

PULPA DE FRAMBUESA: VEHÍCULO PARA CEPAS DE MICROORGANISMOS PROBIÓTICOS

M. Luján¹; S. Coria¹; V. Kleinjan¹; M. Ochoa¹; A. De Michelis^{1,2}

¹Facultad Ciencias y Tecnología de los Alimentos, Universidad Nac. del Comahue. 25 de Mayo 113, Villa Regina, Río Negro, Argentina. Tel: 54-298-4463200.

²INTA AER El Bolsón- CONICET, Ap. 108 (8430) El Bolsón- Río Negro, FAX (0294-4492422)

Correo electrónico: maria.lujan@facta.uncoma.edu.ar

RESUMEN

Desde hace un tiempo se están utilizando frutas como vehículos de bacterias probióticas, por un lado, para ampliar la oferta de alimentos funcionales y, por otro lado, para satisfacer la demanda de consumidores que no consumen lácteos (vegetarianos, lactosa intolerantes, alérgicos a proteínas lácteas o por la percepción negativa del contenido de colesterol en leche). En Argentina se ha publicado muy poco sobre la factibilidad del empleo de frutas finas para vehiculizar microorganismos probióticos, lo que le sumaría importantes propiedades por sobre las que ya poseen naturalmente. El objetivo del presente trabajo fue determinar el potencial de una cepa probiótica de *Lactobacillus plantarum* para fermentar pulpa de frambuesa y la factibilidad de poder formular un alimento funcional con la misma.

Se utilizó pulpa de frambuesa, de frutas cosechadas en El Bolsón, Patagonia Argentina. Los estudios se realizaron con la cepa *L. plantarum* 998 control (C) y la cepa *L. plantarum* 998 preadaptada (P). Las experiencias de fermentación se realizaron en 100 g de pulpa estéril, inoculada al 2% con el cultivo de *L. plantarum* 998 C y 998 P, e incubadas a 37 °C por 24 horas. Se realizaron recuentos de células viables al tiempo 0 y 24 horas. Se evaluó la viabilidad de la cepa *L. plantarum* 998 C y 998 P a 4 °C durante tres semanas, realizando recuentos de células viables a los 7, 14 y 21 días. La simulación gastrointestinal *in vitro* se realizó a los tiempos 0, 24 horas y 7, 14 días. Los resultados obtenidos mostraron que las cepas no utilizaron la pulpa de frambuesa para su crecimiento, pero se mantuvieron a las 24 horas de fermentación en órdenes superiores a 6 log UFC/ml. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los resultados entre la cepa *L. plantarum* 998 Control y la Preadaptada. En el almacenamiento a 4 °C, las cepas se mantuvieron en valores superiores a 6 UFC/ml hasta los 7 días, luego los valores disminuyeron significativamente. Los valores obtenidos al finalizar la simulación gastrointestinal *in vitro* luego de los 7 días de almacenamiento a 4 °C, fueron relativamente bajos. Es necesario realizar estudios *in vivo* en animales, para obtener la evidencia final que indique si *L. plantarum* 998 en pulpa de frambuesa fermentada y almacenada en frío durante 7 días, puede colonizar el intestino.

Palabras Clave: Alimentos Funcionales, Frutas, Bacterias Probióticas, Fermentación.

ABSTRACT

In recent years, many studies have explored the usage of fruits as a vehicle for probiotic bacteria. Firstly, as a way to find new functional foods. Secondly, in order to cope with the needs of non-dairy consumers (e.g. vegetarians, lactose intolerants, people with allergy to cow's milk, or those consumers who deem milk as a source of cholesterol). In Argentina, there are too few studies addressing the possibility of using small fruits to transmit probiotic microorganisms and the resulting improvement of its nutritional properties. In the current study, we evaluate the potential as ferment for raspberry pulp of a probiotic strain of *Lactobacillus plantarum*, and the feasibility of formulating a functional food from it. The results reported herein were obtained from experiments performed on the pulp of raspberries harvested in El Bolsón (Patagonia Argentina). The strains under study were *L. plantarum* 998 as a control (C) and preadapted *L. plantarum* 998 (P). Fermentations were carried out on sterilized pulp (100 g) inoculated with *L. plantarum* 998 C and 998 P cultivars (2%) and kept at 37 °C for 24 h. Viable cell counts were performed at 0 and 24 h. Viability of *L. plantarum* 998 C and P was evaluated at 4°C during 3 weeks, with viable cell counts performed at 7, 14 and 21 days. Gastrointestinal simulations were run at 0, 1, 7 and 14 days. The results show that the strains did not use the raspberry pulp on its growing, but they stood over 6 log UFC/ml after 24 h fermentation. *L. plantarum* 998 C and 998 P did not present significant differences. The strains kept values over 6 log UFC/ml for 7 days under storage at 4 °C, and decreased significantly after that. At the end of the 7 day and 4 °C *in vitro* gastrointestinal simulation, values were relatively low. In order to determine if *L. plantarum* 998 can colonize the gastrointestinal tract using raspberry pulp fermented under 7 days cooling, further *in vivo* studies are required.

