

**UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR  
FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA**



**INCORPORACION DE UNA MEZCLA PROBIOTICA EN EL PROCESO DE  
ELABORACION DE HELADO A ESCALA DE LABORATORIO**

**TRABAJO DE GRADUACION PRESENTADO POR:**

**ELIAS ALBERTO ZECEÑA LANDAVERDE**

**PARA OPTAR AL GRADO DE:**

**LICENCIADO EN QUIMICA Y FARMACIA**

**OCTUBRE 2018**

**SAN SALVADOR, EL SALVADOR, CENTRO AMERICA.**

**UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR**

**RECTOR**

MSc. ROGER ARMANDO ARIAS ALVARADO

**SECRETARIO GENERAL**

LIC. CRISTOBAL HERNÁN RÍOS BENÍTEZ

**FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA**

**DECANO**

LIC. SALVADOR CASTILLO AREVALO

**SECRETARIO**

MAE. ROBERTO EDUARDO GARCIA ERAZO

## **DIRECCION DE PROCESO DE GRADUACION**

### **DIRECTORA GENERAL**

MSc. Cecilia Haydee Gallardo de Velásquez

### **TRIBUNAL CALIFICADOR**

### **ASESORAS DE AREA EN: CONTROL DE CALIDAD DE PRODUCTOS FARMACEUTICOS Y COSMETICOS.**

Licda. Zenia Ivonne Arévalo de Márquez

MSc. Rocío Ruano de Sandoval

### **DOCENTES ASESORES.**

MSc. Cecilia Haydee Gallardo de Velásquez

MSc. Coralia de los Ángeles González de Díaz

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios todopoderoso, por nunca abandonarme, por darme las fuerzas necesarias que me permitieron llegar hasta aquí, por darme la fortaleza y esperanza en los momentos donde creí que caería; por ser el centro de mi vida y por su eterna misericordia. A la intercesión de mi Madre Santísima y San Oscar Arnulfo Romero, siempre me han escuchado y a través de la oración me han ayudado a tomar las mejores decisiones en la vida, y en esos momentos difíciles por razones económicas, problemas personales y otras dificultades durante el transcurso de años de estudio, han intercedido por mí delante de Dios para que pueda discernir y siempre hacer lo correcto.

A mis padres, mi mayor motivación. Gracias por los esfuerzos constantes, la confianza, el apoyo moral y sobre todo por enseñarme que los sueños se pueden hacer realidad si uno así lo desea. Nunca tendré las palabras suficientes para agradecer por tanto.

A mis hermanas Elida Zeceña y Elvira Zeceña por darme tanto apoyo moral y económico, por ser parte de mi triunfo y siempre estar pendiente de mi trayectoria en el desarrollo profesional. A mis demás hermanos y hermana, aunque no me lo hagan saber, siempre han deseado lo mejor para mí, forman gran parte de mi felicidad, los amo a todos y todas, y doy gracias a Dios por darme la hermosa familia que tengo.

A mi amiga, mi hermana, mi compañera de carrera, y muchas aventuras, Elida Alejandra Murillo Durán. Gracias por su disponibilidad, paciencia y cariño. Por ayudarme a ser posible este gran logro y ser parte de él.

A mis Docentes Directores, MSc. Cecilia Haydee Gallardo de Velásquez y Msc. Coralia de los Ángeles González de Díaz; a mis Asesores de Área Licda Zenia Ivonne Arévalo de Márquez, MSc Rocío Ruano de Sandoval; por la dedicación y tiempo invertido, por los consejos a lo largo de la tesis. Gracias a Licda María Elsa Romero de Zelaya y Licda Lizeth Meléndez Navas por forjarme a ser una mejor persona, a Jesús Torres, Gerardo García, CENSALUD por el apoyo durante el desarrollo de esta investigación. Gracias a todo el personal docente de la Facultad de Química y Farmacia por los conocimientos brindados durante el proceso de formación profesional y sobre todo humana.

**Elías Zeceña**

## **DEDICATORIA**

A Dios que me concedió la vida, iluminándome en todo momento con sus sabios e incomparables consejos, permitiendo superarme hasta llegar muy lejos realizando su santa voluntad.

Con profundo amor a mis padres: Luis Antonio Zeceña y Petrona de Jesús Landaverde, quienes con gran esfuerzo e invaluable sacrificio me han alentado a cumplir con mis metas y seguir más allá.

Con inmenso cariño a mis hermanos y hermanas, quienes inspiran en mí, lucha y ansias de superación en todo aspecto de mi vida.

A Mariella Tapella, por su apoyo incondicional, confianza, cariño y sobre todo por enseñarme el verdadero sentido de la vida.

A mis amigos y amigas: Elida Alejandra Murillo, Gabriela Eleonora Martínez, Karla Sofía Gómez, Karla Elvira Jordán, Claudia Ileana Peña, Kimberly Gómez, Marvin Castaneda, Jael Beltrán, y demás amigos, por estar siempre a mi lado, tanto en los momentos buenos como en los malos, por su apoyo incondicional, por darme ánimos y sobre todo por creer en mí.

Con un enorme agradecimiento a mi Comunidad Primavera, Santa Ana, El Salvador. Por haber confiado en mí, el día que ofrecieron esa beca y me eligieron a mí para defenderla, por ello he logrado este triunfo.

