales beneficios del consumo de cepas de *Bifidobacterium* (*B. longum subs.*, *B. infantis*, *B. longum subs. longum*, *B. bifidum*, y *B. breve*) es su capacidad para la digestión de los oligosacáridos de la leche humana (HMOs) y las fibras vegetales, debido a que el sistema gastrointestinal carece de las glucosidasas necesarias para degradar estos complejos y aprovecharlos como fuente de energía (28).

1.1.5. Filogenia de las bacterias ácido lácticas

La filogenia estudia la evolución de un grupo de microorganismos, mediante el análisis de la evolución de los genes es posible identificar las especies en diversas muestras. Con el fin de identificar diversos microorganismos se emplea la secuencia de análisis 16S rDNA, que es aislada, alineada y comparada con secuencias de referencia (29).

Las bacterias ácido lácticas (BAL) se caracterizan por ser Gram positivas, no esporuladas, con morfología de bacilos y cocos, se presentan como no aerobios, pero si aerotolerantes. Estas bacterias son usadas en la industria alimentaria, específicamente en los alimentos lácteos, debido a que fermentan azúcares, hidrolizan de proteínas e influyen en las características organolépticas del producto final (30,31).

Según la secuencia de los genes 16S y 23S rRNA, las bacterias Gram positivas se clasifican en dos grupos principales, dependiendo de la composición bases en el DNA si este tiene menos del 50 mol% de guanina más citosina (G+C) se trata del reino *Firmicutes*, el cual agrupa a 250 géneros especificados en la Tabla 1. Por otro lado, si el contenido de guanina y citocina es mayor (>50 mol%) se clasifican dentro del reino *Actinobacteria* (32,33,34). Clasificados de la siguiente manera:

Tabla 1. Filogenia de bacterias LAB

	Reino	Genero	Especie
		<i>Lactobacillus</i>	<i>L. acidophilus</i> <i>L. rhamnosus</i> <i>L. casei</i> <i>L. lactis</i>
Menor 50 mol% G+C	<i>Firmicutes</i>	<i>Lactococcus</i> <i>Streptococcus</i> <i>Enterococcus</i> <i>S. aureus</i> <i>Bacillus</i>	<i>S. thermophilus</i> <i>B. subtilis</i> <i>B. clausii</i>
Mayor 50 mol% G+C	<i>Actinobacteria</i>	<i>Bifidobacterium</i> <i>Corynebacterium</i> <i>Propionibacterium</i> <i>Brevibacterium</i> <i>Microbacterium</i>	<i>B. longum</i> <i>B. bifidum</i> <i>B. animalis</i> <i>B. adolescentis</i>

^a Información referencia (32,33,34)

1.1.6. Selección de cepas probióticas

La creciente popularidad en el uso de probióticos y la ausencia de un consenso internacional sobre su aplicación, seguridad y eficacia motivó a la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) y a la Organización Mundial de la Salud (OMS) a colaborar con el fin de recopilar evidencia científica que demuestre su efectividad (35).

Con el fin de seleccionar microorganismos probióticos se implementaron evaluaciones específicas y claras que permiten clasificarlos como GRAS (Generalmente reconocido como seguro), este término es designado por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA) para aquellas sustancias y microorganismos empleados en la industria alimentaria (36).

Para la correcta clasificación de microorganismos es necesario evaluar diversos aspectos, como las características de la especie, evaluar su seguridad, vigilancia epidemiológica, observar la presencia de toxinas y hemólisis, tolerancia a condiciones estresantes y la validación de las propiedades beneficiosas para la salud. Además, esta guía de identificación de microorganismos GRAS debe ser de influencia internacional y estar acompañada de las buenas prácticas de manufactura (BMP) (35).

1.1.7. Determinación de probióticos FAO/WHO (36)

I. Identificación de la cepa

En los últimos años se ha observado un notable avance en la identificación de microorganismos probióticos provenientes de matrices animales o vegetales, usando técnicas de selección y aislamiento se ha logrado identificar la cepa probiótica dando a conocer su género y especie (37).

Existen distintos métodos para identificar el género y la especie de un microorganismo, siendo el análisis filogenético el más acertado y destaca por la facilidad de clasificación de cultivos bacterianos. Este análisis emplea la información acumulada en el RNA ribosomal, la cual es fundamental para la comparación de cepas bacterianas y su adecuada clasificación.

Las secuencias usadas para la identificación pertenecen a las regiones del operón RNA ribosomal, por lo que la herramienta genotípica más usada y recomendada es la codificación del gen 16S rRNA, usualmente es complementado con pruebas fenotípicas para confirmar los resultados (35,38).

II. Tolerancia al estrés

Las bacterias ácido lácticas (BAL) tienden a ser más resistentes que otras Gram positivas, ya que deben sobrevivir a condiciones adversas a lo largo de su tránsito por el tracto gastrointestinal, originándose en el estómago donde se presenta un pH ácido, jugos gástricos y pepsina, así como la pancreatina y las sales biliares en el intestino. La resistencia gastrointestinal depende de la especie, por ejemplo, la especie *Lactobacillus* es altamente resistente al pH ácido en comparación a la especie *Bifidobacterium sp.* que es sensible mostrando escaso crecimiento a pH 2-3 (33).

La sensibilidad al oxígeno de las bacterias BAL es la mayor limitante en su funcionalidad, ya que son anaerobias aerotolerantes lo que significa que toleran el O_2 pero no lo usan en su metabolismo. La exposición a altos niveles de oxígeno induce a la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS), anión superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo altamente reactivo (HO). La acumulación de ROS causa estrés oxidativo lo que daña las proteínas, el ADN, los lípidos y finalmente causa muerte celular (38).

Es importante el uso de cepas BAL tolerantes al O_2 acompañado de la aplicación de buenas prácticas de manufactura, lo que garantiza la viabilidad bacteriana durante el almacenamiento y tránsito por el tracto gastrointestinal.³⁸ Durante la digestión los géneros BAL como

Bifidobacterium y *Lactobacillus* se exponen a la acción de la bilis y los ácidos biliares, lo que induce a cambios en la composición de lípidos y ácidos grasos en la membrana (39).

III. *Habilidad de adhesión*

Una propiedad fundamental de las bacterias probióticas es la capacidad de adherirse a la mucosa intestinal, debido a que es un prerequisite para la colonización y para ejercer la modulación del sistema inmune (40).

La adhesión bacteriana se fundamenta en la interacción física no específica entre dos superficies, que al entrar en contacto permiten interacciones específicas entre los componentes adhesivos y los receptores complementarios como la hidrofobicidad, el balance electrostático y las interacciones de Van Der Waals que se presentan en el contacto directo entre las colonias BAL y las células epiteliales intestinales (IECs) (41).

La capacidad de adhesión entre bacterias de diferente especie se denomina coagregación, mientras que cuando ocurre entre bacterias de la misma especie se conoce como autoagregación. Diversos estudios demostraron que la protección inmunitaria conferida por los probióticos está relacionada a la coagregación de los patógenos, lo que inhibe la formación de biopelículas relacionadas a infecciones. Además, la biopelícula formada por los probióticos aumenta su permanencia en el intestino y evita el crecimiento de enteropatógenos (42).

IV. *Evaluación de seguridad*

a. *Identificación taxonómica*

Las bacterias ácido lácticas (BAL) desempeñan un papel fundamental por su aportación probiótica al sistema gastrointestinal. Este grupo comprende una amplia variedad de géneros y especies. Tal como se detalla en la Tabla 2, las bacterias BAL son Gram positivas, no esporulados, catalasa negativa, anaerobias, aunque algunas especies son aerobias tolerantes, presentan tolerancia al ácido y son fermentadores productores de ácido láctico como principal metabolito (43,44).

Tabla 2. Microorganismos empleados como probióticos ^a

<i>Lactobacillus</i> <i>spp.</i>	<i>Bifidobacterium</i> <i>spp.</i>	<i>Bacterias ácido lácticas</i>	<i>Bacterias no ácido lácticas</i>
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. adolescentis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Bacillus cereus</i>
<i>L. casei</i>	<i>B. animalis</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>L. delbrueckii</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Saccharomyces boulardii</i>
<i>subsp.</i>	<i>B. breve</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>Escherichia coli subs.</i>
<i>Bulgaricus</i>	<i>B. infantis</i>	<i>thermophilus</i>	<i>nissle</i>
<i>L. gasseri</i>	<i>B. lactis</i>	<i>Leuconstoc mesenteroides</i>	<i>Propionibacterium</i>
<i>L. johnsonii</i>	<i>B. longum</i>		<i>freudenreichii</i>
<i>L. paracasei</i>			
<i>L. plantarum</i>			
<i>L. reuteri</i>			
<i>L. rhomnusus</i>			
<i>L. kefir</i>			

^a Información referencia (45,46)

b. Ausencia de virulencia

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), los organismos clasificados como GRAS (Generalmente Reconocidos como Seguros) deben someterse a evaluaciones rigurosas para comprobar la ausencia de virulencia y una baja resistencia a antibióticos en su perfil genético. En los últimos años, se ha observado que la aplicación de nuevos criterios de selección ha permitido la identificación de microorganismos con mayor potencial probiótico (47).

Entre las propiedades virulentas que deben ser descartadas en microorganismos se encuentran: la actividad hemolítica, la producción de enterotoxinas o citotoxinas, la capacidad de invadir células epiteliales, la adherencia a tejido, la formación de absceso, la modulación de mecanismos de defensa y por último la producción de citolisinas (48,49).

Pese a que los genes relacionados a estas propiedades pueden estar presentes en el perfil genético del microorganismo, no necesariamente son expresados. Por lo que el uso de técnicas moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y la técnica de hibridación de ADN pueden confirmar su presencia (49).

c. Producción de toxinas

A fin de clasificar los probióticos como seguros para el consumo humano, es necesario evaluar diversos parámetros, incluyendo su infectividad, patogenicidad, susceptibilidad a la estimulación inmune excesiva, factores de virulencia, actividad metabólica y propiedades microbianas (50).

Los factores relacionados a la virulencia de un microorganismo son los siguientes: el mecanismo de adhesión a las células del hospedador, la capacidad de degradar mucina (lo que proporciona metabolitos que favorecen su desarrollo), y la actividad de hidrolasa de las sales biliares, que mejora la supervivencia en el entorno intestinal. Sin embargo, estos factores son comunes en la mayoría de los microorganismos presentes en la flora intestinal (51).

Por otro lado, la actividad de la azoreductasa y nitroreductasa se ha asociado a efectos toxicológicos no deseados. La actividad azoreductasa en el caso de las especies de *Lactobacillus* es muy variable, mientras que en las especies de *Bifidobacterium* esta actividad es baja en comparación a las bacterias intestinales. En cuanto a la actividad nitroreductasa, esta enzima reduce los grupos nitro a grupos amino más tóxicos, se ha observado esta actividad tanto en *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* (52).

En estudios previos se realizaron exámenes de toxicidad aguda, empleando métodos similares para productos químicos, encontrando que es poco probable que las bacterias BAL no alcancen concentraciones que generen efectos tóxicos letales (53).

d. Actividad hemolítica

Según lo establecido por la FAO/OMS en el año 2002, las especies catalogadas como probióticas no deben presentar actividad hemolítica, ya que la ausencia de hemolisinas asegura que no será virulenta en ninguna circunstancia (54). La actividad hemolítica inducida por hemolisinas bacterianas genera infecciones leves hasta graves, debido a la lisis de glóbulos rojos por parte de microorganismos patógenos (55).

La hemólisis se clasifica en tres tipos: alfa (α), beta (β) y gamma (γ , también denominada no hemolítica). Es posible que la actividad de la α -hemólisis está asociada a la producción de peróxido de hidrógeno (56) para evaluar la actividad hemolítica, se realiza un ensayo hemolítico donde se siembran colonias de bacterias ácido lácticas (BAL), previamente aisladas en agar MRS, en placas de cultivo con agar sangre (generalmente sangre de carnero).

La α -hemólisis se denota por el cambio de color en el medio de cultivo, de verde a marrón, lo que indica la reducción de hemoglobina a metahemoglobina. Por otro lado, la β -hemólisis se

evidencia por un halo de color amarillo pálido que rodea a las colonias, esto se debe a la lisis completa de los glóbulos rojos (55).

e. Genes de transferencia de resistencia a antibióticos

En el estudio de la seguridad de las cepas probióticas, la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (*European Food Safety Authority*, EFSA, 2008), a través del concepto de Presunción Calificada de Seguridad (*Qualified Presumption of Safety*, QPS) establecen que antes de aprobar un candidato a probiótico debe evaluarse la naturaleza de resistencia a los antibióticos (57).

Se ha reportado que algunas cepas probióticas presentan resistencia a diferentes clases de antibióticos, como los glicopéptidos (vancomicina), los aminoglucósidos (estreptomicina y gentamicina), los monobactámicos (aztreonam) y las fluoroquinolonas (ciprofloxacino); siendo considerados como antibióticos de amplio espectro y efectivos contra bacterias Gram positivas y Gram negativas (58).

Durante el proceso de selección, se investiga la susceptibilidad de las cepas probióticas a los antibióticos, debido a que, al ser consumidas a través de suplementos alimenticios, es posible que los genes de resistencia a antibióticos (*antibiotic resistance genes*, ARG) sean transferidos a las bacterias intestinales. Los ARG fueron identificados en cepas probióticas comerciales que mediante la transferencia horizontal a patógenos podrían reducir la efectividad del tratamiento con antibióticos y contribuir al desarrollo de bacterias resistentes (59).

f. Ensayos clínicos

La investigación en probióticos para el desarrollo de ensayos clínicos se rige por las directrices establecidas por la Plataforma de Registro Internacional de Ensayos Clínicos (*International Clinical Trials registry Platform*, ICTRP) y la Organización Mundial de la Salud (OMS), las cuales establecen estándares relacionados a diferentes registros de ensayos clínicos los que aseguran la calidad y transparencia en los resultados. Asimismo, la Biblioteca Nacional de Medicina (NLM) proporciona información sobre los ensayos clínicos controlados en más de 200 países (60).

Los objetivos principales de los ensayos clínicos son: determinar la seguridad y eficacia del compuesto, identificar los posibles efectos adversos relacionados con el uso y analizar las propiedades clínicas, farmacocinéticas o farmacodinámicas. Antes de realizar las fases clínicas es necesario identificar la cepa y caracterizarla usando estudios *in vitro*. Posteriormente, la seguridad se evaluará mediante los ensayos clínicos en la fase 1, 2 y 3 (61).

Los candidatos a probióticos atraviesan por cuatro fases consecutivas:

- Fase 1: Observar la seguridad del compuesto en una muestra menor de 50 sujetos.
- Fase 2: Evalúa la eficacia en una muestra de sujetos menor a 100.
- Fase 3: Comparación del compuesto a gran escala con otros tratamientos o placebos.
- Fase 4: Evalúa el comportamiento del compuesto en una población masiva tras su comercialización.

Según la Administración de Alimentos y medicamentos (FDA), el proceso desde la aprobación hasta el lanzamiento al mercado de un compuesto demora un promedio de 7 a 10 años y requiere una inversión estimada de 1 a 2 mil millones de dólares por compuesto (62).

V. Propiedades bioactivas

a. Anticancerígeno

Los probióticos han demostrado optimizar la respuesta inmune y prevenir procesos cancerígenos mediante la producción de metabolitos beneficiosos, como los ácidos grasos de cadena corta (*short-chain fatty acids*, SCFAs), además del acetato, propionato y butirato. Estos compuestos son importantes reguladores de la inflamación, diferenciación y apoptosis.

Diversos estudios han evidenciado que los extractos citoplasmáticos de *Lactobacillus casei* y *Bifidobacterium spp.* pueden afectar el crecimiento de células cancerígenas e inhibir su proliferación. Estos efectos se presentan en la Tabla 3 (63).