Keywords: Functional Foods, Fruits, Probiotic Bacteria, Fermentation.

INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas se ha producido un cambio sustancial en la actitud frente a la alimentación. Los consumidores son conscientes de la influencia de la dieta en la modulación del riesgo de desarrollo de enfermedades y de la relación entre dieta y calidad de vida (1). Los alimentos funcionales son consumidos como parte de la dieta. Además de la función nutritiva básica, se ha demostrado que presentan propiedades fisiológicas o que disminuyen el riesgo de contraer ciertas enfermedades. De forma general, se puede decir que un alimento funcional es aquel que confiere al consumidor una determinada propiedad beneficiosa para la salud, independientemente de sus propiedades nutritivas. Son alimentos convencionales, que poseen naturalmente componentes bioactivos, o a los que se les ha añadido o eliminado un determinado componente. Deben presentarse como un alimento propiamente dicho y sus efectos deben observarse cuando el alimento se consume dentro de una dieta equilibrada diaria, es decir, dentro del modelo alimentario habitual (2).

Las frambuesas (*Rubus idaeus*) pertenecen al grupo de las frutas pequeñas (berries), son frutos de reducido tamaño, con coloración que va del rojo oscuro al amarillo, sabor agrídulce y rápida perecibilidad. Son ricos en vitaminas C y E, carbohidratos, fibras y azúcares, siendo la Patagonia Argentina una de las zonas de producción más importante del país en este tipo de cultivos. Las formas de consumo más difundidas son en fresco, mermeladas o conservas. Estas frutas poseen naturalmente actividad antioxidante, lo que les confiere importantes beneficios sobre la salud, pudiendo considerarse como alimento funcional en sí mismo o por el agregado de otras propiedades para ampliar su posible funcionalidad.

Dentro de esta línea, los alimentos probióticos se definen como un suplemento alimentario con contenido microbiano vivo que beneficia al huésped mejorando su equilibrio intestinal. Adicionar microorganismos probióticos a alimentos proporciona beneficios a la salud, incluyendo la reducción del nivel de colesterol en suero sanguíneo, mejora de la función gastrointestinal, el sistema inmune y reducción del riesgo de contraer cáncer de colon (3).

Ya se han utilizado jugos de fruta como vehículos de bacterias probióticas (4, 5), por un lado para ampliar la oferta de alimentos funcionales y por otro lado para satisfacer la demanda de consumidores que no consumen lácteos (vegetarianos, lactosa intolerantes, alérgicos a proteínas lácteas o por la percepción negativa del contenido de colesterol en leche).

Ningún organismo “elabora” bacterias, es decir no las genera, su incorporación es siempre externa y sólo permanecen temporalmente en el intestino, por ello se recomienda una ingesta continua de los mismos (6). Existen tres estrategias alimentarias que promueven el mantenimiento de un equilibrio más saludable de la microflora intestinal, consistentes en la alteración beneficiosa de su composición, mediante el incremento de las cantidades de bifidobacterias, de lactobacilos o de ambos.

Dentro del género *Lactobacillus*, *Lactobacillus plantarum* forma parte del grupo facultativo y heterofermentativo de los lactobacilos. Es una especie heterogénea y versátil que puede encontrarse en una gran variedad de ambientes incluyendo, lácteos, carne, pescado, y en muchas fermentaciones vegetales. Además, algunas cepas de *L. plantarum* han demostrado la capacidad de sobrevivir al sistema digestivo y colonizar parcialmente el tracto gastrointestinal de humanos y otros mamíferos. Se han descubierto varias propiedades terapéuticas asociadas a *L. plantarum*, tales como la disminución de la incidencia de diarrea en los centros de cuidado de niños, reducción en el dolor y la constipación asociada con el síndrome del colon irritable, disminución en la hinchazón, flatulencia, habilidad de desplazar enteropatógenos, y capacidad de ejercer un efecto positivo en el sistema inmune de niños VIH+ (7).

La simulación gastrointestinal *in vitro* es necesaria para comprobar la viabilidad y resistencia de los microorganismos probióticos a las condiciones menos favorables del tracto gastrointestinal; por ejemplo, en el estómago el pH es la peor condición y en el duodeno son las sales biliares (8). Este ensayo permite obtener una aproximación de lo que sucederá en la situación *in vivo*, sin embargo, debido a las complejas interacciones que ocurren en el estómago e intestino, los resultados obtenidos de estudios *in vitro* pueden diferir de los obtenidos *in vivo*, esto fundamentalmente depende del organismo de cada consumidor.