**Elías Zeceña.**

## INDICE GENERAL

CONTENIDO	Pág.
RESUMEN	
CAPITULO I	
1.0 INTRODUCCION	xxi
CAPITULO II	
2.0 OBJETIVOS	
CAPITULO III	
3.0 MARCO TEORICO	26
3.1 Bacterias Ácido Lácticas	26
3.2 <i>Lactobacillus acidophilus</i>	27
3.2.1 Condiciones ecológicas.	27
3.2.1.1 Temperatura	27
3.2.1.2 pH	27
3.2.1.3 Necesidades de oxígeno	28
3.2.1.4 Metabolismo	28
3.2.1.5 Sensibilidad a antibióticos y drogas	28
3.2.1.6 Patogenicidad	28
3.2.1.7 Hábitat	29
3.3 <i>Bifidobacterium</i>	29

3.3.1	Características morfológicas de <i>Bifidobacterium lactis</i> :	29
3.4	Probióticos	30
3.4.1	Historia de los Probióticos	30
3.4.2	Definición de Probióticos	32
3.4.3	Probióticos, eficacia y uso en alimentos	32
3.4.4	Factores Biológicos y Tecnológicos en el uso de Probióticos	34
3.4.5	Efectos de los probióticos sobre la salud	34
3.5	El Helado	36
3.5.1	Definición	37
3.5.2	Historia	38
3.5.3	Generalidades sobre la industria del helado	39
3.5.4	Clasificación	39
3.5.5	Designación	42
3.5.6	Especificaciones y Características	42
3.5.6.1	Características Generales	42
3.5.6.2	Requisitos Físicos y Químicos	42
3.5.6.3	Características Sensoriales	43
3.5.7	Materias Primas y Materiales	44
3.5.8	Proceso de Elaboración del Helado	45

## CAPITULO IV

4.0 DISEÑO METODOLOGICO	49
4.1 Tipo de Estudio	49
4.2 Investigación Bibliográfica	49
4.3 Investigación de Campo	50
4.4 Parte Experimental	50
4.4.1 Propuesta, Formulación y Proceso de elaboración de Helado	50
4.4.1.1 Formulación	51
4.4.1.2 Pesada y Dosificación	52
4.4.1.3 Mezclado	52
4.4.1.4 Pasteurización y Homogenización	52
4.4.1.5 Enfriado y Maduración	53
4.4.1.6 Adición de Probióticos	53
4.4.1.7 Batido y Congelación	53
4.4.1.8 Adición de Aditivos	54
4.4.1.9 Envasado	54
4.4.1.10 Endurecimiento y Almacenamiento	54
4.4.2 Proceso para la elaboración del helado	54
4.4.3 Determinación de la concentración, Estandarización y Recuento inicial de la mezcla de probióticos (Probio Tec®)	57
4.4.3.1 Determinación de la Concentración de Probióticos	





5.4 Evaluación de la viabilidad de la mezcla de probióticos en los dos lotes del helado a temperatura de almacenamiento de -10 a 10°C, mediante recuentos en placa a los 0, 5, 10, 15 y 20 días	67
5.5 Determinación de los cambios de pH y las características sensoriales en los dos lotes del helado a temperatura de almacenamiento de -10 a 10°C, con frecuencias de 0, 5, 10, 15 y 20 días	70
5.6 Comparación del recuento de viabilidad de los probióticos en el producto elaborado con el recuento inicial de la mezcla de Probióticos (Probio-Tec®). aplicando el método estadístico Análisis de Varianza (ANOVA)	73
CAPITULO VI	
6.0 CONCLUSIONES	77
CAPITULO VII	
7.0 RECOMENDACIONES	79
BIBLIOGRAFIA	
ANEXOS	

## INDICE DE CUADROS

Caudro N°	Pág. N°
1. Microorganismos probióticos usados en alimentos para humanos.	33
2. Clasificación, composición y definición de los diferentes tipos de helados.	40
3. Requisitos físicos y químicos de los helados.	43

## INDICE DE FIGURAS

Figura N°	Pág. N°
1. Mezcla de Probióticos (Probio Tec®) utilizados en el proceso de elaboración de helado en escala de laboratorio.	63
2. Resultados en los Ensayos realizados hasta obtener un producto con textura cremosa.	63
3. Características Generales y Sensoriales presente en cada ensayo.	64
4. Gráfico del Recuento de Vialidad obtenido tanto para Helados Lote 1 y lote 2, en el transcurso de 20 días de almacenamiento a temperaturas de -10 a 10 °C.	68
5. Gráfico del comportamiento de pH en cada lote de helado fabricado con respecto al periodo de almacenamiento	71

## INDICE DE TABLAS

Tabla N°	Pág. N°
1. Formulación para la elaboración de helado.	51
2. Resultado del recuento obtenido en la determinación de la concentración (unidades formadoras de colonias) de microorganismos probióticos presentes en mezcla (Probio Tec®).	65
3. Resultado del recuento obtenido en cada suspensión estandarizada.	66
4. Recuento de viabilidad obtenido en cada día de muestreo.	67
5. Control de las características sensoriales obtenidas en cada día de muestreo para cada lote (helado sabor fresa y helado sabor café).	70
6. Valores de pH obtenidos en las mediciones de cada día de muestreo.	71
7. Control de <i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella sp.</i> y <i>Staphylococcus aureus</i> en helados al inicio y al final del periodo de almacenamiento.	72
8. Resultados del recuento inicial (valor de referencia) y del recuento de viabilidad en cada día de muestreo de cada lote.	74

9. ANOVA para el recuento de viabilidad del lote 1 (helado  $10^7$ UFC/g) comparado con su respectivo estándar. 74
10. ANOVA para el recuento de viabilidad del lote 2 (helado  $10^6$ UFC/g) comparado con su respectivo estándar. 74

## INDICE DE ANEXOS

### ANEXO N°

1. Boletín Epidemiológico, semana 27, Julio 2018, Ministerio de Salud de El Salvador (MINSAL)
2. Esquema del procedimiento para preparación de helado.
3. Cálculos de cantidades para la preparación de 1Kg de helado para la fórmula 1 y 2.
4. Ficha Técnica de la Mezcla de Probióticos (Probio Tec®)
5. Esquema para la lectura de pH.
6. Esquema para la Determinación de la Concentración de Probióticos presentes en la mezcla (Probio Tec®).
7. Esquema de estandarización de la mezcla de probióticos (Probio Tec®) a  $10^{10}$ UFC/g y  $10^9$ UFC/g.
8. Esquema de estandarización de la mezcla de probióticos (Probio Tec®) a  $10^7$ UFC/g y  $10^6$ UFC/g para el recuento inicial de microorganismos.
9. Esquema de incorporación de la mezcla (Probio Tec®) estandarizada a  $10^{10}$ UFC/g y a  $10^9$ UFC/g, para obtener  $10^7$ UFC/g y  $10^6$ UFC/g respectivamente en el producto de cada lote.