Tabla 3. Efecto anticancerígeno de los probióticos ^c

Cáncer colorrectal	Reducción de la carga y tamaño tumoral.	<i>L. acidophilus</i>
	Reducción de multiplicidad tumoral y prevención de la progresión del cáncer.	<i>L. gasseri</i>
	Efectos antimicrobianos	<i>L. salivarius</i>
	Actividad anti genotóxica	<i>B. longum</i>
	Activar el sistema inmune del microbiota intestinal	<i>B. infantum</i>
		<i>B. bifidum</i>
Carcinoma hepatocelular	inducción de Citocina antiinflamatoria IL-10	<i>L. rhamnosus</i>
	Reducción de células Th17 en el intestino, modulación de microbiota intestinal.	<i>E. coli Nissle</i>
		<i>L. plantarum</i>

	Reducción de la angiogénesis y detención del crecimiento tumoral.	
Cáncer gástrico	Reducción del gen AKT, inhibición del cáncer gástrico producido por <i>Helicobacter pylori</i> . Incremento expresión genes MUC2 y MUC3, restauración de permeabilidad intestinal, inhibición de adhesión de patógenos.	<i>L. plantarum</i> <i>L. rhamnosus</i> <i>L. reuteri</i> <i>L. strains</i>
Cáncer de esófago	Modulación de las vías de señalización relacionadas al cáncer, apoptosis, metástasis y control del ciclo celular. Inhibición de crecimiento tumoral	<i>Lactobacilli</i> <i>L. rhamnosus</i>
Cáncer de mama	Estimular respuesta inmune Producción de citoquinas IL-4 y IL-10 anticancerígeno Respuesta inmunomodulatoria Incremento de INF- γ , IL-2 y células NK	<i>L. acidophilus</i> <i>B. animalis</i> <i>B. infantis</i> <i>L. paracasei</i> <i>B. bifidum</i> <i>Streptococcus thermophilus</i> <i>L. helveticus</i> R389 <i>L. plantarum</i>
Cáncer cervical	Producción de metabolitos anticancerígenos como ácidos grasos de cadena corta, ácido láctico, actividad bacteriocina anticancerígena. Mantener el pH vaginal Estabilizar la flora bacteriana vaginal	<i>Lactobacillus pediococcus</i>

*Información referencia ⁽⁶³⁾

b. Anticolesterol

El consumo de alimentos suplementados con probióticos puede influir el metabolismo lipídico del huésped. Estas bacterias producen hidrolasa, una enzima que desconjuga los ácidos biliares, lo que reduce su absorción y aumenta la excreción fecal. El proceso de coprecipitación del

colesterol con los ácidos biliares influye en la disminución de la solubilización y absorción de lípidos, lo que contribuye a una menor concentración de colesterol en el organismo.

Además, las bacterias ácido lácticas (BAL) incrementan la producción de ácidos de cadena corta (SCFA) como el propionato, el cual ha demostrado capacidad para controlar la síntesis hepática de colesterol (64).

c. Antidepresivo

Los probióticos, también denominados “psicobioticos” hacen referencia a los microorganismos que, al ser consumidos en cantidades adecuadas, benefician a los pacientes con trastornos psiquiátricos. Estos pueden influir en el eje intestino-cerebro, regulando la producción de los neurotransmisores y la secreción de la serotonina, glutamato y ácido gamma-aminobutírico (GABA), este último es reconocido como el principal inhibidor regulador de los procesos fisiológicos y psicológicos, cuya alteración se asocia directamente a condiciones como la ansiedad y la depresión.

Algunas especies bacterianas como *Lactobacillus brevis*, *Bifidobacterium dentium* y *Lactobacillus plantarum*, han demostrado capacidad para producir GABA y serotonina. Asimismo, las especies como *L. plantarum* y *Lactobacillus odontolyticus* con capaces de producir acetilcolina, un neurotransmisor esencial en la regulación de las funciones cognitivas y neuromusculares (65,66).

d. Anti obesidad

Se reportó que una dieta rica en grasas y azúcares, comúnmente conocida como dieta “occidental” (Western diet), puede alterar significativamente la composición en la microflora impactando en las vías metabólicas y modificando el microbioma del hospedador.

Las bacterias probióticas pueden modular el peso corporal empleando diferentes mecanismos como: la producción de ácidos grasos de cadena corta (SCFA), la regulación del metabolismo de ácidos grasos, la modulación del metabolismo de los ácidos biliares y la protección frente a la endotoxemia metabólica.

En pacientes con obesidad, se ha observado un desequilibrio de la microflora intestinal, caracterizado por una mayor proporción de dos filos bacterianas dominantes *Firmicutes* y *Bacteroidetes*, los que desempeñan un papel clave en el metabolismo del huésped (67).

e. Antidiabético

La diabetes mellitus (DM), en particular la diabetes mellitus tipo 2 (T2DM), que se caracteriza por la resistencia a la insulina. Además, es el tipo más frecuente relacionado a diferentes patologías. Diversas investigaciones encontraron que ciertos probióticos pueden intervenir en el control glucémico, al ralentizar el metabolismo de carbohidratos con el fin de tener un perfil de glucosa equilibrado.

Otro mecanismo de las bacterias probióticas en la inhibición de las enzimas α -glucosidasa y α -amilasa, las responsables de la descomposición de carbohidratos complejos. Al inhibir estas enzimas, se retrasa la absorción de glucosa lo que aumenta gradualmente la cantidad de glucosa postprandial en sangre (68).

f. Inmunoestimulante

Las bacterias probióticas presentes en el lumen intestinal son responsables de la respuesta de las células dendríticas (CDs), las cuales reaccionan frente a una infección de cualquier invasor patógeno, liberando citocinas o quimiocinas como respuesta inmunitaria. Se ha observado que diferentes cepas probióticas promueven inmunidad innata (la fagocitosis y la actividad de células NK), sin embargo, no se observó mayor efecto en la inmunidad adquirida (69).

g. Secreción de moléculas funcionales

Las bacterias probióticas impactan en la composición y funcionalidad de la microbiota intestinal, es así como las especies *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus reuteri* y *Bifidobacterium adolescentes*; producen/ secretan vitaminas del grupo-B como biotina, folatos, riboflavina, ácido nicotínico, piridoxina, tiamina, ácido pantoténico, cobalamina y vitamina K. Lo que constituye una solución en la industria alimentaria reduciendo la producción química de pseudo-vitaminas (70).

h. Requerimientos industriales

Para la producción a gran escala de un microorganismo, es indispensable documentar los beneficios que aporta a la salud y sus propiedades tecnológicas entre las que se incluyen la seguridad, la estabilidad genética, la capacidad de producción industrial y la estabilidad del producto final. Si los microorganismos son fermentadores debe de evaluarse la contribución al sabor o aroma del producto.

Las cepas empleadas para la producción deben de presentar un alto rendimiento de crecimiento incluso en matrices de bajo costo. En la industria de los productos lácteos, estas deben mantener la estabilidad como cultivos iniciadores (71). La producción de bacterias probióticas a bajo costo es relevante para la industria alimentaria por el agregado en los alimentos con biomasa probiótica.

Se debe considerar que las cepas de los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* presentan requerimientos nutricionales complejos debido a que son autótrofas para aproximadamente 20 aminoácidos. Los factores como la presencia de la lactosa, inulina, extractos de levadura concentrados y el pH del medio fueron optimizados para maximizar el crecimiento de *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* (72).

Durante el proceso de producción, los probióticos deben conservar sus propiedades y viabilidad celular, las que se ven afectadas por variables como la temperatura y la actividad hídrica. Se ha observado que se puede mantener la integridad de la membrana celular microbiana a temperaturas menores a 0.2°C mientras que a temperaturas elevadas a 30°C es posible que esta se degrade.

En productos sólidos dulces debido a la baja actividad hídrica es posible almacenar el producto a temperaturas de 4 a 30°C por aproximadamente 12 meses. En el caso de las capsulas, tabletas y polvos con actividad hídrica mínima el tiempo de almacenamiento es de 12 a 24 meses. Por otro lado, los productos lácteos y jugos con alta actividad hídrica necesitan una temperatura de almacenamiento de 4 a 8°C conservándose por tiempo limitado (71).

1.1.8. Criterios para un probiótico ideal

Un candidato a probiótico debe presentar una elevada viabilidad celular que le permita resistir los cambios de pH y la presencia de ácidos a lo largo del sistema gastrointestinal. Además, debe ser capaz de permanecer en el intestino aun si no lo coloniza completamente, mostrando afinidad de adhesión al epitelio intestinal e influencia en la actividad metabólica local. Otra característica esencial es su capacidad para interactuar con células inmunes asociadas al intestino.

Los microorganismos no deben de presentar características patógenas y deben sobrevivir a los procesos de producción industriales en la elaboración de productos fermentados como leches fermentadas, quesos, embutidos, zumos de fruta y vino. En preparaciones probióticas se emplean cultivos individuales y mixtos de microorganismos vivos (73).

1.2. Bifidobacterium

1.2.1. Taxonomía del género Bifidobacterium

Durante la determinación del filo *Actinobacteria*, se separó al filo *Firmicutes*. Mediante la secuenciación del genoma completo (Whole Genome Sequencing, WGS) y el análisis de firmas moleculares de proteínas, se ha logrado comprender la relación entre el filo *Actinobacteria* y a las bifidobacteriales (74).

En el año 1924, el género *Bifidobacterium* ya había sido reconocido como un taxon independiente, tal como se describe en la Tabla 4, permitiendo clasificar sus tipos o grupos en especies. Caracterizando 8 especies en heces humanas: en adultos (*B. teenageris*), en lactantes (*B. parvulorum*, *B. liberorum*, *B. lactensis*, *B. breve*) y en ambos grupos (*B. bifidum*, *B. longum*).

Para su identificación, los investigadores usaron las características fenotípicas, como la morfología de las colonias y los patrones fermentativos, así como la determinación del contenido porcentual de guanina-citocina (GC), siendo el rango de 55% a 67%. Además, consideraban como un marcador taxonómico la presencia de fructosa-6-fosfato fosfoquetolasa (F6PPK) la cual divide la hexosa fosfato en eritosa-4-fosfato y acetil fosfato, siendo una característica distintiva de las *Bifidobacterias* (75).

Tabla 4. Taxonomía del género *Bifidobacterium*

Dominio	Bacteria
Linaje	Firmicutes
Clase	Actinobacteria
Subclase	Actinobacteridae
Orden	Bifidobacteriales
Familia	Bifidobacteraceae
Géneros	Bifidobacterium (29 especies)
	Gardnerella (1 especie)
	Aeriscardovia (1 especie)
	Parascardovia (1 especie)
	Scardovia (1 especie)

*Tomado de (44)

Tabla 5. Especies *Bifidobacterium*, periodo de su descripción y su hábitat

1924	1960-1969	1970-179	1980-1989
<i>B. bifidum</i> ^a	<i>B.</i> <i>adolescentes</i> ^a <i>B. breve</i> ^a <i>B. longum</i> ^a <i>B.</i> <i>pseudolongum</i> ^c <i>B.</i> <i>thermophilum</i> ^c <i>B. asteroides</i> ^d <i>B.</i> <i>coryneforme</i> ^d <i>B. indicum</i> ^d	<i>B. angulatum</i> ^a <i>B. catenulatum</i> ^a <i>B. dentium</i> ^a <i>B.</i> <i>pseudocatenulatum</i> ^a <i>B. animalis</i> ^c <i>B. boum</i> ^c <i>B. choerinum</i> ^c <i>B. cuniculi</i> ^c <i>B. magnum</i> ^c <i>B. pullorum</i> ^c	<i>B.</i> <i>gallinarum</i> ^c <i>B.</i> <i>minimum</i> ^e <i>B. subtile</i> ^e
1990-1999	2000-2009	2010-2017	
<i>B. gallicum</i> ^c <i>B. merycicum</i> ^c <i>B. ruminantium</i> ^c <i>B. saeculare</i> ^c	<i>B. scardovi</i> ^a <i>B. psycraerophilum</i> ^c <i>B. thermacidophilum</i> ^c <i>B. tsurumiense</i> ^c <i>B. bombi</i> ^d <i>B. mongoliense</i> ^e <i>B. crudilactis</i> ^e	<i>B. aerophilum</i> ^b <i>B. aesculapii</i> ^b <i>B. avesani</i> ^b <i>B. biavatii</i> ^b <i>B. callithricos</i> ^b <i>B. eulemuris</i> ^b <i>B. hapali</i> ^b <i>B. lemorum</i> ^b <i>B. myosostis</i> ^b <i>B. moukalabense</i> ^b <i>B. ramosum</i> ^b <i>B. reuteri</i> ^b <i>B. saguini</i> ^b <i>B. stellenboshense</i> ^b <i>B. tisseieri</i> ^b <i>B. faecale</i> ^a <i>B. kashiwanoense</i> ^a <i>B.</i> <i>actinocolooniforme</i> ^d <i>B. bohemicum</i> ^d <i>B. commune</i> ^d <i>B. aquikefiry</i> ^e	

^a Fuente humana

^b Fuente no humana primates

^c Fuente otros animals y aves

^d Fuente insectos

^e Fuentes ambientales

*Tomado de (75)

1.2.2. Características fisiológicas

El género *Bifidobacterium* se caracteriza por ser no motil, Gram positivo, catalasa negativa y no esporulado. Las células bacterianas presentan morfología de bastones polimórficos con forma de Y o V, de ahí el nombre de bífido (Figura 1 A). esta característica es útil para diferenciar a los distintos miembros de este género (76).

Son bacterias anaerobias, aunque la mayoría de las especies crecen en condiciones de microaerofilia (90% aire y 10% CO₂). Sus colonias son convexas, cremosas, blanquecinas, lisas, con bordes limpios, de textura pegajosa y consistencia blanda (Figura 1 B). La temperatura optima de crecimiento se sitúa entre los 37 y 41°C, con un rango mínimo 25-28°C y un máximo de 43-45°C. Crecen a un pH optimo de 6.5-7.0, sin embargo, no toleran condiciones acidas (pH 4.5-5.0) ni básicas (pH básico 8.0-8.5) (77).

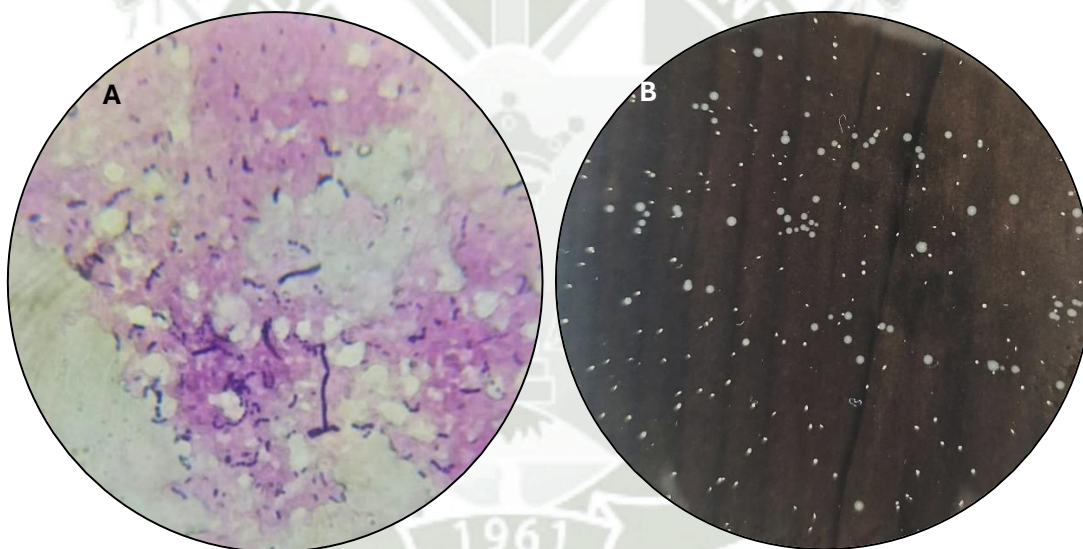


Figura 1. (A) Vista microscópica 40X *Bifidobacterium* sp. (B) Colonias *Bifidobacterium* sp. luego de 48 horas 37°C

1.2.3. Fermentación láctica

Lo que distingue a *Bifidobacterium* sp. del resto de las bacterias ácido lácticas es la presencia de la enzima fructosa-6-fosfato fosfocetolasa (F6PPK), también conocida como “derivación bífida”. Esta enzima cataliza la división de la hexosa fosfato en eritrosa-4-fosfato y acetil fosfato, generando aproximadamente 2.5 moléculas de ATP por cada mol de glucosa fermentada.

Otra ventaja metabólica es su capacidad para asimilar las pentosas y hexosas; además de la producción de ácidos grasos de cadena corta (*Short-Chain Fatty Acids* SCFA), los cuales son asimilados y aprovechados por el hospedero (78). Las especies de *Bifidobacterium sp.* presentan mayor preferencia por la lactosa en comparación a otros azúcares, lo que constituye un beneficio para las personas con intolerancia a la lactosa, ya que previene síntomas como severa pérdida de agua y malnutrición (81).

1.3.Yogur

1.3.1. Valor nutricional

El yogur es un producto lácteo obtenido a partir de la acidificación de leche mediante la acción de las bacterias ácido lácticas, siendo *Lactobacillus delbrueckii subsp bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus* las más comunes. Este alimento constituye una fuente importante de calcio, fósforo, potasio, vitamina A, vitamina B2 y vitamina B12 (Tabla 6). Además, el yogur es un excelente transportador de bacterias probióticas (2).

Tabla 6. Tabla de nutricional en 100gr y 245gr de yogur

Nutrientes	100 gr	245 gr
Agua (g)	87.90	215.35
Energía (Kcal)	61	149
Proteína (g)	3.47	8.50
Lípidos totales (g)	3.25	7.96
Carbohidratos (g)	4.66	11.42
Calcio (mg)	121	296
Magnesio (mg)	12	29
Fósforo (mg)	65	233
Potasio (mg)	155	380
Zinc (mg)	0.59	1.45
Riboflavina (mg)	0.142	0.348
Vitamina B12 (µg)	0.37	0.91
Vitamina A (IU)	99	243
Vitamina D (IU)	2	5

*Tomado de (2)

1.3.2. *Proceso de elaboración*

El proceso de elaboración del yogur comienza con la selección de leche de alta calidad, evaluando parámetros como acidez (pH 6.7) y densidad (1.028-1.042). La leche se filtra empleando una malla de tela fina, con el objetivo de quitar impurezas resultantes de la extracción y transporte.