Para poder evaluar la viabilidad y resistencia de microorganismos probióticos, se han propuesto modelos que simulan las condiciones del tracto gastrointestinal, los cuales se clasifican en modelo convencional y modelos dinámicos. Estos últimos, se diferencian del primero por ser continuos (9).

El objetivo de este trabajo fue determinar la capacidad de la pulpa de frambuesa para ser fermentada y/o constituirse en vehículo para cepas probióticas de *Lactobacillus plantarum*, con el propósito de diseñar posibles alimentos funcionales, para lo cual se planteó:

- Estudiar la viabilidad de *L. plantarum* 998 durante la fermentación en pulpa de frambuesa.
- Estudiar la viabilidad de *L. plantarum* 998 en la pulpa de frambuesa durante el almacenamiento refrigerada a 4 °C durante 3 semanas.
- Estudiar *in vitro*, mediante ensayos de simulación gastrointestinal, la viabilidad de *L. plantarum* 998 en pulpa de frambuesa.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materia Prima

Se utilizó pulpa de frambuesa var. Tulameen de frutas cosechadas en El Bolsón, Patagonia Argentina. Para obtener la pulpa, las frambuesas congeladas a una temperatura de -20 °C, se sometieron a la acción de un homogeneizador tipo mixer. A continuación, se colocó 100 gramos de la misma en frascos de vidrio de 200 ml. Estos se esterilizaron a 121 °C durante 15 minutos.

Cepas

Se utilizó una cepa probiótica de *Lactobacillus plantarum* INLAIN 998, cedida por el equipo profesional del Instituto de Lactología Industrial (INLAIN), Universidad Nacional del Litoral, CONICET, Santa Fé, República Argentina. Las mismas tienen propiedades probióticas (aumento de defensas intestinales) demostradas en animales en estudios previos (7). Para conservarlas, se colocaron en una solución de glicerol al 20% y se almacenaron a -20 °C.

Reactivación de las cepas

Control (C): Para reactivar las cepas conservadas, se colocó 100 µL de la suspensión de glicerol en 5 ml de caldo MRS (Man, Rogosa y Sharpe). Se incubó por 72 horas a 37 °C y se continuó con repiques Over Night (ON) inoculando 100 µl de la suspensión del microorganismo en 5 ml de MRS nuevo durante 48 horas a 37°C. Luego, se lavó la cepa con buffer fosfato salino de pH 7 (PBS) (10). A esta cepa se la denominó *Lactobacillus plantarum* 998 C.

Preadaptada (P): Se realizó una preadaptación de la cepa *L. plantarum* 998 en la matriz a estudiar de la siguiente forma: se colocó 100 µL de la suspensión de glicerol en 5 ml de caldo MRS. Se incubó por 72 horas a 37 °C. Luego se continuó con repique ON, inoculando 100 µl de la suspensión del microorganismo en una solución de 5 ml de caldo MRS con 25% de pulpa de frambuesa durante 24 horas a 37 °C. Luego de este período, se inoculó 100 µl de la suspensión anterior en 5 ml de caldo MRS con 50% de pulpa de frambuesa durante 24 horas a 37°C. Al igual que la cepa control, luego se le hizo un lavado con PBS (10). A esta cepa se la denominó *Lactobacillus plantarum* 998 P.

Fermentación de la pulpa de frambuesa

Las experiencias de fermentación se realizaron con las cepas control (C) y preadaptada (P) por triplicado, con 100 g de pulpa estéril de frambuesa. Las pulpas fueron inoculadas al 2% con los cultivos de *L. plantarum* 998 C y 998 P, e incubadas a 37 °C en estufa de cultivo durante 24 horas. Se tomaron muestras de cada pulpa a tiempo: 0 (momento de inoculación) y 24 horas y se hizo el recuento de las unidades formadoras de colonia de células viables (UFC) a través del método estándar de recuento en placa con medio MRS, después de 48 horas de incubación a 37°C. Además, se realizó simulación gastrointestinal *in vitro* según se describe en el punto 5.

Almacenamiento a 4 °C de la pulpa de frambuesa fermentada

Las pulpas de frambuesa fermentadas con cepas de *L. plantarum* 998 C y 998 P, fueron almacenadas a temperaturas de refrigeración (4 °C) durante tres semanas. Se tomaron muestras a los 7, 14 y 21 días de almacenamiento en frío y se determinó el número de microorganismos viables mediante recuento en placa (según se detalló en el punto 3) y se realizó simulación gastrointestinal *in vitro* según se describe en el punto 5, estos ensayos se realizaron por triplicado.