10. Esquema de Recuento inicial de la mezcla de probióticos (Probio Tec®) antes de la incorporación al proceso de elaboración del helado.
11. Esquema del recuento de la mezcla de probióticos (Probio Tec®) en periodos de 0 días, 5 días, 10 días, 15 días y 20 días de almacenamiento a temperaturas de -10° a 10 °C.
12. Diagrama del proceso de elaboración de helado paso a paso.
13. Cálculos para encontrar la concentración de probióticos presentes en la mezcla (Probio Tec®), Partiendo de la Dilución  $10^{-9}$ .
14. Preparación de diluciones y Recuento en Dilución  $10^{-9}$  para la determinación de la Concentración de probióticos presentes en Mezcla (Probio Tec®).
15. Diluciones de soluciones estandarizadas a  $10^7$  y  $10^6$ , utilizadas para el recuento inicial de la mezcla de probióticos.



## ABREVIATURAS

<b>°C</b>	= Grados Celsius.
<b>ANOVA</b>	= Análisis de Varianza.
<b>APE</b>	= Agua peptona estéril.
<b>BAL</b>	= Bacterias Ácido Lácticas.
<b>BB-12®</b>	= <i>Bifidobacterium lactis</i> ..
<b>CENSALUD</b>	= Centro de Investigación y Desarrollo en Salud.
<b>CO<sub>2</sub></b>	= Dióxido de Carbono.
<b>Dil</b>	= Dilución.
<b>E+</b>	= Exponente.
<b><i>E. coli</i></b>	= <i>Escherichia coli</i> .
<b>EMB</b>	= Agar Eosina Azul de Metileno.
<b>FAO</b>	= Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura.
<b>g</b>	= Gramos.
<b>h</b>	= Horas.
<b>H<sub>2</sub>O</b>	= Agua.
<b>LA-5®</b>	= <i>Lactobacillus acidophilus</i> .
<b>MINSAL</b>	= Ministerio de Salud de El Salvador.
<b>mL</b>	= Mililitro.
<b>MRS</b>	= Medio de cultivo De Man Rogosa Sharpe.
<b>NSO</b>	= Norma Salvadoreña Obligatoria.
<b>O<sub>2</sub></b>	= Oxígeno.
<b>OMS</b>	= Organización Mundial de la Salud.
<b>pH</b>	= Potencial de hidrógeno.

**Probio-Tec®** = (ABY-3) Mezcla de 4 probióticos *Lactobacillus acidophilus* LA-5®, *Bifidobacterium lactis* BB-12®, *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus*.

***S. aureus*** = *Staphylococcus aureus*.

**sp.** = Especie.

**SSE** = Solución Salina Estéril.

**UFC** = Unidades formadoras de colonias.

**UFC/g** = Unidades formadoras de colonias por gramo.

**UFC/mL** = Unidades formadoras de colonias por mililitro.

## RESUMEN

En la presente investigación se formularon dos lotes de helado, uno sabor fresa y otro sabor café, a los cuales se les incorporó una mezcla de probióticos (Probio-Tec®), que contenían los liofilizados de *Lactobacillus acidophilus* LA-5® y *Bifidobacterium lactis* BB-12®. Se determinó la concentración de probióticos presentes en la mezcla y se realizaron estandarizaciones que fueron incorporadas en el proceso de elaboración del helado así como también para el recuento inicial de probióticos. También se llevó monitoreo de características sensoriales, de pH y se determinó el recuento de viabilidad de la mezcla de probióticos en el helado almacenado a temperaturas de -10 a 10 °C por un periodo de almacenamiento de 20 días.

La mezcla de probióticos en el helado sabor fresa reportó una excelente viabilidad durante todo el periodo de almacenamiento de 20 días y el helado sabor café reportó su viabilidad requerida hasta el día 15, por lo que los productos elaborados se consideran alimentos funcionales ya que se recupera una cantidad de probióticos mayor a  $1 \times 10^6$  UFC/g, concentración mínima exigida por la FAO/OMS.

Al aplicar el Análisis de Varianza al recuento inicial de probióticos y al recuento de viabilidad de los probióticos en el helado, se determinó que “No hay una diferencia significativa en los resultados del recuento de microorganismo en cada lote fabricado de helado con respecto el recuento inicial de la mezcla de probióticos (Probio-Tec®).” Con un 95% de confiabilidad.

El consumo de helado con probióticos puede prevenir diarreas y evitar gastroenteritis. La investigación fue realizada en el Laboratorio de Alimentos del Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD) de la Universidad de El Salvador durante el periodo de Abril a Septiembre del año 2018.

**CAPITULO I**  
**INTRODUCCION**

## 1.0 INTRODUCCIÓN

Los probióticos son microorganismos vivos que al ser ingeridos en cantidades adecuadas, producen beneficios a la salud, incorporándolos en cualquier alimento que puedan servir como vehículo, que en ciertas condiciones de temperatura y pH en el proceso de elaboración y almacenamiento se mantengan vivos hasta ser ingeridos y puedan desencadenar sus efectos benéficos en el individuo.

Por otro lado también, deben encontrarse en las cantidades necesarias para que produzcan sus efectos benéficos, por lo que las concentraciones mínimas que debe poseer un alimento son de  $10^6$ UFC/g ó mL, según la FAO/OMS.

La presente investigación tuvo como objetivo incorporar una mezcla de probióticos en el proceso de elaboración de helado a escala de laboratorio, aprovechando que este es un alimento que lo consumen niños, jóvenes, adultos y ancianos en cualquier época del año. En dicha mezcla deben encontrarse presentes la cepa probiótica de *Bifidobacterium lactis* BB-12® y *Lactobacillus acidophilus* LA-5, puesto que son representantes de las familias *Bifidobacterium* y *Lactobacillus*, las más estudiadas, encontrando mayor información en cuanto a las variables de crecimiento, resisten a bajas temperaturas y en pequeña proporción al estrés generado mecánicamente en procesos tecnológicos, la importancia de inocularlos en el alimento radica en que han demostrado suprimir la diarrea además de beneficios como: adherirse a la mucosa del intestino, disminuir los síntomas del colon irritable, prevenir la enfermedad inflamatoria intestinal, reduciendo así la problemática reflejada en el Boletín epidemiológico semana 27 (julio 2018), el cual cita entre los 10 principales eventos la diarrea y gastroenteritis, siendo el promedio de casos semanal de enfermedad diarreica aguda de 8,266 casos, de acuerdo al informe del MINSAL.