Posteriormente, se realiza la pasteurización, elevando la temperatura de la leche a 85°C durante 15 minutos. Este tratamiento térmico se hace con el fin de eliminar la mayoría de las bacterias ácido-lácticas y patógenas, las cuales mueren a temperaturas entre 70°C y 90°C por pocos segundos. Sin embargo, las bacterias termófilas presentan mayor resistencia térmica y las esporas de bacilos y clostridios, de carácter termo dúpico, para su eliminación se requieren temperaturas superiores a 100°C durante varios minutos (79).

Luego de la pasteurización la leche se enfría hasta alcanzar los 45°C, debido a que esta temperatura es la ideal para la propagación de las bacterias ácido-lácticas. El cultivo debe mantenerse entre 43°C y 45°C durante aproximadamente 7 horas para obtener un yogur de calidad. Terminado el tiempo de fermentación, es necesario enfriar el yogur con el fin de detener la actividad fermentativa de las bacterias ácido lácticas y estabilizar el ácido láctico y otros compuestos.

Luego de un periodo de aproximadamente 12 horas a 4°C, el yogur es sometido a un batido para homogenizar su textura. Finalmente, el yogur se envasa en recipientes de vidrio o plástico previamente higienizados y se almacena a 4°C. El Diagrama 1 ilustra el proceso de preparación de yogur y su conservación.

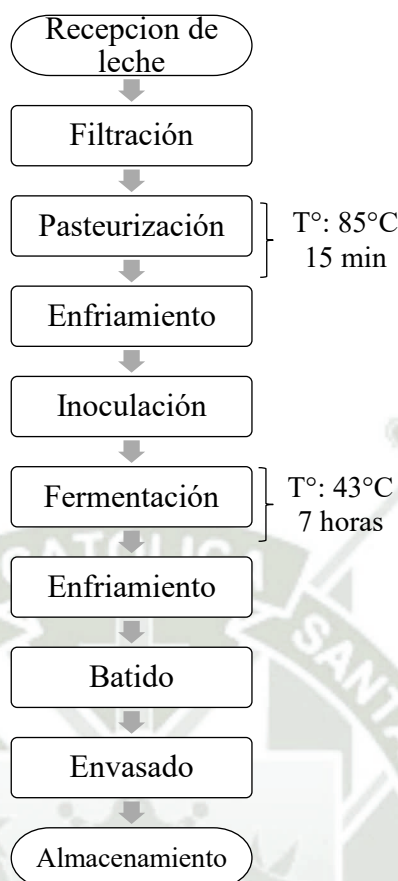


Figura 2. Fotografía del diagrama de flujo de la elaboración de yogur

1.3.3. Beneficios

El yogur es un producto derivado de la fermentación ácido láctica llevada a cabo por las bacterias probióticas, como lo son *S. thermophilus*, *L. delbrueckii subsp. Bulgaricus*, *L. acidophilus* y *Bifidobacterium longum*. Estas bacterias son capaces de colonizar zonas específicas del sistema gastrointestinal e interactuar con el microbioma del hospedero.

El yogur puede elaborarse a partir de leche entera, baja en grasa o descremada, también se le puede adicionar fruta, edulcorantes y colorantes para mejorar su presentación. Asimismo, es posible se suplementación agregando micronutrientes como vitamina D y calcio. El consumo de este producto fortificado en personas adultas es asociado con la mejora de la salud ósea, la reducción de caídas y fracturas, además de mejorar el rendimiento muscular (80).

En pacientes con diabetes tipo 2, la ingesta de yogur probiótico reduce en 4.54% el colesterol sérico total y en 7.45% el colesterol ligado a lipoproteínas de baja densidad (82). Se ha asociado el consumo de probióticos a la mejora de la inmunidad innata, fortalecimiento de la inmunidad intestinal y reducción de la duración y severidad de las infecciones respiratorias (80).

Por otro lado, se ha observado que la fracción sólida del yogur presenta actividad antitumoral, mostrando reducir la formación de tumores en distintos tipos de cáncer colorrectal y de vejiga (82). Además, se ha demostrado que las cepas de *Bifidobacterium* poseen la capacidad de localizar tumores y establecer un tratamiento antitumoral. También se ha estudiado el uso de *Bifidobacterium breve* y *Bifidobacterium longum* para mejorar la tolerancia al estrés oxidativo (81).

1.4.Sistema gastrointestinal

El sistema gastrointestinal está conformado por un conjunto de órganos cuya función principal es nutrir el organismo mediante la digestión y absorción de nutrientes. Asimismo, interviene en la producción de enzimas y hormonas culminando la digestión con la excreción de residuos.

La digestión comienza en la cavidad oral con la masticación de los alimentos y la secreción de saliva por parte de las glándulas parótidas, sublinguales, submaxilares y salivares. La combinación de la acción mecánica y química origina el bolo alimenticio, que es impulsado por la lengua hacia la orofaringe y esófago.

El bolo alimenticio transita por el esófago, un conducto muscular tubular unidireccional que conecta a la cavidad oral con el estómago. El esófago está recubierto por capas de epitelio escamoso estratificado y lubricado por saliva, lo que facilita el paso de los alimentos, estos son impulsados mediante movimientos peristálticos que conducen el bolo alimenticio hacia el estómago.

El estómago, es una estructura localizada en la región superior y media del abdomen, se divide anatómicamente en cuatro regiones: fondo, cuerpo, antro y píloro. Cada una de estas se compone de diferentes tipos celulares. En el fondo y el cuerpo se encuentran células parietales, responsables de la secreción de ácido y células principales que producen pepsina, una enzima proteolítica. El antro está recubierto por células G, producen gastrina, una hormona que estimula la secreción de ácido. El esfínter pilórico, situado en la región distal, regula el paso del contenido gástrico hacia el intestino.

El intestino delgado, mide aproximadamente 7 metros y se compone de duodeno, yeyuno e íleon. Está revestido por epitelio columnar y presenta válvulas conniventes, vellosidades y microvellosidades, que son modificaciones pilosas de la membrana celular superficial, encargadas de la absorción de agua y nutrientes (vitaminas, minerales, carbohidratos y proteínas). Se presenta la válvula ileocecal que conecta el intestino delgado con el intestino

grueso, ralentiza el tránsito de nutrientes y facilita la digestión. Además, actúa como barrera que limita el paso de bacterias colónicas hacia el intestino delgado.

El intestino grueso se extiende desde la válvula ileocecal hasta el ano, y se divide anatómicamente en apéndice vermiforme, ciego, colon ascendente, colon transverso, colon descendente, colon sigmoide y recto. El apéndice, unido al ciego, alberga biopelículas bacterianas (*Lactobacillus*, *Enterococcus*, entre otras) que participan en la biosíntesis de vitaminas y metabolismo de esteroides, y pueden contribuir a repoblar el colon tras episodios de diarrea o infección. El colon, recubierto por epitelio columnar simple con microvellosidades, continua el proceso de absorción de agua y electrolitos. El ano, revestido por epitelio escamoso estratificado, constituye en el segmento final del tracto gastrointestinal.

Los órganos accesorios del sistema gastrointestinal son el hígado, el páncreas y la vesícula biliar. El hígado, situado en el cuadrante superior derecho del abdomen, su función es la producción de bilis, la cual es transportada al intestino delgado a través de los conductos para facilitar la emulsificación y digestión de lípidos, además, participa en la detoxificación de fármacos y metabolitos. La vesícula biliar, conectada al sistema biliar mediante el conducto cístico, almacena la bilis hasta su liberación durante la digestión. El páncreas, localizado en la región media del abdomen, secreta enzimas digestivas como amilasa, lipasa, tripsina y quimotripsina, son drenadas al intestino delgado a través de los ductos pancreáticos. Además, cumple una función endocrina mediante la secreción de insulina, hormona que regula la captación de glucosa por las células (83).

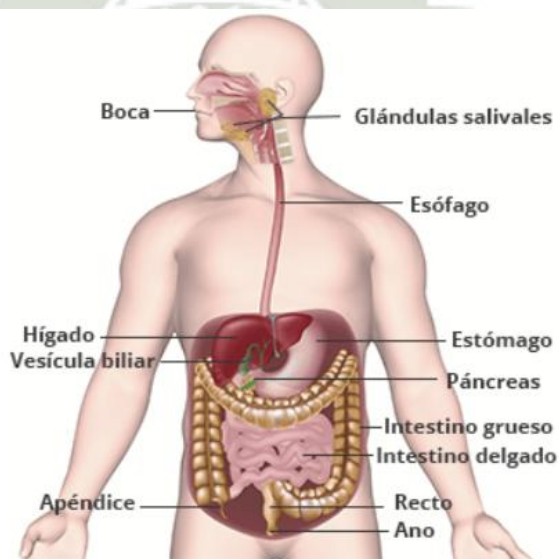


Figura 3. Diagrama del Sistema digestivo (129)

1.4.1. Métodos de digestión *in vitro*

Los métodos de digestión *in vitro* se fundamentan en los conocimientos del sistema digestivo humano y buscan emular las condiciones fisiológicas para estudiar los cambios que experimentan los alimentos durante el proceso digestivo. Estos métodos son ampliamente usados por ser rápidos, económicos y reproducibles. Además, permiten determinar la bioaccesibilidad, entendida como la cantidad de un nutriente o compuesto ingerido presente en el tracto intestinal y disponible para su absorción tras la digestión, así como la biodisponibilidad, que corresponde a la fracción de un metabolito activo que alcanza la circulación sistémica tras su ingestión. Existen dos tipos principales de digestión *in vitro*, que se diferencian según el número de fases y los fluidos simulados. Estos métodos pueden clasificarse en métodos estáticos o dinámicos (84).

1.4.2. Método de digestión *in vitro* estático INFOGEST

El método estático *in vitro* INFOGEST surgió como resultado de la Cooperación Europea en Ciencia y Tecnología (COST), desarrollada entre los años 2011 y 2015. En este proyecto se reunieron 340 científicos de diferentes disciplinas como nutrición, gastroenterología, farmacéutica, bioquímica y toxicológica, provenientes de 130 instituciones y 37 países (incluyendo Nueva Zelanda, Australia, Estados Unidos, Argentina y diversas naciones europeas), con el objetivo de unificar las condiciones para un modelo de digestión *in vitro*. La digestión estática *in vitro* contempla tres fases: oral, gástrica e intestinal. En cada una de ellas se añaden fluidos simulados y enzimas, acompañadas de periodos de incubación y agitación con el fin de emular las condiciones digestivas *in vivo*. Como resultado, se obtuvieron protocolos estandarizados que permiten emular cada etapa de la vida humana: infancia, adultez y vejez.

En la presente tesis se utilizó una adaptación del protocolo consensuado, descrito en los artículos de Minekus et al. (2014) y Brodkorb et al. (2019) (85,86,87).



CAPITULO II

2. MATERIALES Y METODOLOGIA

2.1. Lugar de ejecución

La experimentación de la presente tesis se llevó a cabo en los laboratorios E-405 y E-406 del Vicerrectorado de Investigación en la Universidad Católica de Santa María

2.2. Materiales

2.2.1. Muestra biológica

- Cultivo Aby-3 Chr-hansen, conteniendo las cepas comerciales BB-12® y LA-5® siendo las siguientes: *Bifidobacterium spp.*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*.
- Muestras comerciales: YoG1 conteniendo las cepas *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*, *Bifidobacterium animalis subsp. lactis*. YoG2 conteniendo las cepas BB12 *Bifidobacterium*

2.2.2. Material de laboratorio

- Tubos eppendorf 1.5 mL y 5 mL
- Tubos falcón de 15 mL y 50 mL
- Botella de vidrio 1000 mL
- Matraz 250 mL
- Probeta 100 mL
- Beaker de 500 mL
- Porta objetos 25*75mm
- Cubre objetos
- Placas Petri 15*90mm
- Tips 2.5uL , 200uL y 1000uL
- Asa de kolle
- Mechero
- Taper de plástico 3ltrs
- Velas
- Bolsas de polipropileno

2.2.3. Insumos y reactivos químicos

- Etanol 70° y 96° ALKOFARMA
- Agua MiliQ grado 2

- Agua destilada
- Agar MRS (Man, Rogosa y Sharpe)
- Ringer lactato
- Cloruro de sodio
- Fosfato monopotásico
- Bicarbonato de sodio
- Cloruro de potasio
- Cloruro de magnesio hexahidratado
- Carbonato de amonio
- Cloruro de calcio dihidratado
- Inulina de agave (Enature)
- L-cisteína

2.2.4. *Enzimas*

- α -amilasa (A0521 Sigma-Aldrich, EC número:232-565-6)
- Pepsina (P7000 Sigma-Aldrich, EC número:232-629-3)
- Pancreatina (P7545 Sigma-Aldrich, EC número:232-468-9)
- Bilis Extracto (B8631 Sigma-Aldrich, EC número:232-369-0)

2.2.5. *Equipos*

- Baño termostático modelo Masson (30°C-110°C)
- Balanza (Precisa)
- Balanza analítica (WELLiSH)
- Incubadora (Faithful)
- Autoclave
- Vortex análogo (Eurotech)
- Medidor pH (Ohaus)
- Campana extractora de gases (Biobase)
- Cámara de CO₂ (Anaerocult)
- Cocinilla (Cosmos innovation)
- Sistema de purificación de agua pura (Milli-Q IX 7005)

2.3. Metodología

2.3.1. Cálculo de cultivo para la preparación del yogur

Para la preparación de yogur se empleó el cultivo de Aby-3 de Chr-hansen, compuesto por las cepas comerciales BB-12® y LA-5®, siendo las siguientes *Bifidobacterium spp.*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*. El cultivo empleado fue de 50U, suficientes para la inoculación de 250 litros de leche (88), como se muestra en la Tabla 7.

Tabla 7. Cuadro de tasa de inoculación

Cantidad de leche inoculada	250 L / 70 gal	1000 L / 300 gal	2500 L / 700 gal
Cantidad de cultivo DVS (Direct Vat Set, DVS)	50U	200U	500U

Para el desarrollo de la presente tesis inoculó un litro de leche por ensayo, por lo que el cultivo tuvo que ser fraccionado antes de usarlo. En la preparación del yogur se utilizó 0.048gr de cultivo DVS por cada litro de leche de vaca, según se calculó en la Ecuación 1.

$$gr\ cultivo * 1litro\ leche = \frac{(peso\ sobre\ completo - peso\ sobre\ vacio)gr}{250L}$$

$$cultivo\ gr/L = \frac{(20 - 8)gr}{250L} = 0.048 \frac{gr}{L}$$

Ecuación 1. Ecuación de cálculo de cultivo por litro

Se observó que los cultivos almacenados presentaban un pardeamiento y una textura pegajosa por lo que, luego del fraccionamiento estos fueron congelados. Es probable que este cambio de color esté relacionado a la pérdida de la viabilidad bacteriana ya que durante el prolongado almacenamiento la membrana bacteriana sufre una oxidación lipídica, acumulando radicales libres que reducen la hidrofobicidad de la membrana y las proteínas pierden su interacción (126). La muerte celular incrementa la disponibilidad de cadenas laterales de proteínas que pueden reaccionar con azúcares reductores, como la lactosa y otros derivados lácteos que actúan como crioprotectores (93), favoreciendo así la reacción de Maillard. La textura observada tras el almacenamiento podría explicarse por la absorción de humedad, ya que la

lactosa del cultivo se disuelve parcialmente y forma puentes entre proteínas y azúcares, lo que degrada el medio y contribuye a la destrucción de la estructura celular (127).



Figura 4. Diferencia de color entre cultivos luego del almacenamiento

2.3.2. Preparación del yogur

La leche de vaca se filtró empleando una gasa fina, la cual fue previamente esterilizada por inmersión en agua hirviendo durante 1 a 2 minutos usando un colador, con el fin de separar impurezas, partículas de polvo u otros contaminantes derivados de la extracción y transporte (89).

Posteriormente, la leche filtrada se transfirió a una olla de acero inoxidable y se calentó hasta los 85°C manteniendo a esta temperatura durante 15 minutos, con el fin de llevar a cabo una pasteurización (92,98). Al finalizar este tiempo, la olla se colocó en un baño maría frío hasta alcanzar los 45°C, temperatura óptima para la inoculación del cultivo (90). Se adicionó los 0.048gr de cultivo y con movimientos circulares este es disuelto homogéneamente en la leche.

Luego de la inoculación se incorporó el prebiótico Inulina a dos concentraciones (5% y 6.5%), calculando que por cada 100 mL de leche se añadieron 5 g y 6.5 g de Inulina respectivamente. Una vez solubilizado el cultivo y el prebiótico, la leche inoculada se distribuyó homogéneamente en las yogurteras que mantienen los recipientes a una temperatura de 43°C durante 7 horas (91).