Simulación gastrointestinal *in vitro* de la pulpa de frambuesa fermentada

La simulación gastrointestinal *in vitro* se realizó en cada pulpa fermentada, frambuesa con *L. plantarum* 998 C y frambuesa con *L. plantarum* 998 P, a tiempo 0, 24 horas de fermentación y 7 y 14 días de almacenamiento en frío, por triplicado. Para la determinación *in vitro* de la resistencia de las cepas de *L. plantarum* 998 C y 998 P, se procedió según Reinheimer (10), realizando una simulación del tipo convencional. Se tomó 10 g de pulpa inoculada al 2% con la cepa y se agregó 10 ml de una solución de saliva con 0,6% de pepsina (punto A, recuento de viables). Luego, se acidificó a pH 2,5 con HCl se incubó la muestra durante 90 minutos en baño de agua termostático a 37 °C (punto B, recuento de viables). A continuación, se tomó 1,4 ml en eppendorf, se centrifugó a 5000 rpm por 5 minutos, se descartó el sobrenadante y se lavó dos veces con PBS. Luego se realizó el shock duodenal de bilis (se resuspendió en 1,4 ml de una solución de bilis bobina al 1% en PBS) y se incubó en baño de agua termostático a 37 °C por 10 minutos (punto C, recuento de viables). Se centrifugó a 5000 rpm por 5 minutos, se descartó sobrenadante y se lavó dos veces con PBS. A continuación, se resuspendió en 1,4 ml de la solución de jugo intestinal (bilis al 0,3% más 0,1% pancreatina en PBS). Se incubó durante 90 minutos a 37 °C (punto D, recuento de viables).

Análisis químicos

Durante la experiencia, se midió el pH potenciométricamente a las pulpas de frambuesa con *L. plantarum* 998 C y *L. plantarum* 998 P, a los tiempos: 0, 24 horas, 7 y 14 días.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para realizar el análisis de los datos obtenidos, se utilizó el programa estadístico InfoStat® versión 2015. Los resultados fueron expresados como la Media de las tres réplicas realizadas \pm Desvío Estándar (DE). Se realizó un análisis ANAVA y las diferencias significativas entre grupos fueron determinadas por un Test de Tukey. Estos estudios se realizaron con una significancia del 99%.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Fermentación de la pulpa de frambuesa

En la tabla 1 y figura 1, se muestra el avance de la fermentación de las pulpas de frambuesa con las cepas *L. plantarum* 998 C y 998 P. En los resultados obtenidos, se observó que, a las 24 horas de fermentación, los recuentos de células viables de las cepas *L. plantarum* 998 C y 998 P disminuyeron desde el momento de la inoculación en la matriz (tiempo 0), además el pH no se modificó en el transcurso de la misma, demostrando que no utilizaron la pulpa para su crecimiento. Si bien estas cepas son ácido tolerantes, la disminución de los recuentos se pudo deber al bajo pH de la matriz estudiada. Se comunicó la fuerte influencia del pH sobre la supervivencia celular en varios productos alimenticios (11). Sin embargo, se encuentran en concentraciones superiores a 1×10^6 UFC/ml, concentraciones mínimas que son requeridas para que los microorganismos probióticos sobrevivan a las condiciones adversas del tracto gastrointestinal y alcancen el colon en número suficiente. Estudios *in vivo* e *in vitro* (12, 13) indicaron que algunas cepas de *Lactobacillus* sólo sobreviven parcialmente al pasaje a través del tracto gastrointestinal y, generalmente, debería estar presente una población de bacterias de 10^7 - 10^9 UFC/ml en los alimentos para colonizar, al menos temporalmente, el intestino (14).

El análisis de varianza mostró que los resultados sólo se vieron afectados por el factor tiempo, es decir que no influyó el tipo de cepa utilizada. El test de Tukey mostró que no hubo diferencias significativas entre los tiempos 0 y 24 horas, para ambas cepas.

En base a los resultados obtenidos, se observó que la preadaptación de la cepa *L. plantarum* 998 en la matriz no logró mejorar la tendencia observada en la fermentación.