Se establecieron dos formulaciones para producir 1 kg de helado, lote 1 sabor fresa y lote 2 sabor café, adicionando a cada una diferentes cantidades de probióticos y así obtener en los productos finales las concentraciones de  $10^6$ UFC/g y  $10^7$ UFC/g al concluir un periodo de almacenamiento de 20 días a temperaturas de -10 a 10°C, y poder observar la cantidad de células vivas y asegurar que el microorganismo estará vivo y en las concentraciones necesarias para provocar los efectos benéficos.

El desarrollo experimental de esta investigación comprendió la formulación y proceso de elaboración de helado, en la que se propuso una fórmula para la elaboración del helado, desarrollando una serie de ensayos hasta obtener un producto con textura cremosa; después se realizó la determinación de la concentración de probióticos presentes en la mezcla seguido de la estandarización y recuento inicial de probióticos, y por último se evaluó la viabilidad de los probióticos para determinar el número de células viables en el producto final almacenado a 0 días, 5 días, 10 días, 15 días y 20 días a temperaturas de congelación de -10 a 10°C, no omitiendo que en cada día de monitoreo se hicieron mediciones de pH así como evaluación de las características sensoriales para controlar los cambios que se fueron originando en el periodo de almacenamiento.

Se planteó la hipótesis de trabajo, para realizar un Análisis de Varianza (ANOVA), con el objetivo de corroborar si existían diferencias significativas entre los resultados del recuento de microorganismo en cada formulación de lote fabricado de helado con el recuento inicial de la mezcla probiótica.

Esta investigación se realizó en el Laboratorio de Microbiología de Alimentos del Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD) de la Universidad de El Salvador, en el periodo de abril a septiembre del año 2018.

**CAPITULO II**  
**OBJETIVOS**

## **2.0 OBJETIVOS.**

### **2.1 OBJETIVO GENERAL.**

Incorporar una mezcla probiótica en el proceso de elaboración de helado a escala de laboratorio.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.**

- 2.2.1 Implementar un proceso de elaboración de dos lotes de helado a escala de laboratorio.
- 2.2.2 Determinar la concentración de microorganismos probióticos presentes en mezcla Probio-Tec®.
- 2.2.3 Estandarizar la mezcla Probio-Tec®. a una concentraciones de  $10^6$ UFC/g,  $10^7$  UFC/g,  $10^9$ UFC/g y  $10^{10}$  UFC/g.
- 2.2.4 Evaluar la viabilidad de los probióticos en los dos lotes del helado a temperatura de almacenamiento de -10 a 10 °C, mediante recuentos en placa a los 0, 5, 10, 15 y 20 días.
- 2.2.5 Verificar los cambios de pH y las características sensoriales en los dos lotes del helado a temperatura de almacenamiento de -10 a 10°C, con frecuencias de 0, 5, 10, 15 y 20 días.
- 2.2.6 Comparar el recuento de viabilidad de los probióticos en el producto elaborado con el recuento inicial de la mezcla Probio-Tec®, aplicando el método estadístico Análisis de Varianza (ANOVA).



**CAPITULO III**  
**MARCO TEORICO**

### 3.0 MARCO TEORICO

#### 3.1 Bacterias Ácido Lácticas

Las bacterias ácido lácticas (BAL) son microorganismos que tienen muchas aplicaciones, siendo una de las principales la fermentación de alimentos lácteos, cárnicos y vegetales, para obtener productos con un alto valor nutritivo, además las bacterias lácticas de forma natural o añadidos favorecen el desarrollo de las características sensoriales de productos fermentados, y también actúan como agentes antimicrobianos contra bacterias patógenas en alimentos. <sup>(33)</sup>

Desde hace siglos se han encontrado en productos de leches fermentadas, es por ello que siempre han estado muy presentes en la alimentación del hombre. Las BAL además de aportar a los alimentos sabor, textura y aumentar su valor nutricional, desde hace varios años se utilizan en la industria de alimentos como bioconservadores, debido a la producción de bacteriocinas y otras sustancias con acción antibacteriana que ayudan a la prevención de la descomposición de los alimentos. <sup>(9)</sup>

Las bacterias ácido lácticas, son bacterias fermentadoras no toxigénicas, ni patógenas, Gram positivas, que se caracterizan por producir ácido láctico a partir de carbohidratos, entre las BAL se encuentra la especie *Lactobacillus*, que han sido utilizadas para la conservación de alimentos por fermentación durante miles de años, ejerciendo una doble función, actuando como agentes fermentadores de alimentos y, además, son potencialmente beneficiosos para la salud. Puesto que en el proceso de fermentación láctica los microorganismos llevan a cabo procesos en los que transforman los alimentos en otros productos, a través de la producción de ácido láctico, etanol, y otros productos con fines metabólicos. <sup>(4)</sup>

#### 3.2 *Lactobacillus acidophilus*

Es un microorganismo no patógeno que es muy reconocido por las propiedades que este posee en beneficio para el cuerpo humano. <sup>(34)</sup>

Es una bacteria en forma de bacilos que se tiñe al Gram de color morado siendo un microorganismo Gram Positivo que puede crecer en presencia o ausencia de Oxígeno denominándose como Anaerobio Facultativo, esta especie transforma la lactosa y otros monosacáridos en ácido láctico, creciendo de manera natural en una gran variedad de alimentos, incluyendo la leche, la carne, el pescado y los cereales. <sup>(41)</sup>

Para que la cepa probiótica pueda ejercer los efectos benéficos para el organismo debe disponer de una concentración mínima de  $1 \times 10^6$  UFC/g o mL de células viables al momento de ser consumido. <sup>(32)</sup>