Al término de la fermentación, se esperó un pH de 4.0-4.6 (Figura 4), valor que confirma una correcta acidificación según la ficha técnica del cultivo. Luego de las 7 horas de incubación se midió el pH del yogur usando el potenciómetro, alcanzando 4.3 de pH. Finalmente, el yogur fue enfriado para detener la producción de ácido láctico y favorecer el desarrollo de una textura adecuada (93).

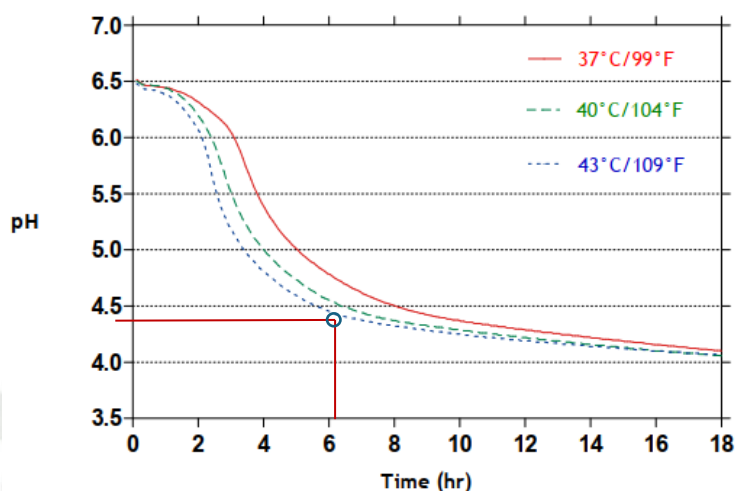


Figura 5. Curva de acidificación durante la fermentación según la ficha técnica (130)

2.3.3. Método *in vitro* INFOGEST

La digestión *in vitro* llevada a cabo en el desarrollo de esta tesis consta de cuatro fases: oral, gástrica, duodenal e intestinal. Previo a la ejecución del ensayo, se preparó soluciones stock usadas para la elaboración de fluidos simulados, los que emularon las condiciones propias de cada fase. Estos fluidos son: Fluido Salival Simulado (SSF), Fluido Gástrico Simulado (SGF) y Fluido Intestinal Simulado (SIF) (86).

2.3.4. Preparación de soluciones stock

Las soluciones stock constituyen la base para la preparación de fluidos simulados. Cada una de ellas fueron preparadas según el protocolo descrito por Brodkorb et al. y posteriormente se empleó filtros de 0.22 μm . Los stocks de trabajo fueron elaborados de acuerdo con las concentraciones y volúmenes indicados en la Tabla 8, y fueron congelados para su almacenamiento (87).

Tabla 8. Componentes de soluciones stock

Componente	Concentración del stock		Requerido para el ensayo
	g L ⁻¹	mol L ⁻¹	
KCl	37.3	0.5	28.8
KH ₂ PO ₄	68	0.5	5.4
NaHCO ₃	84	1	61.8
NaCl	117	2	21.4
MgCl ₂ (H ₂ O) ₆	30.5	0.15	2

$(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$	48	0.5	0.56
Ajuste de pH		mol L^{-1}	mL
NaOH	40	1	
HCl	497.4	6	2.09
Usar en el protocolo	g L^{-1}	mol L^{-1}	mL
$\text{CaCl}_2(\text{H}_2\text{O})_2$	44.1	0.3	

2.3.5. Preparación de fluidos simulados

Las soluciones de trabajo fueron preparados según la Tabla 9 en un volumen total de 400 mL y fueron almacenados en tubos falcón de 50 mL a -20°C . Las enzimas, sales biliares, Ca^{2+} y agua ultrapura tipo I fueron añadidos en los últimos 100 mL los que corresponden a la concentración de electrolitos final adecuada. Además, la concentración de $\text{CaCl}_2(\text{H}_2\text{O})_2$ fue añadido al final de la mezcla (86).

Tabla 9. Concentraciones de Fluidos Simulados

	Fluido Salival Simulado (pH 7, Vol. 400mL, -20°C)		Fluido Gástrico Simulado (pH 3, Vol. 400mL, -20°C)		Fluido Intestinal Simulado (pH 7, Vol. 400mL, -20°C)	
Componente	Vol. mL	Concn. mmolL^{-1}	Vol. mL	Concn. mmolL^{-1}	Vol. mL	Concn. mmolL^{-1}
KCl	15.1	15.1	6.9	6.9	6.8	6.8
KH_2PO_4	3.7	3.7	0.9	0.9	0.8	0.8
NaHCO_3	6.8	13.6	12.5	25	42.5	85
NaCl	-	-	11.8	47.2	9.6	38.4
$\text{MgCl}_2(\text{H}_2\text{O})_6$	0.5	0.15	0.4	0.1	1.1	0.33
$(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$	0.06	0.06	0.5	0.5	-	-
Ajuste pH	mL	mmolL^{-1}	mL	mmolL^{-1}	mL	mmolL^{-1}
NaOH	-	-	-	-	-	-
HCl	0.09	1.1	1.3	15.6	0.7	8.4
Para 400mL	mL		mL		mL	
Agua MQ	373.75	-	365.7	-	338.5	-
Añadir al final		mmolL^{-1}		mmolL^{-1}		mmolL^{-1}
$\text{CaCl}_2(\text{H}_2\text{O})_2$	-	1.5	-	0.15	-	0.6

* $\text{CaCl}_2(\text{H}_2\text{O})_2$ —este compuesto solo se agrega, al final de la mezcla

2.3.6. Preparación de enzimas

En la presente tesis se usó 3 enzimas (α -amilasa, pepsina, pancreatina) y bilis las que fueron preparadas según lo muestra la Tabla 10, se usaron volúmenes de los fluidos simulados y agua miliQ (87).

Tabla 10. Preparación de stocks de enzimas y sales biliares

Enzima	Concentración U/mg	Preparación de soluciones stock	Stock de trabajo
α -amilasa	2.500	Stock deseado: 1.2mg/mL (3000 U/mL ⁻¹)	Concentración ideal: 75 U/mL ⁻¹
		Disolver 0.012g de amilasa en 10mL de SFF y alicuotar 1mL en 10 tubos eppendorf. Almacenar a -20°C.	Disolver 0.25 mL de sol. stock en 10 mL de SFF.
Pepsina	706	Stock deseado: 35mg/mL (24.71 U/mL ⁻¹)	Concentración ideal: 2000 U/mL ⁻¹
		Disolver 0.35g de pepsina en 10 mL de SGF y alicuotar 1mL en 10 tubos eppendorf. Almacenar a -20°C	Disolver 0.8 mL de sol. Stock en 10 mL de SGF.
Pancreatina	200 UPS	Stock deseado: 4 mg/mL.	Concentración ideal: 1X
		Disolver 0.2g de pancreatina en 50 mL de SIF y alicuotar 5 mL en 10 tubos falcon. Almacenar a -20°C	Disolver 1.25 mL de sol. stock en 10 mL de SIF.
Bilis	442 g/mol	Stock deseado: 70 mg/mL.	Concentración ideal: 10 mM
		Disolver 0.7g de bilis en 10 mL de Agua MiliQ y alicuotar 1 mL en 10 tubos eppendorf. Almacenar a 4°C por una semana o dos.	Disolver 0.625 mL de sol. stock en 10 mL de agua MiliQ.

2.3.7. Preparación de mesa y lugar de trabajo

Antes de comenzar con el protocolo de digestión es necesario preparar el espacio de trabajo. Para el desarrollo del ensayo se usó una campana extractora debido a que es un ambiente cerrado y controlado. En la Figura 3 se observan los siguientes materiales: tubos eppendorf 1

mL y 5 mL, 1 gradilla, agua miliQ estéril, micropipetas de 0.1 μ - 2.5 μ ; 5 μ - 20 μ ; 20 μ - 200 μ ; 100 μ - 1000 μ , gradillas de tips para 0.1 μ ; 200 μ ; 100 μ , mechero, marcador indeleble, encendedor y bolsa de desechos. Este material fue irradiado con UV por 15min para su desinfección. El material almacenado a 4°C como los fluidos simulados (SSF, SGF y SIF), las sales NaOH, CaCl₂(H₂O)₂, y las enzimas α -amilasa, pepsina, pancreatina y bilis; fueron atemperados para su uso en el protocolo (86).



Figura 6. Fotografía de los materiales en la campana extractora

En el mesón de trabajo fue colocado el baño maría previamente calentado a 37°C, además de un termómetro, alcohol y cámara de CO₂. Se configuró el potenciómetro revisando que esté en buenas condiciones y teniendo agua destilada suficiente para su limpieza. Además de las soluciones HCl 6M y NaOH 1M para el respectivo ajuste de pH. También la incubadora fue programada a 37°C.

2.3.8. Preparación de medio de cultivo

Antes de comenzar con el protocolo es necesario preparar la cantidad necesaria de Agar MRS (Man, Rogosa y Sharpe) debido a que las diluciones de cada fase deben de ser sembradas justo después de su incubación, por lo que no tenerlo listo demoraría el ensayo. Para la preparación de 1 litro de medio se debe pesar 68.2gr y disolver en agua desmineralizada. En la presente tesis se trabajó con 400mL de medio por lo que se pesó 27.28gr y se disolvió en 400 mL de agua miliQ (94). Esta mezcla fue calentada hasta ebullición, moviendo constantemente para evitar la sedimentación del agar en la base del balón. Una vez que el medio enfrió por unos minutos se distribuyó 100mL en matraces de 150mL los que corresponden a cada una de las fases. Estos fueron autoclavados a 121°C por 15min. Al término de este tiempo los matraces fueron almacenados en una incubadora programada a 69°C con el fin de mantener el medio líquido. Por último, antes de utilizar el medio, este fue enfriado hasta alcanzar una temperatura de entre 45°C-50°C, donde se añadió 0.05g de L-cisteína por cada 100 mL de medio MRS (110). Esto se debe a que las bacterias del género *Bifidobacterium* son consideradas auxótrofas para la

cisteína, es decir, no pueden asimilar el azufre inorgánico y requieren de una fuente orgánica externa (111).

2.3.9. Técnica de sembrado

En el protocolo que consta de 4 fases (Oral, Gástrica, Duodenal e Intestinal) dicta que luego de cada una la muestra es diluida y sembrada. Para este paso el medio está almacenado en una incubadora a 69°C, con fin de la mantener el medio líquido y evitar la gelificación. Antes de realizar las diluciones el medio debe ser enfriado hasta los 45°C. Una vez que las muestras estén diluidas y las placas rotuladas se procede a sembrar. En una placa vacía y rotulada se deposita 100µL de muestra que es previamente mezclada por vortex como se observa en la Figura 4, seguidamente es llenada con aproximadamente 100 mL a 120 mL de medio de cultivo a una temperatura menor a 45°C según la Figura 5. Esta técnica de sembrado se denomina siembra en placa vertida según la Figura 6 la que es ideal para la cuantificación de colonias ^[96]. Las placas gelificadas son incubadas boca abajo dentro de una cámara de CO₂ a 37°C por 48 a 72 horas (95).



Figura 7. Técnica de sembrado en placa vertida con 100 µL de muestra por placa



Figura 8. Temperatura ideal para sembrar las muestras

2.3.10. Método *in vitro* INFOGEST

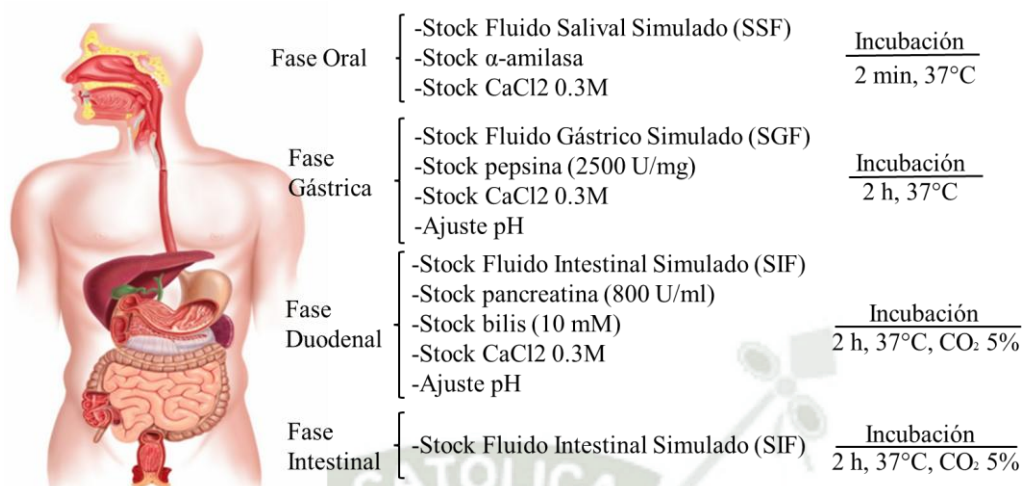
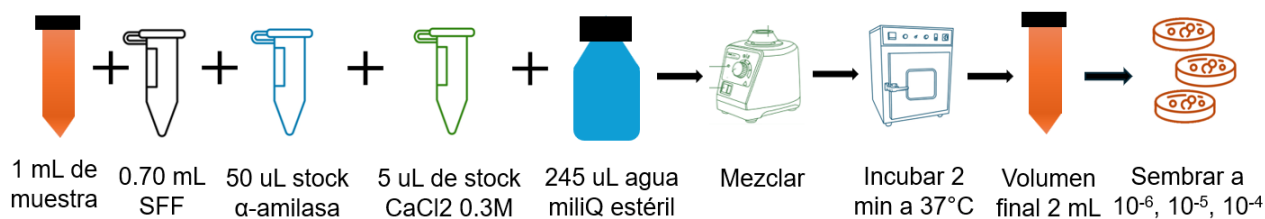


Figura 9. Protocolo del método de digestión *in vitro* INFOGEST. Nota. Adaptado de (86)

2.3.10.1. Fase Oral

Antes de la toma de muestra, es necesario quitar la delgada capa de nata que se crea en la superficie de yogur, debido a que la nata es la grasa formada durante la fermentación y es eliminada con el fin de obtener un yogur homogéneo y cremoso. Luego el yogur es batido hasta observar una textura homogénea. En esta fase se trabaja con un volumen final de 2mL, por lo que se usan tubos eppendorf de 5mL. A este se le coloca 1mL de yogur, debido a su espesor se usa una jeringa estéril de 1ml para la toma de muestra. Luego se le añade 700 μ L de Fluido Salival Simulado (SSF). Esto es mezclado por el vortex. A la mezcla se le añaden 50 μ L del stock de la enzima α -amilasa (1.2mg/mL; 2500U/mg), 5 μ L de stock de CaCl₂ 0.3M y 245 μ L de agua miliQ esteril. Finalmente es mezclado por el vortex e incubado por 2min a 37°C (86).

Culminados los 2 minutos de incubación la muestra es diluida y sembrada, para este paso son usados tubos eppendorf de 2mL los que previamente son llenados con 0.9 mL de Ringer. Para la dilución se usan 100 μ L de muestra, la cual es mezclada con el ringer usando el vortex y resuspendida sucesivamente. En esta fase se observó que la dilución ideal es 10⁻⁶. Las tres últimas diluciones son sembradas usando el método de placa vertida y son incubadas por 48 horas a 37°C y CO₂ 5% (86).


Figura 10. Digestión *in vitro* fase oral

2.3.10.2. Fase Gástrica

En esta fase se usa 1mL de la suspensión Oral, este es agregado a un tubo eppendorf de 5mL. Se le añade 750 μ L de Fluido Gástrico Simulado (SGF), este es mezclado usando el vortex. Luego se le añade 160 μ L de stock de pepsina (35 mg/mL; 406 U/mg) y 0.1 μ L de stock de CaCl_2 0.3M. Volver a mezclar y seguidamente ajustar el pH a 3 añadiendo HCl 6M solo de ser necesario. Por lo general son agregados de 10 μ L a 15 μ L de HCl 6M para obtener el pH deseado, se usa el potenciómetro para verificar el pH como se ve en la Figura 10. Luego se agrega el volumen necesario de agua miliQ para llegar a un volumen final de 2mL. Este volumen es mezclado con el vortex y luego incubado por 2 horas a 37°C (86).



Figura 11. Fotografía del ajuste de pH a 3 usando potenciómetro

Luego de la fase gástrica es necesario hacer un recuento de bacterias, para lo cual se hacen diluciones en 0.9mL de Ringer usando tubos eppendorf de 2mL, a estos se le añaden 100 μ L de la suspensión gástrica. La muestra es diluida hasta la dilución 10^{-5} , luego es sembrada en placas rotuladas como se observa en la Figura 11, luego estas placas son plaqueadas según el método de placa vertida. Luego son incubadas por 48 horas a 37°C y CO_2 5% (86).