Tabla 1. Avance de fermentación (log UFC/ml) de pulpas de frambuesa con las cepas de *L. plantarum* 998 C y 998P

Tiempo (horas)	pH	<i>L. plantarum</i> 998 C	pH	<i>L. plantarum</i> 998 P
0	3,00±0,08	7,20±0,37 ^a	3,03±0,05	7,30±0,11 ^a
24	3,00±0,00	6,66±0,31 ^a	2,98±0,02	6,86±0,31 ^a

Para cada determinación los valores medios (±DE) que poseen superíndices comunes, no difieren significativamente (P>0,01)

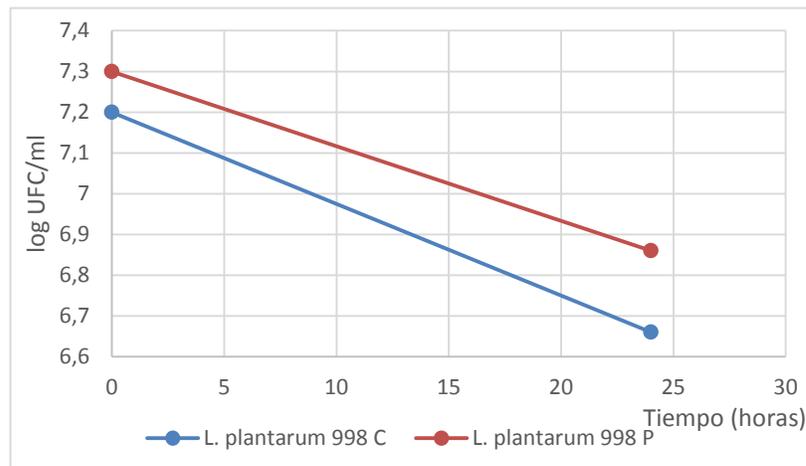


Figura 1: Avance de fermentación (log UFC/ml) en pulpas de frambuesa con las cepas de *L. plantarum* 998 C y 998P

Almacenamiento en frío de la pulpa de frambuesa fermentada

Los microorganismos probióticos son capaces de desarrollar una respuesta al estrés producido por el contacto con medios ácidos. Esta respuesta protege a los microorganismos de las fuertes condiciones de acidez (15 y 16) y depende fuertemente de la cepa probiótica de interés (17 y 18). Además, un estudio realizado por Champagne y Gardner (19), demostró que *L. plantarum* se mantiene en altos valores (10^7 UFC/ml) durante el almacenamiento en frío (4°C), en un jugo de fruta sin fermentar de pH 4,2, por 80 días. En la tabla 2 se muestran los resultados obtenidos del seguimiento del almacenamiento en frío de las pulpas de frambuesa fermentadas y los valores de pH obtenidos. El análisis de varianza mostró que sólo el factor tiempo influyó en los resultados, es decir que estos son independientes del tipo de cepa utilizada. Se observó que, a los 7 días no se produjo una disminución significativa de los recuentos de *L. plantarum* 998 C y 998 P respecto a los valores iniciales; los recuentos en este punto se mantuvieron en el orden de 1×10^6 UFC/ml (6 log UFC/ml). A los 14 días, los recuentos de *L. plantarum* 998 C y *L. plantarum* 998 P no disminuyeron significativamente con respecto a los 7 días de almacenamiento en frío. A los 21 días, los recuentos disminuyeron significativamente, quedando en el orden de 3 log UFC/ml (figura 2). Los resultados de tolerancia al almacenamiento en frío obtenidos en el presente estudio, difieren notablemente de los resultados expuestos por Champagne y Gardner (19). Esto probablemente se debió al estrés sufrido por la cepa durante la fermentación de la pulpa de frambuesa (24 horas, pH 3, 37°C), previo al tratamiento en frío. Por otro lado, el pH de la pulpa no varió durante 14 días de almacenamiento, observándose el mismo comportamiento en el estudio realizado por Champagne y Gardner (19).

Tabla 2: Efecto del almacenamiento a 4 °C (log UFC/ml) en pulpas de frambuesa con las cepas de *L. plantarum* 998 C y 998P

Cepas	pH Rec. Inic.	Recuento inicial	pH 7 días	7 días	pH 14 días	14 días	21 días
<i>L.plantarum</i> 998 C	3,00±0,00	6,66±0,31 ^a	3,00±0,00	6,13±0,29 ^{a,b}	3,00±0,00	5,05±0,42 ^b	3,51±0,64 ^c
<i>L.plantarum</i> 998 P	2,98±0,02	6,86±0,31 ^a	2,98±0,02	6,33±0,58 ^{a,b}	2,98±0,02	5,37±0,75 ^b	3,84±0,50 ^c

Para cada determinación los valores medios (±DE) que poseen superíndices comunes, no difieren significativamente (P>0,01)