### **3.2.1 Condiciones ecológicas.**

#### **3.2.1.1 Temperatura**

La gran mayoría de lactobacilos crecen de 30-40°C, siendo el límite superior 40°C. Aunque su rango de temperaturas para el crecimiento oscila entre 2 y 53°C, algunos crecen por debajo de 15°C y hay cepas que crecen por debajo de 5°C. Otros crecen a temperaturas bajas, cercanas al punto de congelación (por ejemplo, los que habitan en carnes y pescados congelados). <sup>(35)</sup>

#### **3.2.1.2 pH**

Los lactobacilos crecen en un pH inicial de 6,4 - 4,5; teniendo un pH óptimo de progreso entre 5,5 y 6,2. Su crecimiento se detiene al alcanzar valores de pH de 4 – 3,6, dependiendo de la cepas y especies. Los lactobacilos disminuyen el pH del sustrato que los contiene valores debajo de 4.0 por la producción de ácido láctico, es así como previenen el desarrollo de casi todos los microorganismos competidores. <sup>(5), (35)</sup>

#### **3.2.1.3 Necesidades de Oxígeno**

En su mayoría las cepas de *Lactobacillus* son aerotolerantes, su desarrollo óptimo se alcanza bajo condiciones microaerófilas o anaeróbicas y se sabe que al incrementar la concentración de CO<sub>2</sub> (de un 5% a un 10%) puede estimular su crecimiento, sobretodo superficial sobre medios sólidos. <sup>(35)</sup>

#### **3.2.1.4 Metabolismo**

En su metabolismo, los lactobacilos van de la vida anaerobia a la aerobia. Estos microorganismos carecen de sistemas de citocromos para ejecutar la fosforilación oxidativa y no poseen enzimas superóxidodismutasas ni catalasas. Los miembros de este género transforman la glucosa y las hexosas aldehídicas similares, los carbohidratos que producen estos azúcares simples y los alcoholes polihidroxílicos en ácido láctico por homofermentación o bien, en ácido láctico y otros productos finales adicionales como ácido acético, etanol, dióxido de carbono, ácido fórmico y ácido succínico por heterofermentación, constituyendo al menos un 50% de los productos finales el ácido láctico, el cual usualmente no es fermentado. <sup>(35)</sup>

#### **3.2.1.5 Sensibilidad a antibióticos y drogas**

Los lactobacilos son sensibles ante la mayoría de los antibióticos activos contra las bacterias Gram-positivas. Se ha podido estudiar la sensibilidad de los lactobacilos intestinales ante antibióticos empleados como aditivos alimenticios. La resistencia a la bilis es también una propiedad importante a tener en cuenta para la colonización del intestino por los lactobacilos y se ha estudiado principalmente en el caso de *Lactobacillus acidophilus*. <sup>(35)</sup>

#### **3.2.1.6 Patogenicidad**

Aparte de las caries dentales, la patogenicidad de los lactobacilos es rara; aunque últimamente se han informado algunos procesos infecciosos en humanos donde estos microorganismos se han encontrado involucrados. Tales son los casos de abscesos, septicemias sistémicas y endocarditis bacterianas, provocados por *L.*

*casei* subsp. *ramnosus*, *L. acidophilus*, *L. plantarum* y ocasionalmente *Lactobacillus salivarius*. Sin embargo, las bases bioquímicas de tal patogenicidad aún se desconocen. <sup>(35)</sup>

### 3.2.1.7 Hábitat

Los lactobacilos pueden encontrarse en productos lácteos, quesos, granos, productos cárnicos o de pescado, agua, aguas cloacales, cervezas, vinos, frutas y jugos de frutas, col y otros vegetales fermentados, ensilajes, masas agrias y pulpas, aunque también forman parte de la flora normal de la boca, el tracto gastrointestinal y la vagina de muchos animales de temperatura estable, incluyendo al hombre. También pueden encontrarse en hábitats secundarios como los fertilizantes de origen orgánico. Algunas especies individuales se han adaptado a determinados nichos ecológicos, que son de hecho sus hábitats naturales, siendo muy difícil encontrarlos fuera de éstos. <sup>(35)</sup>

## 3.3 *Bifidobacterium* <sup>(7) (20)</sup>

### 3.3.1 Características morfológicas de *Bifidobacterium lactis*:

- Morfología microscópica: Bacilos anaerobios gram positivos, inmóviles catalasa negativo, en algunos casos puede presentar morfología cocoidea.
- Morfología macroscópica: Varía en función del medio que se emplee.
- pH óptimo de crecimiento 6.5-7.
- Difieren de las BAL en que no solamente producen ácido láctico sino también ácido acético.
- Requiere medio nutricional complejo con aminoácidos, péptidos, vitamina, sales, ácidos grasos y carbohidratos fermentables.

-Temperatura óptima de crecimiento: Especies de origen animal 41-43°C, especies origen humano 36-38°C.

La apariencia de las colonias de este género bajo condiciones de anaerobiosis puede variar mucho según el medio que se emplee. En general, las colonias que se forman son redondeadas, pueden ser brillantes y de diámetro muy variable, pero se distinguen dos diferentes tipos de colonias de *B. bifidum*, algunas colonias son muy lisas, convexas, blancas, y brillantes, mientras que otras son rugosas, con bordes desiguales. Por ello, la morfología de colonia no es una buena referencia para la identificación del género. <sup>(12)</sup>

### **3.4 Probióticos.**

#### **3.4.1 Historia de los probióticos**

El término “probiótico” derivado de bios, palabra griega que significa “vida” nació a mediados del siglo pasado a partir de la observación de la influencia positiva de determinados microorganismos en la flora intestinal. El significado completo de la palabra “probiótico” es “a favor de la vida” y actualmente se utiliza para designar las bacterias que tiene efectos benéficos para los seres humanos y los animales. <sup>(17)</sup>