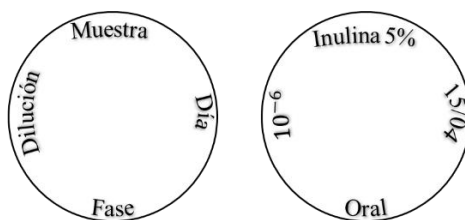


Figura 12. Fotografía del ejemplo de rotulado de placas

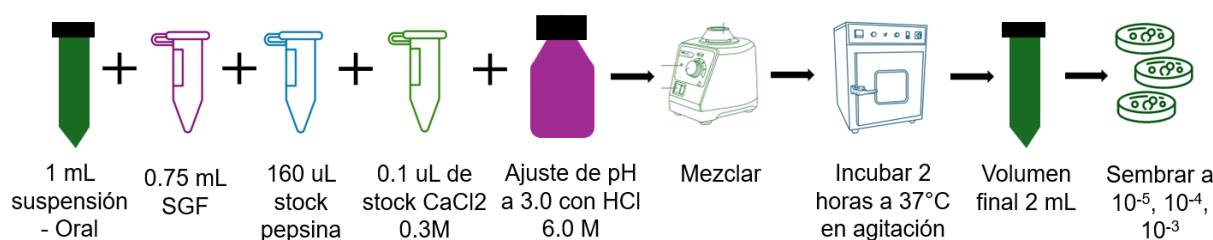


Figura 13. Digestión fase gástrica

2.3.10.3. Fase Duodenal

En esta fase se trabaja con 1mL de la suspensión gástrica; en un tubo eppendorf de 5mL es añadida la suspensión y se agrega 550µL de Fluido Intestinal Simulado (SIF). Luego de ser mezclado con el vortex, se le añade 250µL de pancreatina (4mg/mL), 125µL de la solución stock de bilis (70 mg/mL) y 2 µL de stock de CaCl₂ 0.3M. Seguidamente la suspensión es mezclada y el pH es ajustado a 7 usando NaOH 1M solo si es necesario, el pH es medido usando el potenciómetro como se observa en la Figura 12. Para terminar con esta fase, se añade la cantidad necesaria para alcanzar el volumen final de 2mL. La suspensión es mezclada por última vez e incubada por 10 min a 37°C a CO₂ 5%, para lograr estas condiciones se usó una cámara de CO₂ como se ejemplifica en la Figura 13.



Figura 14. Fotografía de la corrección de pH a 7

Terminada la incubación las muestras son diluidas en Ringer hasta la dilución 10⁻⁴, luego son sembradas y plaqueadas. Una vez el agar este gelificado las placas Petri sembradas son colocadas cara abajo y dentro de una cámara de CO₂ que a su vez será colocada dentro de la incubadora a 37°C por 48 horas.

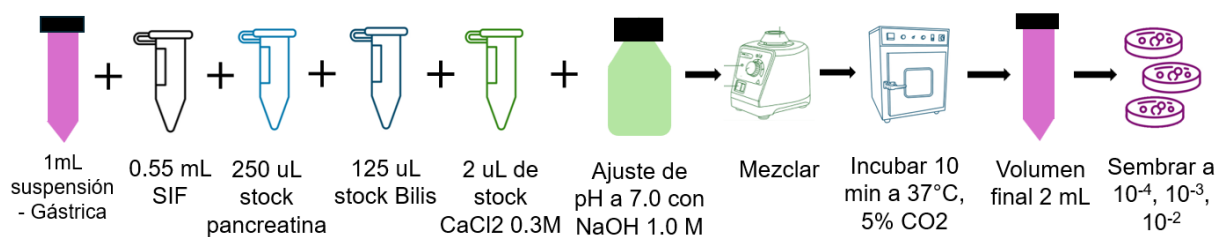


Figura 15. Digestión fase duodenal

2.3.10.4. Fase Intestinal

En esta última fase, se toma 1 mL de la fase intestinal y es colocado en un tubo eppendorf de 5 mL. A este se le añaden 2 mL de Fluido Intestinal Simulado (SIF) con el fin de reducir la concentración de bilis 3.3 mM y de pancreatina. Teniendo como volumen final 3 mL. Este es incubado por 2 horas a 37°C y CO₂ 5% como se observa en la Figura 14.

Luego de la incubación de cada Fase las placas sembradas se deben incuban por 48 h a 37°C a CO₂ 5% en la cámara de CO₂ como se ve en, terminado el tiempo de incubación las placas son observadas y las colonias cuantificadas.

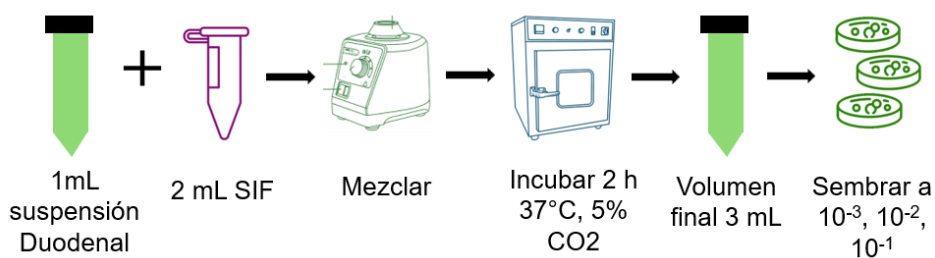


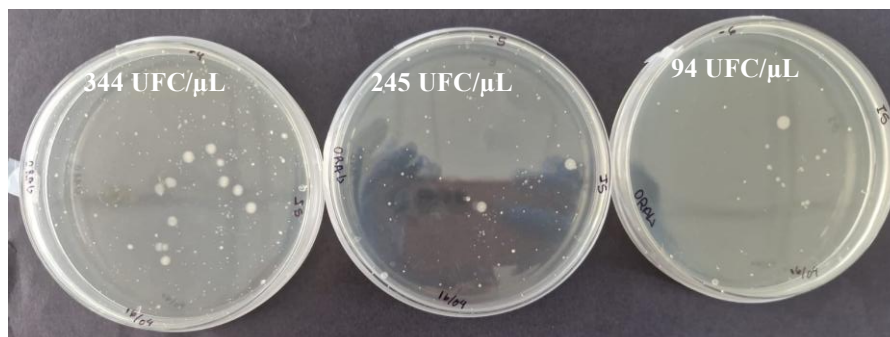
Figura 16. Digestión fase intestinal

2.3.11. Cuantificación de colonias ácido lácticas

Luego de cada fase las tres últimas diluciones indicadas en la Tabla 11. son sembradas en placas rotuladas y seguidamente son plaqueadas con el método de vertido en placa. El método de vertido en placa es ideal en la cuantificación de colonias, luego de 48 horas de incubación las placas de MRS agar son colocadas encima de una cartulina negra y las colonias de color blanquecino son cuantificadas como se observa en la Figura 16. Si las placas con colonias exceden los 250 UFC son demasiado numerosas para ser contadas (Too Numerous To Count, TNTC) y si es menor a 25 por placa se consideran recuentos estimados (CE) (96,97).

Tabla 11. Diluciones sembradas de cada Fase del método INFOGEST

	Fase Oral	Fase Gástrica	Fase Duodenal	Fase intestinal
Diluciones	10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5}	10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5}	10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4}	10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4}


Figura 17. Fotografía de placas con diluciones 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} de la Fase Oral

Para el cálculo de la cantidad de microorganismos viables en una placa en unidades UFC/mL se usó la Ecuación 2, que es parte del método de recuento en placa estándar adoptado por la FDA Manual Analítico bacteriológico (BAM) con el fin de evaluar la carga microbiana en alimentos, cosméticos, aguas y demás productos (97).

$$N = \frac{\sum C}{[(1 \times n_1) + (0.1 \times n_2) \times (d)]}$$

Ecuación 2. Ecuación de cantidad de microorganismos viables

Caracterización de los valores de la Ecuación 2. la variable N se reconoce como el número estimado de microorganismos por gramo o mililitro, $\sum C$ se refiere a la suma de colonias contadas en dos placas dentro del rango de 25-250, n_1 este valor es el valor mayor de la primera dilución, n_2 este valor es el valor de placas de la segunda dilución, d es la dilución a la que corresponde el valor menor (97).



CAPITULO III

3. RESULTADOS Y DISCUSION

3.1. Evaluación sensorial de yogur probiótico suplementado con inulina

Las características organolépticas del yogur posterior al proceso de fermentación incluyeron un color blanco cremoso, sabor de neutro a ligeramente ácido, pH de 4.5, aroma característico y consistencia semisólida. El análisis sensorial indicó una alta aceptabilidad del yogur elaborado con inulina al 5 %, según la encuesta presentada en el Anexo 6. Asimismo, no se evidenciaron diferencias significativas en los atributos de apariencia, acidez y cremosidad entre los tratamientos evaluados (Medina, 2026). La adición de inulina de agave como prebiótico contribuye a la textura cremosa obtenida luego de la fermentación, ya que durante este proceso se forma una red tridimensional de proteínas lácteas donde las micelas de caseína interactúan con proteínas de suero desnaturalizadas mediante enlaces hidrofóbicos y electroestáticos (113,114).

Durante la fermentación del yogur se observó un cambio significativo en la consistencia y textura de la leche. Este fenómeno puede deberse a la desnaturalización proteica inducida por la pasteurización, donde la leche fue sometida a 85°C durante 15 minutos, favoreciendo la interacción entre las proteínas de suero y la caseína, mediante enlaces covalentes (115). Posteriormente, la adición de cultivo ácido láctico provoca una disminución del pH desde 6.8 hasta 4.5, el cual es el punto isoeléctrico de los micelios de caseína. Por lo tanto, la carga negativa de los micelios y la estabilización estérica disminuyen lo que resulta en la coagulación de la caseína, formando una red de gel tridimensional que confiere al producto final una textura firme y consistencia semisólida (115).

La adición de inulina como prebiótico pudo influir en las características organolépticas del yogur. Dado su bajo contenido proteico, las moléculas de inulina se dispersan con libertad fácilmente entre las micelas de caseína, interfiriendo en la formación de red proteica responsable de la estructura del gel. Esta interacción contribuye a un incremento en la cremosidad y viscosidad (114). Diversos autores reportaron que la inulina favorece la sinéresis del probiótico y estimula la producción de ácidos grasos volátiles, los que contribuyen a preservar las características sensoriales del yogur incluso después de 28 días de almacenamiento.

Al finalizar el proceso de batido, se evidenció que la concentración de inulina afectó la textura y consistencia, mientras que el color permaneció constante en todas las muestras.

Particularmente la formulación de 6.5% de inulina presentó una textura más cremosa y firme, lo que coincide con lo reportado por Brennan y Tudorica (116) quienes observaron que la adición de 6% de inulina mejoró la cremosidad, la sensación en la boca y la suavidad.

Asimismo, se observó una delgada capa de grasa en la superficie del yogur fermentado, lo que sugiere una reducción del contenido graso. La grasa de la leche está compuesta principalmente por acilglicéridos, aproximadamente 96-68%, los cuales pueden ser hidrolizados durante el proceso de fermentación, liberando glicerol y ácidos grasos libres, disminuyendo la concentración grasa del producto (112).

3.1.1. Evaluación microbiológica luego de la fermentación y almacenamiento

Al término de la fermentación las muestras fueron expuestas a shock térmico para detener la producción de ácido láctico. Luego fueron sembradas en agar MRS con 0.05g de L-Cisteína e incubadas por 48 horas a 37°C y CO₂ 5%, donde se observó un crecimiento de 9.80 log₁₀(UFC)/mL y de 9.04 log₁₀(UFC)/mL para las concentraciones de inulina al 6.5 y 5 % respectivamente. Según otros estudios luego de 36 horas de incubación se observó un crecimiento de 9.74 log₁₀(UFC)/mL con inulina (113).

Según lo reportado por Rezaei et al. (117) el almacenamiento del yogur a 4°C, puede generar una reducción de 0.4 log de *Bifidobacterium lactis*. Esta disminución se relaciona a la formación de microcristales durante periodo de refrigeración, los cuales causan estrés mecánico y compromete la viabilidad bacteriana. Cruz et al. (118) observaron que luego del almacenamiento en congelación, las cepas de *Bifidobacterium spp.* presentaron mayor sensibilidad a la exposición al aire y a los cambios de acidez en comparación con *Lactobacillus acidophilus*, reduciendo su concentración bacteriana a pesar de haber alcanzado un valor elevado al término de la fermentación.

En comparación con lo reportado por Ekkachai Kaewarsa et al. (113), al emplear GOS (galacto-oligosacáridos) como prebiótico se observó un crecimiento de 9.54 log CFU/mL luego de 36 horas de incubación. Por otro lado, al suplementar con FOS (fructo-oligosacáridos), los autores reportaron un incremento mayor, alcanzando 9.72 log CFU/mL al término de 18 horas de incubación. En ambos casos, las muestras fueron sembradas en agar MRS, medio selectivo utilizado para la recuperación y cuantificación de bacterias probióticas, especialmente del género *Bifidobacterium* y *Lactobacillus*.

3.2. Supervivencia de *Bifidobacterium sp.* luego de la digestión del modelo *in vitro* INFOGEST

Se evaluó la supervivencia de la cepa probiótica *Bifidobacterium sp.* en yogur suplementado con inulina 5% y 6.5%, así como en dos yogures comerciales (YoG1 y YoG2), mediante la digestión *in vitro* INFOGEST. Los siguientes resultados son expresados en la unidad (Log_{10} UFC/mL), debido a que se trabajó con conteos bacterianos elevados (10^7 - 10^9) y la transformación logarítmica ayuda a normalizar los resultados facilitando la comparación entre los tratamientos. En la Figura 18 se presentan los resultados correspondientes a la Fase oral y gástrica del proceso digestivo.

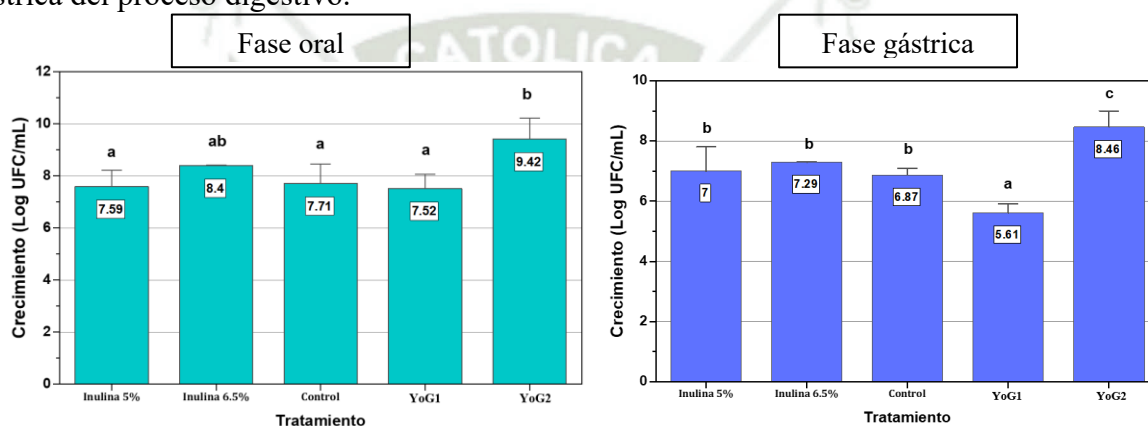


Figura 18. Viabilidad de *Bifidobacterium sp.* en Fase oral y gástrica

Luego de la digestión en la fase oral, no se observó una disminución significativa en el crecimiento bacteriano. Esto podría deberse a que la α -amilasa tiene como función principal la hidrólisis del almidón mediante la ruptura de los enlaces α -1,4-glucosídicos; sin embargo, el yogur no presenta el sustrato adecuado y esta enzima no ejerce un efecto directo sobre las bacterias. Durante la fase gástrica, esta enzima permanece activa por unos breves minutos hasta ser desnaturalizada por el medio ácido, cuyo pH oscila entre 1.5 a 2.0 (119).

En la fase gástrica, el yogur es hidrolizado por la pepsina debido a su función como endopeptidasa, la cual actúa principalmente sobre la caseína, rompiendo los enlaces peptídicos y generando péptidos como producto (120). Además, esta enzima afecta negativamente la viabilidad de *Bifidobacterium sp.* porque hidroliza proteínas presentes en la membrana celular, debilitando su estructura y favoreciendo la lisis bacteriana. Según lo reportado por Khosravi Zanjani et al. (121) al exponer cepas de *Bifidobacterium sp.* libres o micro encapsuladas a condiciones gástricas simuladas, no observaron una diferencia relevante, ya que, tras 120 minutos de incubación en agar MRS los conteos bacterianos se redujeron a cero.