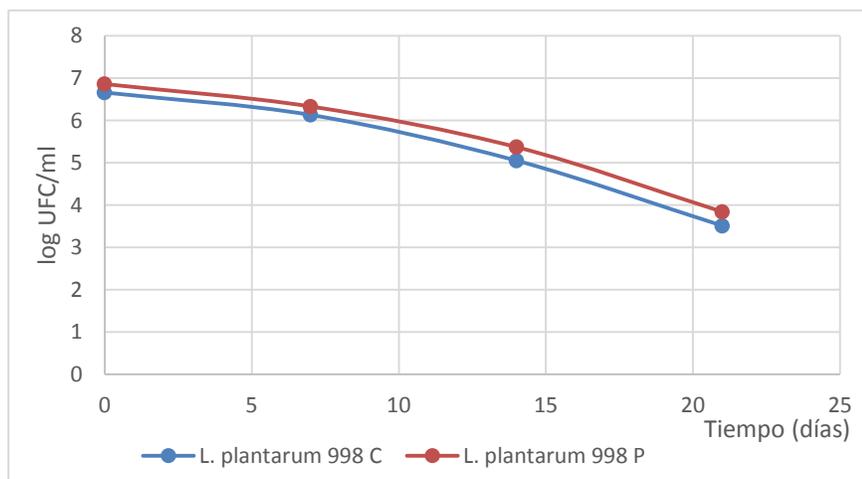


Figura 2: Efecto del almacenamiento a 4°C (log UFC/ml) en pulpas de frambuesa con las cepas de *L. plantarum* 998 C y 998P.

Simulación gastrointestinal in vitro de la pulpa de frambuesa fermentada

En la tabla 3 y la figura 3 se muestran los resultados obtenidos en la simulación gastrointestinal *in vitro*. Tanto para *L. plantarum* 998 C como 998 P, se observó la misma tendencia en los diferentes momentos de la simulación (puntos A, B, C y D). Luego de la acidificación, se produjo una reducción significativa en el número de células viables. Por otro lado, se observó que luego del tratamiento con shock duodenal y jugo intestinal, no se produjo un descenso significativo en los recuentos, esto concordó con los resultados obtenidos por Champagne y Gardner (19), quienes evaluaron la estabilidad de una cepa de *L. plantarum* a pH 2, el efecto de enzimas pancreáticas y el tratamiento con bilis al 0,3%, en una bebida de frutas.

El análisis de varianza mostró que sólo la interacción entre el tipo de cepa y el tiempo posee significancia, es decir que los resultados obtenidos no dependen del momento de la simulación gástrica (A, B, C, D) y, por ende, son válidos para todas las combinaciones tiempo-cepa. Es decir, la tendencia de la disminución de los recuentos durante la simulación gástrica fue la misma para la cepa *L. plantarum* 998 C al tiempo 24 horas que para la cepa *L. plantarum* 998 P a los 7 días de almacenamiento en frío.

Tabla 3: Ensayo de resistencia gastrointestinal simulada (log UFC/ml) de pulpa de frambuesa fermentada con cepa de *L. plantarum* 998 C y 998 P

Tiempo	A (post saliva+ pepsina)		B (post acidificación)		C (post shock duodenal)		D (post jugo intestinal)	
	998 P	998 C	998 P	998 C	998 P	998 C	998P	998 C
0 horas (ferm.)	6,93±0,06 a,1	6,79±0,32 a,1,2	6,32±0,26 b,1	5,56±0,39 b,1,2	6,32±0,20 ^{b,1}	5,44±0,46 b,1,2	6,30±0,21 ^{b,1}	5,34±0,53 b,1,2
24 horas (ferm.)	6,43±0,33 c,3,4	6,23±0,28 c,2,3	4,43±0,16 d,3,4	5,09±0,61 d,2,3	4,24±0,18 d,3,4	5,07±0,68 d,2,3	4,11±0,30 d,3,4	4,88±0,61 d,2,3
7 días (frío)	5,80±0,73 e,4	5,83±0,22 e,3,4	3,88±0,32 f,4	4,15±0,40 f,3,4	3,58±0,46 f,3,4	4,03±0,36 f,3,4	3,38±0,60 f,3,4	3,72±0,33 f,3,4
14 días (frío)	4,98±0,70 g,5	4,56±0,52 g,5	2,88±0,76 h,5	3,07±0,62 h,5	2,33±0,73 ^{h,5}	2,70±0,57 h,5	1,91±0,66 ^{h,5}	2,44±0,60 h,5

Los superíndices indicados con letras corresponden a la comparación entre momentos (A, B, C, D) y los números corresponden a la comparación de los tiempos (0, 24 horas, 7 y 14 días). Para cada determinación los valores medios (±DE) que poseen superíndices comunes, no difieren significativamente (P>0,01).