Los beneficios a la salud asociados a las bacterias “amigables” llamó la atención del público en general por primera vez en 1908, cuando el biólogo Ruso Dr. Elie Metchnikoff escribió “The Prolongation of Life” (La prolongación de la vida). Él afirmó que “la dependencia de los microbios intestinales con respecto a los alimentos hace posible adoptar medidas para modificar la flora de nuestro organismo y sustituir los microbios nocivos por microbios útiles”. <sup>(17)</sup>

Para ese tiempo el pediatra francés Henry Tissier observó que niños con diarrea tenían escasas de bacterias caracterizadas por una morfología peculiar en forma

de “Y” en sus heces, las cuales estas bacterias “bífidas” por el contrario eran muy abundantes en niños sanos, por lo que sugirió la posibilidad de ser administradas estas bacterias a pacientes con diarrea para facilitar la recuperación de una flora intestinal sana. <sup>(17)</sup>

Las obras de Metchnikoff y Tissier fueron las primeras en las que se hicieron propuestas científicas con respecto a la utilización probiótica de bacterias, pero fue hasta 1960 que se utilizó la palabra “probiótico” para describir aquellas sustancias secretadas por un microorganismo que estimula el crecimiento de otros microorganismos. <sup>(17)</sup>

Actualmente los probióticos tienen mayor utilidad en la industria alimenticia, puesto que se ha demostrado los diversos efectos benéficos para los humanos, encontrándose también un número de propiedades para implementar su uso en la salud y en investigaciones clínicas <sup>(4)</sup>. Algunos de sus efectos benéficos son el favorecimiento del equilibrio de la microflora del intestino, la estimulación del sistema inmune, y la competencia contra patógenos. Es por ello que en las últimas décadas se han realizado investigaciones con el fin de incorporar cepas probióticas como ingredientes funcional a diversos alimentos. <sup>(32)</sup>

En los últimos años gracias a la demanda nacional e internacional se ha impulsado una nueva línea de alimentos funcionales probióticos, alimentos que además de su valor nutritivo, ayudan a mantener el estado de salud general del organismo, teniendo también a su vez un efecto adicional, terapéutico o preventivo en el huésped. El concepto de alimento funcional tiene su origen en la relación que existe entre alimentación, salud y la probabilidad de contar con reguladores biológicos que disminuyan el riesgo de poder contraer alguna enfermedad. Los microorganismos que se emplean como probióticos están disponibles comercialmente en industrias alimenticias así como en colecciones de cultivos. <sup>(35)</sup>

Para que una cepa probiótica produzca un efecto benéfico debe encontrarse en altas cantidades en el alimento y estar activos a la hora de ser ingeridos, para que pueda adherirse en la mucosa intestinal y producir sustancias inhibitorias y así combatir a patógenos potenciales. <sup>(32)</sup>

### 3.4.2 Definición de Probióticos.

De acuerdo con la Organización Mundial para la Salud (OMS) la definición de probiótico es: “microorganismos vivos que administrados en cantidades adecuadas, producen beneficios a la salud <sup>(17)</sup>. Estos microorganismos vivos se incorporan a un alimento, permaneciendo activos en el intestino ejerciendo importantes efectos fisiológicos. <sup>(29)</sup>

Los probióticos al ser ingeridos en cantidades adecuadas y manteniéndose viables en el organismo dan respuesta a contribuir en el equilibrio de la microflora intestinal y favorecer al sistema inmune del huésped. <sup>(21)</sup>

El *Lactobacillus acidophilus* es considerado una bacteria probiótica beneficiosa para el ser humano. Este microorganismo habita los intestinos protegiendo al huésped ya que gracias a su metabolismo produce ácido láctico, peróxido de hidrógeno y otros productos que crean un medio no favorable para microorganismos patógenos, produciendo así un efecto nocivo sobre ellos. <sup>(41)</sup>

Criterios para que un microorganismo pueda ser considerado probiótico. <sup>(17)</sup>

- Ser de naturaleza no patógena.
- Ser resistente a la destrucción por ácido gástrico o biliar.
- Ser resistente a la destrucción por procesamiento.
- Capacidad de adhesión a las superficies epiteliales.
- Ser capaz de colonizar el tracto gastrointestinal en corto tiempo.
- Sobrevivir en ecosistema intestinal.
- Producir sustancias antimicrobianas.
- Permanecer vivas y estables durante su empleo.
- Modular Respuestas inmunes



-Influenciar actividades metabólicas humanas.

### 3.4.3 Probióticos, eficacia y uso en alimentos.

Los probióticos para consumo humano pertenecen, aunque no exclusivamente, a los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*. En el cuadro N°1 se presentan las principales especies usadas hasta el momento. Sin embargo, cada día se investiga el posible uso de nuevas especies, siempre y cuando se demuestre que cumplan los criterios de selección para un probiótico. <sup>(32)</sup>

Criterios a cumplir para la selección de un microorganismo como probiótico:

- 1) Presentar tolerancia a los ácidos y a las sales biliares;
- 2) Ser identificados y clasificados por técnicas genotípicas;
- 3) Presentar efecto antagónico contra bacterias patógenas;
- 4) No actuar como patógenos oportunistas, aun cuando el hospedero se encuentre inmunodeprimido;
- 5) Estimular al sistema inmunológico mejorando la resistencia contra patógenos
- 6) Poder adherirse al intestino.

Cuadro N° 1: Microorganismos probióticos usados en alimentos para humanos. <sup>(36)</sup>

Genero	Especie
Lactobacilos	<i>L. acidophilus</i> , <i>L. bulgaricus</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. rhamnosus</i> GG, <i>L. plantarum</i> , <i>L. johnsoni</i> , <i>L. lactis</i> , <i>L. reuteri</i>
Bifidobacterias	<i>B. adolescentis</i> , <i>B. bifidum</i> , <i>B. breve</i> , <i>B. infantis</i> , <i>B. lactis</i> , <i>B. longum</i>
Otros especies.	<i>Sacharomyces boulardii</i> , <i>S. cereviciae</i> , <i>Streptococcus termophilus</i>

Muchas compañías internacionales comercializan alimentos con probióticos, a los que atribuyen determinados efectos benéficos en la salud, sin embargo la cantidad de probióticos vivos que debemos ingerir para observar un efecto positivo sobre el organismo, depende de la especie usada y del tipo de efecto buscado <sup>(11)</sup>. De manera general, se considera que consumiendo diariamente 100 g de alimento que contenga entre  $10^6$  y  $10^7$  UFC/g viables, se producirá un efecto benéfico para la salud <sup>(27), (39)</sup>.