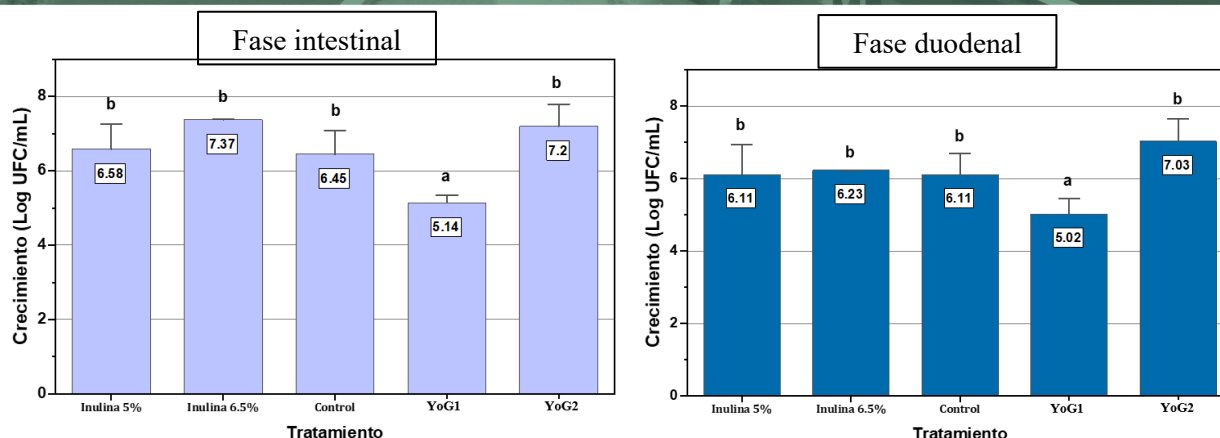


Figura 19. Viabilidad de *Bifidobacterium sp.* en Fase intestinal y duodenal

En la fase intestinal, se trabaja con la pancreatina, una mezcla de enzimas pancreáticas como (proteasas, amilasas, lipasas y nucleasas) que ejerce un efecto limitado sobre la viabilidad de *Bifidobacterium sp.* Las proteasas pueden hidrolizar parcialmente las proteínas de la membrana celular. Además, es posible que la pancreatina contribuya al estrés enzimático del entorno intestinal. Sin embargo, este efecto puede ser menos drástico que el provocado durante la fase intestinal.

Según lo reportado por Lee J. et al. (122) las cepas *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* mostraron mayor una reducción del conteo bacteriano tras la digestión gástrica que durante la intestinal. Esto podría explicar el leve incremento en los conteos bacterianos observados en la fase intestinal en la Figura 19.

Durante el proceso de digestión *in vitro* se observó diversos cambios en la textura y consistencia de las muestras. Los yogures prebióticos preparados mantuvieron una textura cremosa, aunque presentaron una consistencia más líquida a medida que avanzaban las etapas de digestión. Por otro lado, las muestras de yogur comercial no mostraron cambios apreciables en su textura ni en su estabilidad. Este comportamiento podría deberse a la presencia de estabilizadores y conservantes agregados durante su preparación, los cuales contribuyen a mantener la estructura y viscosidad del producto bajo condiciones variables.

En los ingredientes de la muestra YoG1 se encontró como estabilizador a pectina (SIN 440) y como sustancia conservadora a sorbato de potasio (SIN 202), y en la muestra YoG2 como estabilizador a pectina SIN 440 y a almidón oxidado (SIN 1404). Estas sustancias no muestran mayor interacción con la cepa *Bifidobacterium sp.* y durante la digestión solo su inminente degradación. El cambio en su textura y estabilidad podría deberse a la degradación progresiva

de estas sustancias, al no estar presentes las muestras pierden cremosidad y firmeza. En algunos estudios observaron que el consumo de pectina, derivada de la manzana, en alimentos grasos provocó la remisión de la inflamación intestinal y mejoró las funciones de la barrera intestinal (123).

La diferencia significativa observada entre los conteos bacterianos de los yogures comerciales puede atribuirse a las variaciones propias de cada producto y marca. Aunque en los ingredientes se indican los nombres de los cultivos bacterianos presentes, no siempre especifican la cepa utilizada, ya que algunas cepas son más tolerantes a cambios de temperatura y pH que otras.

Asimismo, algunas marcas pueden incluir células VBNV (viables, pero no cultivables), las cuales son más frágiles frente a condiciones de estrés gastrointestinal intenso. Además, es importante considerar que la concentración inicial de probióticos puede variar, de modo que incluso si presentan la misma tasa de mortalidad durante la digestión, los niveles finales pueden ser insuficientes para lograr un efecto funcional. Por último, aunque muchos productos declaran contener cultivos vivos, no necesariamente aseguran cantidades suficientes para ser funcionales (128).

3.3. Comparar la viabilidad de la cepa probiótica *Bifidobacterium sp.* presente en el yogur prebiótico y yogur comercial luego de la digestión gastrointestinal simulada.

Luego de la digestión simulada de todos los tratamientos, se compararon los recuentos bacterianos, observándose que el yogur suplementado con inulina al 6.5% y el yogur comercial YoG2 presentaron la mayor supervivencia. Este resultado resalta la resistencia de los cultivos de *Bifidobacterium sp.* frente a las condiciones adversas del tracto gastrointestinal, siendo una cualidad determinante para su eficacia como probiótico.

Según lo reportado por Treven et al. (105), la supervivencia de los probióticos durante su paso por el sistema gastrointestinal depende no solo de la resistencia propia de la cepa, sino también de la matriz alimentaria, ya que esta actúa como un vehículo protector que contribuye a mantener la viabilidad.

Tabla 12. Comparación de la viabilidad de *Bifidobacterium sp.* presente en yogur con inulina al 6.5% y yogur comercial YoG2

Tratamiento	Recuento Log ₁₀ (UFC)/mL	F	Significancia (P)
	X ± S		
Inulina 6.5% Oral	8.40 ± 0.02	24.60	0.001 (p<0.01)**
Inulina 6.5% Gástrica	7.29 ± 0.02		
Inulina 6.5% Duodeno	7.37 ± 0.02		
Inulina 6.5% Intestinal	6.23 ± 0.01		
YoG2 Oral	9.42 ± 0.80		
YoG2 Gástrica	8.46 ± 0.54		
YoG2 Duodeno	7.20 ± 0.59		
YoG2 Intestinal	7.03 ± 0.62		

** Diferencias altamente significativas (p<0.01)

En la Tabla 16, se presentan los recuentos y las desviaciones estándar del crecimiento de *Bifidobacterium sp.* expresados en Log₁₀UFC/mL, luego de la digestión *in vitro* de un yogur probiótico suplementado con inulina al 6.5% y un yogur probiótico comercial (YoG2). El análisis de varianza (ANOVA), reveló diferencias altamente significativas (p<0.01), en la viabilidad de *Bifidobacterium sp.* entre los tratamientos evaluados.

Los recuentos más altos se registraron en la fase oral por el YoG2 (9.42 Log₁₀UFC/mL) mientras que el yogur preparado con Inulina al 6.5% presento una disminución en un 10%. En la fase gástrica se observó una caída drástica de ambos tratamientos, atribuible a la exposición al pH y la presencia de pepsina, considerados los factores más críticos para la supervivencia de probióticos (86). Según lo reportado por Ospanov et al. (124) la etapa gástrica es generalmente la más agresiva para las bacterias ácido lácticas, incluidas diversas especies de *Bifidobacterium sp.*

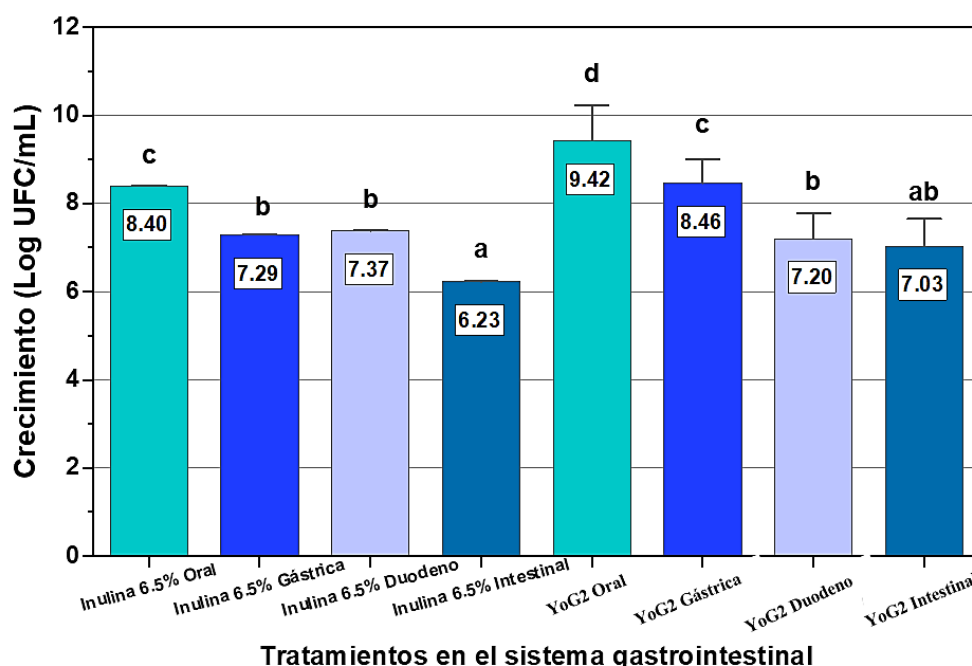


Figura 20. Comparación de la viabilidad de *Bifidobacterium sp.* en yogur con inulina al 6.5% y yogur comercial YoG2

Durante la fase duodenal, los recuentos fueron estables alcanzando un valor equivalente, lo que coincide con estudios con lo reportado por Hossain et al. (125) donde demuestran una mayor tolerancia a las sales biliares y enzimas pancreáticas. Finalmente, en la fase intestinal, se observó la mayor reducción, alcanzando los valores promedio cercanos a 6.23 Log₁₀UFC/mL. esta reducción es reportada como consecuencia del efecto combinado de las sales biliares y la prolongada exposición puede dañar la integridad celular. El yogur comercial YoG2 mostró una concentración de 7.03 Log₁₀UFC/mL, siendo posible que los agregados químicos en su composición tuvieran la función de amortiguar químicamente los cambios propios de la digestión.

Ambas concentraciones finales se encuentran dentro del rango recomendado según el Reglamento de la leche y productos lácteos del Gobierno Peruano (2017). Los mismos que recomienda que un producto lácteo debe tener una concentración inicial de por lo menos 8 Log₁₀UFC/mL, ya que la concentración mínima aceptada de bacterias lácticas totales es de 7 Log₁₀UFC/mL y para microorganismos agregados como *Lactobacillus* o *Bifidobacterium sp.* debe ser un valor no mínimo a 6 Log₁₀UFC/mL (106). Por lo que, los resultados sugieren que la concentración de Inulina al 6.5% permite una supervivencia considerable de *Bifidobacterium sp.* suficiente para la colonización del intestino y cumpliendo con sus características como probiótico.

CONCLUSIONES

- Se elaboró un yogur probiótico suplementado con inulina a dos concentraciones (5% y 6.5%), obteniéndose un producto con características fisicoquímicas adecuadas ($\text{pH} \approx 4.5$, textura cremosa y firme) y con recuentos iniciales de *Bifidobacterium sp.* Superiores a $8 \text{ Log}_{10}\text{UFC/mL}$, valores considerados apropiados para un alimento funcional destinado al consumo.
- Se observó una reducción progresiva en la viabilidad bacteriana en todos los tratamientos evaluados. Sin embargo, el tratamiento con 6.5 % de inulina presentó una mayor viabilidad en comparación con el control sin prebiótico. Estos resultados indican que, si bien la adición de inulina no mantiene una viabilidad constante durante todo el proceso digestivo, sí contribuye a brindar mayor estabilidad a las bacterias, permitiendo conservar una mayor proporción de colonias viables.
- Se observó que el tratamiento con 6.5% de Inulina presentó una viabilidad bacteriana de $6.23 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/mL}$, valor comparable al registrado en el yogur comercial YoG2 ($7.03 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/mL}$) al finalizar la digestión, con una diferencia de $0.8 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/mL}$. Estos valores se encuentran dentro del rango mínimo recomendado para productos probióticos, establecido entre 6 y $7 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/mL}$.
- Los yogures comerciales (YoG1 y YoG2) mostraron una menor variación en la viabilidad durante la digestión, probablemente debido a la presencia de estabilizantes como SIN 404, SIN 1404 y SIN 240 en su formulación. No obstante, se observó una diferencia significativa en los recuentos bacterianos entre ambos productos después del proceso digestivo, lo que podría estar asociado a una eventual ruptura de la cadena de frío, variaciones en el almacenamiento o a diferencias en la calidad y formulación de cada producto.

RECOMENDACIONES

- Antes de iniciar el método de digestión in vitro INFOGEST, es necesario contar con todos los materiales y equipos previamente preparados. Asimismo, se recomienda establecer un cronograma para la preparación de los fluidos, con el fin de garantizar la adecuada actividad de las enzimas durante el proceso experimental.
- Para futuras investigaciones se recomienda emplear el método de digestión in vitro dinámico basado en el protocolo INFOGEST, con el fin de escalar el estudio y evaluar no solo la viabilidad de las bacterias probióticas durante el proceso digestivo, sino también la producción de metabolitos derivados de la fermentación intestinal, como los ácidos grasos de cadena corta.
- Dado que la adición de inulina de agave como prebiótico mostró un efecto favorable en la estabilidad de las bacterias probióticas, se recomienda evaluar otras fuentes de prebióticos que puedan ser utilizadas en la elaboración de yogur, con el fin de identificar alternativas que ofrezcan beneficios similares o superiores y que contribuyan a mantener la viabilidad bacteriana durante el proceso digestivo.
- Se recomienda evaluar la viabilidad de las bacterias probióticas en yogures almacenados durante 7, 14, 21 y 30 días posteriores a su elaboración, utilizando el método de digestión in vitro, con el fin de analizar el efecto del tiempo de almacenamiento sobre la supervivencia bacteriana durante el tránsito gastrointestinal simulado.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Fuller, R. History and development of probiotics. In: probiotics, Springer, Dordrecht; 1992. Doi: doi.org/10.1007/978-94-011-2364-8_1
2. Hadjimbei E, Botsaris G, Chrysostomou S. Beneficial effects of yoghurts and probiotic fermented milks and their functional food potential. Foods; 2022.11(17):2691. Doi: <http://dx.doi.org/10.3390/foods11172691>
3. Nyanzi R, Jooste PJ, Buys EM. Invited review: Probiotic yogur quality criteria, regulatory framework, clinical evidence, and analytical aspects. J Dairy Sci ; 2021. 104(1):1-119. Doi: <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2020-19116>
4. Sebastián Domingo JJ. Revisión del papel de los probióticos en la patología gastrointestinal del adulto. Gastroenterol Hepatol. 2017;40:417-429.
5. Staley C, Weingarden AR, Khoruts A, Sadowsky MJ. Interaction of gut microbiota with bile acid metabolism and its influence on disease states. Appl Microbiol Biotechnol. 2017;101(1):47-64. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-016-8006-6>
6. Brodkorb A, Egger L, Alminger M, Alvito P, Assuncao R, Balance S, et al. INFOGEST static in vitro simulation of gastrointestinal food digestion. Nature Protocols. 2019; 14(4): 991-1014. Doi: 10.1038/s41596-018-0119-1
7. Han S, Lu Y, Xie J, Fei Y, Zheng G, Wang Z, et al. Probiotic gastrointestinal transit and colonization after oral administration: A long journey. Front Cell Infect Microbiol. 2021; 11:609722.
8. Valdes, A; Walter , J; Segal, E; Spector, T. D. Role of the gut microbiota in nutrition and health. 2018, BMJ, k2179. Doi: doi:10.1136/bmj.k2179
9. Puebla-Barragan S, Reid G. Forty-five-year evolution of probiotic therapy. MicrobCell; 2019. 6(4):184-96. Doi: dx.doi.org/10.15698/mic2019.04.673
10. Singh D, Singh A, Kumar s. Probiotics: friend or foe to the human immune system. 2023; 47:126. Doi: doi.org/10.1186/s42269-023-01098-7
11. Kechagia M, Basoulis D, Konstantopoulou S, Dimitriadi D, Gyftopoulou K, Skarmoutsou N, et al. Health benefits of probiotics: a review. ISRN Nutr. 2013;2013:481651. Doi: <http://dx.doi.org/10.5402/2013/481651>
12. Sanders ME, Merenstein D, Merrifield CA, Hutkins R. Probiotics for human use. Nutr Bull. 2018;43(3):212-25. Doi: <http://dx.doi.org/10.1111/nbu.12334>