Por otro lado, luego de los 7 días de almacenamiento en frío, los recuentos de células viables obtenidos posteriores a la simulación gastrointestinal (punto D) de *L. plantarum* 998 C y 998 P, disminuyeron significativamente; lo cual indica que no es factible extender el almacenamiento en frío, ya que los probióticos deben llegar al intestino grueso en concentraciones lo más elevadas posible, para instalarse y realizar su función probiótica.

Los resultados obtenidos luego de realizar la simulación gastrointestinal al tiempo cero, fueron similares a los de Champagne y Gardner (19), quienes partieron con recuentos de células viables de *Lactobacillus plantarum* del orden de 7 log UFC/ml en una bebida de frutas de pH 4,2 y luego de la simulación gástrica *in vitro* obtuvieron recuentos del orden de 4 log UFC/ml. En el trabajo citado, también se realizó la simulación gástrica *in vitro*, en la misma matriz, a los 35 días de almacenamiento en frío; partiendo de recuentos de células viables del orden de 7 log UFC/ml, luego del tratamiento obtuvieron recuentos próximos a 3 log UFC/ml. Estos resultados son superiores a los obtenidos en el presente estudio, ya que en la simulación gástrica a los 14 días de almacenamiento en frío, se obtuvieron valores próximos a 2 log UFC/ml.

Si bien los valores obtenidos fueron relativamente bajos, el estudio *in vitro* es sólo exploratorio, requiriéndose un estudio *in vivo* en animales en el cual se podrá medir la estimulación inmunológica real otorgada por el probiótico.

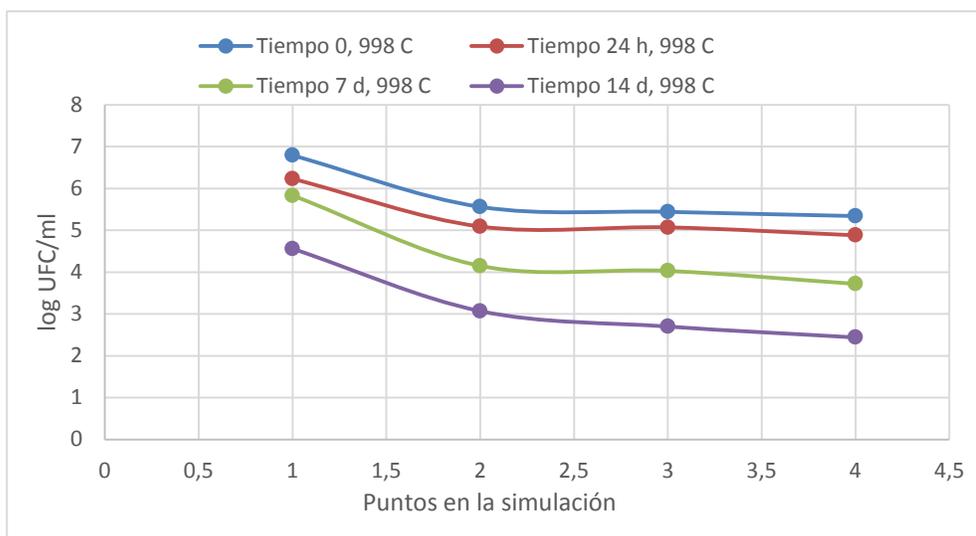


Figura 3: Ensayo de resistencia gastrointestinal simulada (log UFC/ml) de pulpa de frambuesa fermentada con cepa de *L. plantarum* 998 C

CONCLUSIONES

- *L. plantarum* 998 se mantuvo a las 24 horas de fermentación en valores superiores a 6 log UFC/ml, valor mínimo requerido para un alimento probiótico, aunque no logró fermentar la pulpa de frambuesa, ya que no la utilizó para su crecimiento.
- No hubo diferencias significativas en todos los ensayos realizados con la cepa control y preadaptada, por lo cual no sería necesario preadaptar la cepa de *L. plantarum* 998 en pulpa de frambuesa.
- En el estudio de almacenamiento en frío de la pulpa de frambuesa, la cepa *L. plantarum* 998 se mantuvo en valores superiores a 6 log UFC/ml durante 7 días. Luego de este período, los recuentos disminuyeron significativamente, con valores del orden de 3 log UFC/ml a los 21 días de almacenamiento en frío.
- En el estudio de resistencia gastrointestinal *in vitro*, el número de células viables de la cepa *L. plantarum* 998 Control al finalizar el ensayo (punto D) en pulpa de frambuesa a los 7 días de almacenamiento en frío, fue de 3,72 log UFC/ml. Este valor es relativamente bajo. Sin embargo, es necesario realizar estudios *in vivo* en animales, y de esta forma se obtendrá la evidencia final que indique si *L. plantarum* 998 en pulpa de frambuesa fermentada y almacenada en frío durante 7 días, puede colonizar el intestino y así ejercer una función benéfica en el consumidor.
- En base a los resultados obtenidos, se sugiere estudiar la viabilidad de *Lactobacillus plantarum* 998 en pulpa de frambuesa, utilizando una concentración inicial del microorganismo superior a la aplicada en el presente estudio. Al mismo tiempo, se recomienda hacer el estudio con la incorporación de la cepa utilizando la matriz como vehículo, sin que interactúe con la misma y realizar el seguimiento del almacenamiento en frío (4 °C).