#### **3.4.4 Factores Biológicos y Tecnológicos en el uso de probióticos.**

Los factores que se deben considerar en el desarrollo de alimentos que contienen probióticos son:

1. Selección de la cepa.
2. Cantidad de inóculo.
3. Toxicidad nula
4. Adaptación al proceso.(principalmente tipo de sustrato, competencia con otros cultivos lácticos, calentamiento, etc).
5. Identificación y enumeración de la población viable.
6. Estabilidad durante el almacenamiento (temperatura, pH, Oxígeno)
7. Posibles cambios en las propiedades sensoriales.

#### **3.4.5 Efectos de los probióticos sobre la salud.** <sup>(19), (40)</sup>

Grandes cantidades de microorganismos probióticos en el tracto intestinal son generalmente un indicador de un intestino sano. Por consiguiente, las cepas de

*Lactobacillus* y *Bifidobacterium* han sido el centro de atención de muchas investigaciones que estudian el rol de los probióticos en el mantenimiento de un intestino sano. Los probióticos han demostrado suprimir la diarrea, aliviar la intolerancia a la lactosa y complicaciones post-operatorias, disminuir los síntomas del colon irritable, prevenir la enfermedad inflamatoria intestinal, presenta actividades antimicrobianas y contra el cáncer colo-rectal. Sin embargo, para ejercer sus efectos benéficos, los probióticos deben ser capaces de sobrevivir dentro del tracto gastrointestinal, y mantenerse a niveles suficientemente altos dentro del intestino. La mayoría de células probióticas administradas, ejercen sus beneficios a la salud con la adhesión satisfactoria a las células intestinales. Sin embargo, se recomienda la administración de probióticos en una base diaria, debido a que las células son constantemente eliminadas del tracto digestivo en las heces ante cambios fisiológicos del huésped y/o por la administración de agentes antimicrobianos como los antibióticos.

Dentro de los efectos benéficos que se han atribuido a estos microorganismos se incluyen:

- Descenso del colesterol sérico.
- Progreso en la absorción del calcio.
- Reducción de la intolerancia a la lactosa.
- Favorece la prevención de cáncer colon-intestinal.
- Alivio en las enfermedades infecciosas.
- Alivio en enfermedades crónicas intestinales como colitis ulcerosa.

Estos efectos pueden deberse directa o indirectamente a la regulación de la respuesta inmunológica o de la microflora intestinal. Los probióticos mejoran el

equilibrio de la microflora intestinal, puesto que se unen a los receptores intestinales competitivamente, actúan acidificando la luz intestinal, segregando sustancias que inhiben la proliferación de microorganismos patógenos, ya que producen ácidos orgánicos, bacteriocinas, entre otros. <sup>(31)</sup>

Las bacteriocinas son de gran importancia para la industria de alimentos, puesto que gracias a su actividad antimicrobiana pueden utilizarse como conservadores biológicos, y estos en un momento podrían ocupar el lugar de los conservadores químicos porque tienen la ventaja de ser proteínas que al biodegradarse no forman compuestos secundarios. <sup>(24)</sup>

Los probióticos se sitúan en la mucosa del intestino y ahí originan las sustancias inhibitorias que combaten la acción de bacterias toxigénicas, por lo tanto esta población microbiana, figura un potencial metabólico importante que no solo conserva los procesos de digestión sino que también actúa sobre los procesos de detoxificación, llevados al cabo en el intestino, además de la estimulación del sistema inmunológico. Los probióticos son llamados también bioterapéuticos, bioprotectores o bioprolifáticos y se utilizan para prevenir las infecciones entéricas y gastrointestinales.

### **3.5 El Helado.**

Un posible vehículo para los probióticos es el helado, y teniendo en cuenta que existen alrededor de 240 tipos de helados que se consumen en cualquier época del año, cuyos nutrientes son bien asimilados por el organismo humano <sup>(25), (38)</sup>. Y que precisamente estos productos tienen gran aceptación entre niños y adolescentes y adultos, considerándose por ello, buenos candidatos para ser enriquecidos con ingredientes funcionales. Al respecto, hay varios estudios que demuestran la factibilidad de usar a los helados como acarreadores de probióticos para mejorar la salud de estas poblaciones. <sup>(1), (3), (37)</sup>

### 3.5.1 Definición.

El helado o “ice Cream” (crema helada) es un postre congelado elaborado de agua, leche o crema de leche, combinadas con saborizantes ya sean naturales o artificiales y edulcorantes o azúcar. En los últimos tiempos ha sido notable la adición de frutas frescas, frutos secos, chocolate, sustancias estabilizantes, emulsificantes, con el fin de aumentar la variedad de este producto para la preferencia por parte de todo público.

La Norma Salvadoreña Obligatoria NSO 67.01.11:04 define a los helados como “productos obtenidos a partir de la mezcla pasteurizada, homogenizada, batida y refrigerada por medios manuales o mecánicos que tenga en su composición grasa butírica en forma de crema, mantequilla o en polvo, o grasa vegetal, proteína láctea en forma de sólidos de leche, edulcorantes tales como azúcar, glucosa, dextrosa en forma líquida o sólida, estabilizantes y emulsificantes alimenticios, saborizantes y colorantes naturales y artificiales, agua potable. Estos deben mantenerse en estado de congelación.”

Fisicoquímicamente, el helado es un coloide alimenticio complejo formado por glóbulos de grasa, burbujas de aire y cristales de hielo dispersos en una matriz continua, viscosa y altamente concentrada, en la que también se encuentran dispersa o solubilizada, proteínas, sales, vitaminas, polisacáridos y azúcares <sup>(16)</sup>. La tecnología para producir este alimento se ha desarrollado rápidamente durante las últimas décadas, convirtiéndose en una industria muy rentable a nivel mundial.