13. Hou K, Wu Z, Chen X, Wang J, Zhang D, Xiao D et al. Microbiota in health and diseases. *Signal Transduction and targeted Therapy*. 2022; 7(1):135. Doi: <https://doi.org/10.1038/s41392-022-00974-4>
14. Thursby E, Juge N. Introduction to the human gut microbiota. *Biochemical Journal*. 2017; 474(11): 1823-36. Doi: 10.1042/BCJ20160510
15. Bull M, Plummer N. Part 1: The human Gut Microbiome in Health and Disease. *Integrative Medicine*. 2014; 13(6):17-22.
16. Jandhyala S, Talukdar R, Subramanyam C, Vuyyuru H, Sasikala M, Reddy D. Role of the normal gut microbiota. *World Journal of Gastroenterology*. 2015; 21(29): 8787-8803. Doi: <http://dx.doi.org/10.3748/wjg.v21.i29.8787>
17. Guo P, Zhang K, Ma X, He P. Clostridium species as probiotics: potentials and challenges. *Journal of animal Science and Biotechnology*. 2020; 11:24. Doi: <http://dx.doi.org/10.3748/wjg.v21.i29.8787>
18. Bermudez-Brito M, Plaza-Diaz J, Muñoz-Quezada S, Gomez-Llorente C, Gil A. Probiotic Mechanisms of action. *Ann Nutr Metab*. 2012; 61:160-174. Doi: 10.1159/000342079
19. Bhargava S, Merckelbach E, Noels H, Vohra A, Jankowski J. Homeostasis in the Gut Microbiota in Chronic Kidney Disease. *Toxins*. 2022; 14, 648. Doi: <https://doi.org/10.3390/toxins14100648>
20. Lozupone C, Stombaugh J, Gordon J, Jansson, Knight R. Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. *Nature*. 2012; 489(7415): 220-230. Doi:10.1038/nature11550
21. O'hara A, Shanahan F. The gut flora as a forgotten organ. *European Molecular Biology Organization*. 2006; 7(7):688-93. Doi: <http://dx.doi.org/10.1038/sj.embor.7400731>
22. Latif A, Shehzad A, Niazi S, Zahid A, Ashraf W, Iqbal MW et al. Probiotics: mechanism of action, health benefits and their application in food industries. *Frontiers in Microbiology*. 2023; 14:1216674. Doi: 10.3389/fmicb.2023.1216674
23. Yildirim Z, Johnson M. Characterization and Antimicrobial Spectrum of Bifidocin B, a Bacteriocin Produced by Bifidobacterium bifidum NCFB 1454. *Journal of Food Protection*. 1998; 61(1), 47-51. Doi: <http://dx.doi.org/10.4315/0362-028x-61.1.47>
24. Maftai N, Raileanu c, Balta A, Ambrose L, Boev M Marin D, Lisa E. The Potential Impact of Probiotics on Human Health: An Update on Their Health-Promoting Properties. *Microorganisms*. 2024, 12, 234. Doi: <https://doi.org/10.3390/microorganisms12020234>
25. Hemarajata P, Versalovic J. Effects of probiotics on gut microbiotca: mechanisms of intestinal immunomodulation and neuromodulation. *Therapeutic Advances in gastroenterology*. 2013; 6(1) 39-51. Doi: DOI: 10.1177/1756283X12459294

26. Garcia-Cabrerizo R, Cryan J. A gut (microbiome) feeling about addiction: Interactions with stress and social systems. *Neurobiology of Stress*, 2024; 30(100629). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.ynstr.2024.100629>
27. Wang X, Zhang P, Zhang X. Probiotics Regulate Gut Microbiota: AN Effective Method to Improve Immunity. *Molecules*. 2021; 26, 6076. Doi: <https://doi.org/10.3390/molecules26196076>
28. Halloran K, Underwood M. Probiotic mechanisms of action. *Early Human Development*. 2019; 135, 58-65. Doi: [10.1016/j.earlhumdev.2019.05.010](https://doi.org/10.1016/j.earlhumdev.2019.05.010)
29. Ennahar S, Cai Y, Fujita Y. Phylogenetic Diversity of Lactic Acid Bacteria Associated with Paddy Rice Silage as Determined by 16S Ribosomal DNA Analysis. *Applied and Environmental Microbiology*. 2003; 444-451. Doi: [10.1128/AEM.69.1.444-451.2003](https://doi.org/10.1128/AEM.69.1.444-451.2003)
30. Gautam P, Vimal A. Phylogenetic Analysis of Selected Lactic Acid Bacteria by Using Bioinformatic Tools. *International Journal of Engineering and Technical Research (IJETR)*. 2014; (2), 8.
31. Carvalho L, Fernandes N, Silva B, Gonzales-Barron U, Cadavez V. Molecular Identification and Phyogenetic Inference of Lactic Acid Bacteria Isolated from Goat's Raw Milk cheese. *Biol. Life Sci. Forum*. 2023; 26,39. Doi: <https://doi.org/10.3390/Foods2023-15103>
32. Schleifer K, Ludwig W. Phylogenetic relationship of lactic acid bacteria. 1995; 7-18. Doi: [10.1007/978-1-4615-5817-0_2](https://doi.org/10.1007/978-1-4615-5817-0_2)
33. Vinicius G, Oliveira B, Irineudo A, Thomaz V, Soccol C. How to select a probiotic? A review and update of methods and criteria. *Biotechnology Advances*. 2018; (36) 2060-2076. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.09.003>
34. Monckeberg F, Corsini G. Microbiotca intestinal, metabolismo y balance calorico. *Rev Chil Nutr*. 2011; (38). Doi: <https://dx.doi.org/10.4067/S0717-75182011000400011>
35. Parmar A. Probiotic Selection: Navigating FAO/WHO Guidelines for Optimal Attributes. *International Conference on Contemporary Issues in Integrating Health and Nutrition with the Emerging Areas of Food Technology, Agriculture, Environment and Allied Sciences*. 2019; 105-109.
36. Torres-Maravilla E, Reyes-Pavón D, Benítez-Cabello A, Gonzáles-Vásquez R, Ramírez-Chamorro L, Langella P, Bermúdez-Humarán L. Strategies for the Identification and Assessment of Bacterial Strains with Specific Probiotic Traits. *Microorganisms*. 2022; 10, 1389. Doi: <https://doi.org/10.3390/microorganisms10071389>

37. Klaenhammer T, Kullen M. Selection and design of probiotics. *International Journal of Food Microbiology*. 1999; 50(1-2), 45-57. Doi: 10.1016/s0168-1605(99)00076-8
38. Feng T, Wang J. Oxidative stress tolerance and antioxidant capacity of lactic acid bacteria as probiotic: a systematic review. *Gut Microbes*. 2020;9;12(1):1801944. Doi: 10.1080/19490976.2020.1801944.
39. Bustos AY, Taranto MP, Gerez CL, Agriopoulou S, Smaoui S, Varzakas T, et al. Recent advances in the understanding of stress resistance mechanisms in probiotics: Relevance for the design of functional food systems. *Probiotics Antimicrob Proteins* . 2024; Doi: <http://dx.doi.org/10.1007/s12602-024-10273-9>
40. Collado M, Guimonde M, Hernandez M, Sanz Y, Salminen S. Adhesion of selected *Bifidobacterium* Strains to Human Intestinal Mucus and the Role of Adhesion in Enteropathogen Exclusion. *Journal of Food Protection*. 2005; 68(12):2672-8. Doi: <http://dx.doi.org/10.4315/0362-028x-68.12.2672>
41. Guan C, Chen X, Jiang X, Zhao R, Yuan Y, Chen D. et al. In vitro studies of adhesion properties of six lactic acid bacteria isolated from the longevous population of China. *Royal Society of Chemistry*. 2020; 10(41):24234-40. Doi: <http://dx.doi.org/10.1039/d0ra03517c>
42. Monteagudo-Mera A, Rastall R, Gibson G, Charalampopoulos D, Chatzifragkou A. Adhesion mechanisms mediated by probiotics and prebiotics and their potential impact on human health. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2019; 103(16):6463-72. Doi: <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-019-09978-7>
43. Klein G, Pack A, Bonaparte C, Reuter G. Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*. 1998; 41(2), 103-125. Doi: doi:10.1016/s0168-1605(98)00049-x
44. Felis G, Dellaglio F. Taxonomy of lactobacilli and *Bifidobacteria*. *Curr. Issues Intestinal Microbiol*. 2015; 8: 44-61.
45. Holzapfel W, Haberer P, Geisen R, Björkroth J, Schillinger U. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *American Society for Clinical Nutrition*. 2001; 73:365S-73S.
46. Holzapfel W, Haberer P, Snel J, Schillinger U, Huis in't Veld, J. H. Overview of gut flora and probiotics. *International Journal of Food Microbiology*. 1998; 41:85-101. Doi: 10.1016/s0168-1605(98)00044-0
47. Zommiti M, Feuilleley M, Connil N. Update of Probiotics in Human World: A Nonstop Source of Benefactions till the End of Time. *Microorganisms*. 2020; 8(12):1907. Doi: <http://dx.doi.org/10.3390/microorganisms8121907>

48. Ruiz-Ramírez Y, Valadez-Blanco R, Calderón-García C, Chikindas ML, Ponce-Alquicira E. Probiotic and functional potential of lactic acid bacteria isolated from pulque and evaluation of their safety for food applications. *Front. Microbiol.* 2023; 14:1241581. Doi: <http://dx.doi.org/10.3390/microorganisms8121907>
49. Wassenaar T, Klein G. Safety Aspects and Implications of Regulation of Probiotic Bacteria in Food and Food Supplements. *Journal of Food Protection.* 2008; 71(8):1734-1741.
50. Zawistowska-Rojek A, Tyski S. Are Probiotic Really Safe for Humans? *Polish Journal of Microbiology.* 2018;67(3):251-258. Doi: <https://doi.org/10.21307/pjm-2018-044>
51. Sanders M, Akkermans L, Haller D, Hammerman C, Heimbach J, Hörmannspurger G, et al. Safety assessment of probiotics for human use. *Gut Microbes.* 2010; 1(3):164-85. Doi: <http://dx.doi.org/10.4161/gmic.1.3.12127>
52. O'Brien J, Crittenden R, Ouwehand A, Salminen S. Safety evaluation of probiotics. *Trends in Food Science & Technology.* 1999;10(12):418-424. Doi: 10.1016/s0924-2244(00)00037-6
53. Salminen S, Wright A, Morelli L, Marteau P, Brassart D, M. de Vos W, et al. Demonstration of Safety of probiotics – a review. *International Journal of food Microbiology.* 1998; 44(1-2):93-106. Doi: 10.1016/s0168-1605(98)00128-7
54. Casarotti S, Carneiro B, Todorov S, Nero L, Rahal P, Penna A. In vitro assessment of safety and probiotic potential characteristics of *Lactobacillus* strains isolated from water buffalo mozzarella cheese. *Ann Microbiol.* 2017; 67:289-301. Doi: 10.1007/s13213-017-1258-2
55. Shivani T, Sathivelu M. Probiotic evaluation, adherence capability and safety assessment of *Lactococcus lactis* strain isolated from an important herb “*Murraya koenigii*”. *Scientific Reports.* 2024; 14(1):15565. Doi: <https://doi.org/10.1038/s41598-024-66597-7>
56. Djide N, Yanti N, Pratiwi N, Nuzulia A, Asri R. Assessment of probiotic properties and safety of lactic acid bacteria isolated from south Sulawesi ethnic cheese. *Journal of Experimental Biology and Agricultural Science.* 2021; 9:S222-S227. Doi: [dx.doi.org/10.18006/2021.9\(spl-2-icopmes_2020\).s222.s227](http://dx.doi.org/10.18006/2021.9(spl-2-icopmes_2020).s222.s227)
57. Gueimonde M, Sánchez B, Reyes-Gavilán C, Margolles A. Antibiotic resistance in probiotic bacteria. *Frontiers in Microbiology.* 2013;4:202. Doi: 10.3389/fmicb.2013.00202
58. Zheng M, Zhang R, Tian X, Zhou X, Pan X, Wong A. Assessing the risk of probiotic dietary supplements in the context of antibiotic resistance. *Frontiers in Microbiology.* 2017;8:908. Doi: 10.3389/fmicb.2017.00908

59. Zavisic G, Popovic M, Stojkov S, Medic D, Gusman V, Jovanovic Ljeskovic N, Jovanovic Galovic A. Knowledge Gaps, market overview and preliminary screening. *Antibiotics*. 2023;12,1281.Doi:[https:// doi.org/10.3390/antibiotics12081281](https://doi.org/10.3390/antibiotics12081281)
60. Wiegiers C, van Beek EHT, Larsen OFA. Clinical research with probiotics as an indicator of global valorization since the year 2000. *Front. Microbiol*. 2023; 14:1323920. Doi: 10.3389/fmicb.2023.1323920
61. Tamayo C. Clinical Research on Probiotics: The Interface between Science and Regulation. *Clinical Infectious Diseases*. 2008; 46:S101-3.Doi:10.1086/523332
62. Al-Medhagi H, Alramo A. Clinical trials of probiotics: Current outlook. *Food Sci Nutr*. 2024;12:2192-2194. Doi: 10.1002/fsn3.3884
63. Khaledi M, Ghaleh H, Abyazi M, Hosseini H, Golmohammadi R. The Anticancer Properties of Probiotic Species. *J Appl Biotechnol Rep*. 2023;10(4):1123-1139.Doi: 10.30491/JABR.2023.401696.1644
64. Momin E S, Khan A A, Kashyap T et al. The Effects of Probiotics on Cholesterol Levels in Patients With Metabolic Syndrome: A Systematic Review. *Cereus*. 2023; 15(4):e37567. Doi: 10.7759/cureus.37567
65. Cheng L, Liu Y, Wu C, Wang S, Tsai Y. Psychobiotics in mental health, neurodegenerative and neurodevelopmental disorders. *Journal of food and drug analysis*. 2019; 27:632-648. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2019.01.002>
66. Dinan T, Stanton C, Cryan J. Psychobiotics: A Novel Class of Psychotropic. *Biol psychiatry*. 2013;74:720-726. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biopsych.2013.05.001>
67. Daniali M, Nikfar S, Abdollahi M. A brief overview on the use of probiotics to treat overweight and obese patients. *Expert Review of Endocrinology & Metabolism*. 2020; 15:1, 1-4. Doi: 10.1080/17446651.2020.1719068
68. Ghosh A, Ghosh S, Adhikari M, Saha T. Investigation of the antidiabetic and probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from some ethnic fermented foods of Darjeeling District. *Future Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2024; 10:59. Doi: <https://doi.org/10.1186/s43094-024-00630-4>
69. Aziz N, Bonavida B. Activation of Natural Killer Cells by Probiotics. *For Immunopathol Dis Therap*. 2016;7(1-2):41-55. Doi: 10.1615/ForumImmunDis Ther.2016017095
70. Gu Q, Li P. Biosynthesis of Vitamins by Probiotic Bacteria. *Probiotics and Prebiotics in Human Nutrition and Health*. In Tech; 2016. Doi: <http://dx.doi.org/10.5772/63117>
71. Forssten S, Sindelar C, Ouwehand A. Probiotics from an industrial perspective. *Anaerobe*. 2011; 17(6),410-413. Doi:10.1016/j.anaerobe.2011.04.014

72. Kumar v, Naik B, Kumar A, Khanduri N, Rustagi S, Kumar S. Probiotics media: significance, challenges and future perspective – a mini review. Food Production, Processing and Nutrition. 2022;4:17. Doi: <https://doi.org/10.1186/s43014-022-00098-w>
73. Gupta V, Garg R. Probiotics. Indian Journal of Medical Microbiology. 2009; 27(3):202-9. Doi: <https://doi.org/10.4103/0255-0857.53201>
74. Lawson P. The Phylum Actinobacteria. The Bifidobacteria and Related Organisms. 2018; 1-8. Doi:10.1016/b978-0-12-805060-6.00001-6
75. Mattarelli P, Biavati B. Species in the Genus Bifidobacterium. The Bifidobacteria and Related Organisms. 2018; 9-48. Doi: 10.1016/b978-0-12-805060-6.00002-8
76. Duncan B. Prebiotics, Probiotics, and Health Promotion: An Overview. Bioactive Food as Dietary Interventions for Liver and Gastrointestinal Disease. 2013;449-463. Doi: 10.1016/b978-0-12-397154-8.00005-1
77. Hoover Dg. Bifidobacterium. In: Encyclopedia of Food Microbiology. 2014;(1) 216-22. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00033-1>
78. Egan M, Van Sinderen D. Carbohydrate Metabolism in Bifidobacteria. The Bifidobacteria and related organisms Elsevier. 2018; 145-64. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-805060-6.00008-9>
79. Calidad de leche. MIDAGRI. Ministerio de desarrollo agrario y riego
80. Hani El-Abbadi N, Carlota Dao M, Nikbin Meydani S. Yogur: role in healthy and active aging. Am J Clin Nutr. 2014;99(5 suppl):1263S-70S. Doi: 10.3945/ajcn.113.073957
81. Chen J, Chen X, Loong Ho C. Recent Development of Probiotic Bifidobacteria for Treating Human Diseases. Front. Bioeng. Biotechnol. 2021; 9:770248. Doi: 10.3389/fbioe.2021.770248
82. Aryana K, Olson D. A100-Year Review: Yogur and other cultured dairy products. J Dairy Sci. 2017; 100(12):9987-10013. Doi: <https://doi.org/10.3168/jds.2017-12981>
83. Greenwald D, Brandt L. Gastrointestinal System: Function and Dysfunction. Encyclopedia of Gerontology. 2007;581-592. Doi: 10.1016/b0-12-370870-2/00076-7
84. Lucas González, R. Digestión de alimentos: Tendencias en los modelos de digestión in vitro. Revista Doctorado UMH 2(2): p5 (2016).
85. Dupont D, Mackie A. Static and dynamic in vitro digestion models to study protein stability in the gastrointestinal tract. Elsevier Ltd. All rights reserved. 2016; 1740-6757. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ddmod.2016.06.002>