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Universidad Nacional del Comahue y al PNAIyAV1130043 (INTA) por el financiamiento de este trabajo y al Instituto de Lactología Industrial (INLAIN) de la Universidad Nacional del Litoral por la cepa utilizada.

REFERENCIAS

1. Barrio Merino A. (2006). Probióticos, prebióticos y simbióticos. Definición, funciones y aplicación clínica en pediatría. Revista Pediatría Atención Primaria. Publicación Oficial de la Asociación Española de Pediatría de Atención Primaria.
2. Aranceta J.; Gil A. (2010). Alimentos funcionales y salud en las etapas infantil y juvenil. Editorial Médica PANAMERICANA.
3. Yoon K.Y.; Woodams E.E., Hang Y.D. (2007). Jugo de tomate probiótico con bacterias ácido lácticas. Revista Mundo Alimentario. 7-11.
4. Nualkaekul, S.; Charalampopoulos, D. (2011). Survival of *Lactobacillus plantarum* in model solutions and fruit juices. International Journal of Food Microbiology, 146, 111-117.
5. Yoon K.Y.; Woodams E.E.; Hang Y.D. (2005). Fermentation of beet juice by beneficial lactic acid bacteria. Lebensm.-Wiss.u.-Technol. 38, 73-75.
6. Reinheimer, J. (2014). Alimentos Funcionales. Buenos Aires.
7. Zago, M.; Fornasari, M. E.; Carminati, D.; Burns, P.; Suárez, V.; Vinderola, Giraffa, G. (2011). Characterization and probiotic potential of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from cheeses. Food Microbiology, 28, 1033-1040.
8. Serna Jiménez, J.A. (2012). Elaboración de Jugos de Fruta con Adición de Bacterias Ácido Lácticas con Potencial Probiótico. Universidad de La Sabana, Chía.
9. Juárez-Roldán, A.R.; Jiménez-Munguía, M.T. (2013). Condiciones Gastrointestinales modelo utilizadas para evaluar probióticos encapsulados. Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos, 7(2), 15-24.
10. Reinheimer, J. (2011). Pasantía en el Instituto de Lactología Industrial. Universidad Nacional del Litoral. Santa Fé, Argentina.
11. Champagne, C.; Gardner, N. (2005). Challenges in the addition of probiotic cultures to foods. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 45, 61-84.
12. Reid, G. (2008). Probiotics and Prebiotics - Progress and Challenges. International Dairy Journal, 969-975.
13. Charteris, W.; Kelly, P.; Morelli, L.; Collins, J. (1998). Development and application of an in vitro methodology to determine the transit tolerance of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in the upper human gastrointestinal tract. Journal of Applied Microbiology, 759-768.
14. Lee, Y.; Salmien, S. (1995). The coming of age of probiotics. Trends in Food Science and Technology, 241-245.
15. Lorca, G.; Font de Valdez, G. (2001). A Low-pH-Inducible, Stationary-Phase Acid Tolerance Response in *Lactobacillus acidophilus* CRL 639. Current Microbiology, 42, 21-25.
16. Hartke, A.; Bouche, S.; Giard, J.; Benachour, A.; Boutibonnes, P.; Auffray, Y. (1996). The Lactic Acid Stress Response of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. Current Microbiology, 33(3), 194-199.
17. Van de Guchte, M.; Serror, P.; Chervaux, C.; Smokvina, T.; Ehrlich, S.D.; Maguin, E. (2002). Stress responses in lactic acid bacteria. Antonie van Leeuwenhoek, 82(1), 187-216.
18. Takahashi, N.; Xiao, J.-Z.; Miyaji, K.; Yaeshiima, T.; Hiramatsu, A.; Iwatsuki, K.K.; Hosono, A. (2004). Selection of acid tolerant *Bifidobacterium* and evidence for low-pH-inducible acid tolerance response in *Bifidobacterium longum*. Journal of Dairy Research, 71(03), 340-345.
19. Champagne, C.P.; Gardner, N.J. (2008). Effect of storage in a fruit drink on subsequent survival of probiotic lactobacilli to gastro-intestinal stresses. Food Research International, 41, 539-543