86. Minekus M, Alminger M, Alvito P, Balance S, Bohn T, Bourlieu C, et al. A standardized static in vitro digestion method suitable for food- an international consensus. *Food Funct.* 2014;5,1113. Doi: 10.1039/c3fo60702
87. Zhu J, Chen Y, Imre K, Arslan-Acaroz D, Istanbulgil F, Fang Y et al. Mechanisms of probiotic *Bacillus* against enteric bacterial infections. 2023; 1:21. Doi: <https://doi.org/10.1186/s44280-023-00020-0>
88. Chr. Hansen. Drinking yogur guideline. Horsholm (Dinamarca): Chr. Hansen. Disponible en: <https://www.chr-hansen.com>
89. Bhat Z, Morton J, Bekhit A, Kumar S, Bhat H. Processing technologies for improved digestibility of milk proteins. Elsevier Ltd. All rights reserved. 2021, 0924-2244. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.09.017>
90. Tolosa S. Bullón J, Cárdenas A, Borregales C. Producción de yogur utilizando membranas cerámicas para incrementar el porcentaje de solidos en la leche. *Ciencia e Ingeniería.* 2006, 27(1)3-9.
91. Prasanna P.H.P, Grandison A.S, Charalampopoulos D. Bifidobacteria in milk products: An overview of physiological and biochemical properties, exopolysaccharide production, selection criteria of milk products and health benefits. *Food Research international.* 2014, 55; 247-262. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2013.11.013>
92. Lamoureux L, Roy D, Gauthier S.F. Production of oligosaccharides in yogur containing Bifidobacteria and yogur cultures. *J. Dairy Sci.* 2002, 85; 1058-1069.
93. Chr. Hansen A/S. FD-DVS ABY-3 Probio-Tec: Product information. Version 3 PI-EU-EN ;2011 Aug 12. Disponible : <https://www.chr-hansen.com>
94. M.R.S. Agar. Britania. Disponible en: https://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl_6092dd2543f1d.pdf
95. Karimi R, Mortazavian A, Amiri-Rigi A. Selective enumeration of probiotics microorganisms in cheese. *Food Microbiology.* 2012, 29; 1-9. Doi:10.1016/j.fm.2011.08.008
96. Anand S. Analytical Methods Microbiological. *Encyclopedia of Dairy Sciences.* 2011; 215-220. Doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374407-4.00021-2>
97. Maturin L, Peeler JT. Bacteriological Analytical Manual. Capítulo 3: Aerobic Plate Count. Silver Spring, MD: U.S. Food and Drug Administration. 2001. Disponible en: <https://www.fda.gov/media/178943/download?attachment>

98. Sfakianakis P, Tzia C. Conventional and Innovative Processing of milk for yogur manufacture; development of texture and flavor: A review. *Foods*. 2014;11,3(1):176-193. Doi: 10.3390/foods3010176
99. Rojas-Renjifo K, Urrego-Restrepo LB, Ramírez-Navas JS. Prebióticos, su efecto en pacientes con alteraciones gastrointestinales . *Salutem Scientia Spiritus* 2022; 8(3):99-111
100. Sibanda T, Marole TA, Thomashoff UL, Thantsha MS, Buys EM. Bifidobacterium species viability in diary-based probiotic foods: challenges and innovative approaches for accurate viability determination and monitoring of probiotic functionality. *Front Microbiol*. 2024;15:1327010. Doi: 10.3389/fmicb.2024.1327010
101. Quitral V, Sepúlveda M, Medina M, Arteaga P, Galarce C, Arancibia A, et al. Efecto protector de la inulina frente a condiciones gastrointestinales simuladas sobre bacterias probióticas. *Perspect Nutr Hum*. 2018;20(1):43-54. doi:10.17533/udea.penh.v20n1a07.
102. Schöpping M, Zeidan AA, Franzén CJ. Stress Response in Bifidobacteria. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2022;86:e00170-21. Doi: <https://doi.org/10.1128/mmbr.00170-21>
103. Matouskova P, Hoova J, Rysavka P, Marova I. Stress Effect of Food Matrices on Viability of Probiotic Cells during Model Digestion. *Microorganisms*. 2021;9,1625. Doi: <https://doi.org/10.3390/microorganisms9081625>
104. Begley M, Hill C, Gahan CGM. Bile salt hydrolase activity in probiotics is required for gastrointestinal resilience and cholesterol-lowering effects. *FEMS Microbiol Rev*. 2006;30(4):592–606. doi:10.1111/j.1574-6976.2005.00034.x
105. Treven, P.; Paveljšek, D.; Bogovič Matijašič, B.; Mohar Lorbeg, P. The Effect of Food Matrix Taken with Probiotics on the Survival of Commercial Probiotics in Simulation of Gastrointestinal Digestion. *Foods* 2024, 13, 3135. <https://doi.org/10.3390/foods13193135>
106. Ministerio de agricultura. Reglamento de la leche y productos lacteos: Resolucion Ministerial N°0142-2013-AG. Lima: Ministerio de Agricultura;2013.
107. You S, Ma Y, Yan B, Pei W, Wu Q, Ding C, Huang C. The promotion mechanism of prebiotics for probiotics: A review. *Front Nutr*. 2022; 9:1000517. Doi: 10.1159/000342079
108. Khare A, Thorat G, Bhimte A, Yadav V. Mechanism of action of prebiotics and probiotic. *Journal of Entomology and Zoology Studies*. 2018; 6(4):51-53.
109. Yildirim Z, Winters D, Johnson M. Purification, amino acid sequence and mode of action of bifidocin B produced by Bifidobacterium bifidum NCFB 1454. *Journal of Applied Microbiology*. 1999; 86(1),45-54. Doi: <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2672.1999.00629.x>

110. Tindjau R, Chua J, Liu S. Growth and metabolic behavior of probiotic *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* in minimally supplemented soy (tofu) whey. *Future Foods*. 2023; 8,100272. <https://doi.org/10.1016/j.fufo.2023.100272>
111. Schöpping, M., Gaspar, P., Neves, A. R., Franzén, C. J., & Zeidan, A. A. Identifying the essential nutritional requirements of the probiotic bacteria *Bifidobacterium animalis* and *Bifidobacterium longum* through genome-scale modeling. *Npj Systems Biology and Applications*. 2021;7(1),47. <https://doi.org/10.1038/s41540-021-00207-4>
112. Zikra N, Resmiati , Symond D, Azrimaidaliza, Azhar M. Development of goat milk yogurt with additional inulinas a functional food for stunting prevention in children. *Nutr Clín Diet Hosp*. 2025; 45(2):52-57. Doi: 10.12873/452resmiati
113. Kaewarsar E, Chaiyasut C, Lailerd N, Makhamrueang N, Peerajan S, Sirilun S. Optimization of Mixed Inulin, Fructooligosaccharides, and Galactooligosaccharides as Prebiotics for Stimulation of Probiotics Growth and Function. *Foods*. 2023 Apr 9;12(8):1591. doi: 10.3390/foods12081591. PMID: 37107386; PMCID: PMC10137966.
114. Meyer D, Yayarri S, Tárrega A, Costell E. Inulin as textura modifier in dairy products. *Food Hydrocolloids*. 2011, (25) 1881-1890. Doi: doi:10.1016/j.foodhyd.2011.04.012
115. Asaduzzaman M, Mahomud MS, Haque ME. Heat-Induced Interaction of Milk Proteins: Impact on Yoghurt Structure. *Int J Food Sci*. 2021 Sep 22;2021:5569917. doi: 10.1155/2021/5569917. PMID: 34604378; PMCID: PMC8483934
116. Brennan, C. S., & Tudorica, C. M. (2008). Carbohydrate-based fat replacers in the modification of the rheological, textural and sensory quality of yoghurt: comparative study of the utilisation of barley beta-glucan, guar gum and inulin. *International Journal of Food Science and Technology*, 43, 824e833
117. Rezaei R, Khomeiri M, Aalami M, Kashaninejad M. Effect of inulin on the physicochemical properties, flow behavior and probiotic survival of frozen yogurt. *J Food Sci Technol*. 2014 ;51(10):2809-14. Doi: 10.1007/s13197-012-0751-7.
118. Cruz AG, Antunes AEC, Sousa AOP, Faria JAF, Saad SMI. Ice-cream as a probiotic food carrier. *Food Res Int*. 2009;42:1233–1239. Doi: 10.1016/j.foodres.2009.03.020
119. Butterworth P, Warren F, Ellis P. Human α -amylase and starch digestion: An interesting marriage. *Starch/Stärke*. 2011,63,395-405. Doi: 10.1002/star.201000150
120. Heda R, Toro F, Tombazzi CR. Physiology, pepsin. In: *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2025.
121. Khosravi Zanjani M A, Ehsani M R, Ghiassi Tarzi B, Sharifan A. Promoting Probiotics Survival by Microencapsualtion with Hylon Starch and Genipin Cross-linked Coatings in

- Simulated Gastro-intestinal Condition and Heat Treatment. Iran J Pharm Res. 2018;17(2):e124827. <https://doi.org/10.22037/ijpr.2018.2199>.
122. Lee J, Jo J, Wan J, Seo H, Han S-W, Shin Y-J, et al. In vitro evaluation of probiotic properties and anti-pathogenic effects of Lactobacillus and Bifidobacterium strains as potential probiotics. Foods [Internet]. 2024;13(14):2301. Available from: <http://dx.doi.org/10.3390/foods13142301>
 123. Gultekin F, Oner ME, Savas HB, Dogan B. Food additives and microbiota. North Clin Istanb. 2019 Jul 17;7(2):192-200. doi: 10.14744/nci.2019.92499. PMID: 32259044; PMCID: PMC7117642.
 124. Ospanov A, Velyamov S, Tlevlessova D, Schetinina E, Kairbayeva A, Mazkeeva R, Tastanova R. Survival of lactic acid bacteria when using the developed yogurt from the milk of small cattle under in-vitro conditions. Food Sci. Technol. 2023, 43, e117722. Doi: <https://doi.org/10.1590/fst.117722>
 125. Hossain, M. I., Kim, K., Rahaman Mizan, M. F., Toushik, S. H., Ashrafudoulla, M., Roy, P. K., Nahar, S., Jahid, I. K., Choi, C., Park, S. H., & Ha, S.-D. Comprehensive molecular, probiotic, and quorum-sensing characterization of anti-listerial lactic acid bacteria, and application as bioprotective in a food (milk) model. Journal of Dairy Science. 2021, 104(6), 6516–6534. Doi: <https://doi.org/10.3168/jds.2020-19034>
 126. Santivarangkna C, Kulozik U, Foerst P. Inactivation mechanisms of lactic acid starter cultures preserved by drying processes. J Appl Microbiol. 2008;105(1):1–13. Doi: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.03744.x>
 127. Kurtmann L, Skibsted LH, Carlsen CU. Browning of freeze-dried probiotic bacteria cultures in relation to loss of viability during storage. J Agric Food Chem. 2009;57(15):6736–41. Doi: <http://dx.doi.org/10.1021/jf901044u>
 128. Arroyo-Moreno S, Saiz-Gonzalo G, McSweeney S, Bleiel SB. Probiotic viability reconsidered: Integrating VBNC resuscitation and culture-independent methods for accurate probiotic enumeration. Microorganisms. 2025;13(11):2479. Doi: <http://dx.doi.org/10.3390/microorganisms13112479>
 129. National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases. El aparato digestivo y su funcionamiento. Bethesda (MD): National Institutes of Health; 2018. Disponible en: <https://www.niddk.nih.gov/health-information/informacion-de-la-salud/enfermedades-digestivas/aparato-digestivo-funcionamiento>
 130. Chr. Hansen A/S. FD-DVS ABY-3 Probio-Tec®: Product information. Version 3. Hørsholm: Chr. Hansen A/S; 2011.

ANEXOS

ANEXO 1. Datos estadísticos de los tratamientos por fase

GRUPO		Media	Desv. Desviación	N
F. ORAL	Inulina 5%	7.59	0.62	5
	Inulina 6.5%	8.40	0.02	5
	Control	7.71	0.74	5
	YoG1	7.52	0.55	5
	YoG2	9.42	0.80	5
	Total	8.13	0.92	25
F. GASTRICA	Inulina 5%	7.00	0.80	5
	Inulina 6.5%	7.29	0.02	5
	Control	6.87	0.22	5
	YoG1	5.61	0.30	5
	YoG2	8.46	0.54	5
	Total	7.05	1.02	25
F. DUODENAL	Inulina 5%	6.58	0.68	5
	Inulina 6.5%	7.37	0.02	5
	Control	6.45	0.64	5
	YoG1	5.14	0.20	5
	YoG2	7.20	0.59	5
	Total	6.55	0.92	25
F. INTESTINAL	Inulina 5%	6.11	0.84	5
	Inulina 6.5%	6.23	0.01	5
	Control	6.11	0.58	5
	YoG1	5.02	0.43	5
	YoG2	7.03	0.62	5
	Total	6.10	0.83	25

ANEXO 2 Datos del calculo de ANOVA

Pruebas de efectos intra-sujetos

Origen		Tipo III de suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
factor1	Esfericidad asumida	57.055	3	19.018	104.942	0.000
	Greenhouse-Geisser	57.055	1.825	31.262	104.942	0.000
	Huynh-Feldt	57.055	2.400	23.769	104.942	0.000
	Límite inferior	57.055	1.000	57.055	104.942	0.000
factor1 * grupo	Esfericidad asumida	7.089	12	0.591	3.260	0.001

Error (factor1)	Greenhouse-Geisser	7.089	7.300	0.971	3.260	0.008
	Huynh-Feldt	7.089	9.602	0.738	3.260	0.003
	Límite inferior	7.089	4.000	1.772	3.260	0.033
	Esfericidad asumida	10.874	60	0.181		
	Greenhouse-Geisser	10.874	36.501	0.298		
	Huynh-Feldt	10.874	48.008	0.226		
	Límite inferior	10.874	20.000	0.544		

Pruebas de efectos inter-sujetos

Origen	Tipo III de suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Intersección	4838.480	1	4838.480	7853.467	0.000
grupo	52.321	4	13.080	21.231	0.000
Error	12.322	20	0.616		

Anexo 3 Datos descriptivos

	N	Media	Desv. Desviación	Desv. Error	95% del intervalo de confianza para la media		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
Inulina 6.5% Oral	5	8.40	0.02	0.00794	8.3739	8.4181	8.37	8.42
Inulina 6.5% Gástrica	5	7.29	0.02	0.00832	7.2649	7.3111	7.26	7.31
Inulina 6.5% Duodeno	5	7.37	0.02	0.00862	7.3501	7.3979	7.35	7.40
Inulina 6.5% Intestinal	5	6.23	0.01	0.00395	6.2168	6.2387	6.21	6.24
YoG2 Oral	5	9.42	0.80	0.35692	8.4336	10.4156	8.37	10.55
YoG2 Gástrica	5	8.46	0.54	0.24316	7.7873	9.1375	7.60	9.10
YoG2 Duodeno	5	7.20	0.59	0.26288	6.4721	7.9319	6.23	7.74

YoG2 Intestinal	5	7.03	0.62	0.27819	6.2594	7.8042	6.64	8.11
Total	40	7.68	1.04	0.16512	7.3418	8.0098	6.21	10.55

Anexo 4. ANOVA

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	35.866	7	5.124	24.601	0.000
Dentro de grupos	6.665	32	0.208		
Total	42.531	39			

Anexo 5. HSD Tukey

VAR	N	Subconjunto para alfa = .05			
		1	2	3	4
Inulina 6.5% Intestinal	5	6.2278			
YoG2 Intestin	5	7.0318	7.0318		
YoG2 Duodeno	5		7.2020		
Inulina 6.5% Gástrica	5		7.2880		
Inulina 6.5% Duodeno	5		7.3740		
Inulina 6.5% Oral	5			8.3960	
YoG2 Gástrica	5			8.4624	
YoG2 Oral	5				9.4246
Sig.		0.134	0.930	1.000	1.000
Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.					
a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 5.000.					

Anexo 6: Encuesta de valoración sensorial

“Evaluación sensorial de yogur con prebiótico inulina al 5%”

Instrucciones: Marque con una (x) la opción que mejor describa su respuesta.

1. Consumo de yogur

¿Consume usted yogur?

- ☐ Sí
- ☐ No

¿Con qué frecuencia consume yogur?

- ☐ 2 o 3 veces a la semana
- ☐ Una vez a la semana
- ☐ Cada 15 días
- ☐ Una vez al mes
- ☐ Muy ocasionalmente

2. Evaluación del producto

Favor de usar la escala de 1 al 5

	1	2	3	4	5
	Muy insatisfecho	Insatisfecho	Ni satisfecho ni insatisfecho	Satisfecho	Muy satisfecho
¿Te agrada la apariencia?					
¿Te agrada el sabor?					
¿Te agrada la acidez?					
¿Te agrada la cremosidad?					