### 3.5.2 Historia. <sup>(3)</sup>

No se conoce con exactitud el origen de los helados. Hay quienes que sostienen que los antiguos romanos crearon una bebida de frutas, miel y nieve traída de los

Alpes para preparar esta bebida a Nerón. Otros señalan que los chinos hace muchos años antes de cristo, mezclaban la nieve de las montañas con miel y frutas.

En china, el emperador Tang (618-697, antes de la era cristiana) de la dinastía Shang, tenía un método para crear mezclas de hielo con leche. De China esta receta paso a la India, Persia (Iran en la actualidad) y después a Grecia y Roma. Pero es precisamente en Italia de la Baja Edad Media cuando el helado toma carácter de naturaleza en Europa.

En el siglo XVI se descubrió que el nitrato de etilo mezclado con la nieve producía temperaturas muy bajas lo que influiría de manera importante en la fabricación de helados.

Un gran paso en la industria del helado fue el descubrimiento del descenso crioscópico (descenso de la temperatura de solidificación) de las soluciones de sal (salmueras) las cuales permitían que utilizando un balde rodeado de una mezcla de hielo con sal, se congelaran mediante el batido bebidas y zumos de frutas azucarados, dando lugar a los primeros helados de textura cremosa.

En el año 1700, los a América, haciéndose populares en Estados Unidos. Y en 1913 se inventó la primera máquina continua para elaborar helados que constaba de un gran cilindro de acero, congelado por un equipo muy potente de frío y en la parte interior, de un batidor con aspas impulsado por un potente motor eléctrico, que por medio de agitación mueve homogéneamente la muestra continuamente con el propósito que todos los componentes de la formula se encuentre totalmente dispersos en la mezcla, hasta que dicha mezcla alcance la consistencia de una crema helada.

### **3.5.3 Generalidades sobre la industria del helado.**

La fabricación industrial de helados tuvo lugar primero en los Estados Unidos, desde donde se difundió ampliamente en poco tiempo. Dando origen a una indudable ventaja tecnológica de la producción americana de helados, desfavoreciendo la producción en forma artesanal, cuyo origen presuntamente fue en China aproximadamente en el siglo XI A. de C. con el almacenamiento de hielo (nieve) para el verano en bodegas especiales, la cual mezclaban con vino o leche y zumo de fruta con miel. <sup>(10)</sup>

El consumo de helado ha aumentado marcadamente en las últimas dos décadas. Teniendo más protagonismo en este auge los helados elaborados a escala industrial, llamados (de marca), mientras que los elaborados a escala de laboratorio, llamados (artesanales) han ido decreciendo y su participación en el comercio retrocede, ya que corre el peligro de ser absorbido por un mercado que garantiza calidad en la producción.

Los helados consumidos en El Salvador como en otros países, en su mayoría son de fabricación industrial. La tecnología en la elaboración de helados, tratamiento de materias primas para obtener la mezcla a congelar hasta la obtención del helado como producto terminado, es por tanto una tecnología principalmente industrial. De esta manera la elaboración artesanal de helados, ocupa por consiguiente un lugar relativamente pequeño dentro del mercado, por falta de conocimiento en las poblaciones con respecto a la composición de un helado, a procesos de elaboración de manera artesanal, a condiciones de almacenamiento, etc.

### **3.5.4 Clasificación.** <sup>(26)</sup>

Los helados se clasifican de acuerdo a su composición y al origen de sus ingredientes como se reflejan en el Cuadro N°2

Cuadro N° 2: Clasificación, composición y definición de los diferentes tipos de helados <sup>(26)</sup>

Clasificación	Tipo de Helado	Definición y Composición.
<b>Helados</b>	Helado de Leche	Es el producto obtenido a partir de la mezcla pasteurizada, homogeneizada, batida y refrigerada por medios mecánicos o manuales que tenga en su composición los ingredientes según se establecen en la definición, pero sin contener grasa vegetal y que contenga en su composición grasa butírica en un porcentaje <b>igual o inferior al 7%</b>
	Helado de Crema	Es el producto obtenido a partir de la mezcla pasteurizada, homogeneizada, batida y refrigerada por medios mecánicos o manuales que tenga en su composición los ingredientes según se establecen en la definición, pero sin contener grasa vegetal y que contenga en su composición grasa butírica en un porcentaje <b>igual o superior al 8%</b>
	Helado de Grasa Vegetal	Es el producto obtenido a partir de la mezcla pasteurizada, homogeneizada, batida y refrigerada por medios mecánicos o manuales que tenga en su composición los ingredientes según se establecen en la definición, conteniendo grasa vegetal en un porcentaje <b>igual o inferior al 7%</b>



Cuadro N°2 continuación.

<b>Helados</b>	Helado de Crema Vegetal	Es el producto obtenido a partir de la mezcla pasteurizada, homogeneizada, batida y refrigerada por medios mecánicos o manuales que tenga en su composición los ingredientes según se establecen en la definición, conteniendo grasa vegetal en un porcentaje <b>igual o superior al 8%</b>
	Helado de Agua	Es el producto obtenido por el batido y congelamiento manual o mecánico de mezclas pasteurizadas que contengan en su composición agua potable, sustancias edulcorantes tales como azúcar, glucosa, dextrosa, fructosa en forma líquida o sólida, y edulcorantes artificiales, acidulantes, estabilizantes, colorantes y saborizantes naturales y/o artificiales, estos deben ser los permitidos por el Codex Alimentarius.
	Nieves	Es el producto obtenido por batido y congelamiento manual o mecánico de mezclas pasteurizadas que contengan en su composición todo lo mencionado en los anteriores según lo establecido en el Codex Alimentarius, debe contener pulpa de frutas naturales.
<b>Mezclas para helados.</b>	Mezcla en polvo para helados	Es el producto seco deshidratado, que contiene todos los ingredientes en cantidades apropiadas y en algunos casos aromas, sabores y colorantes adecuados, que con la adición de agua potable y sometido a pasteurización, batido, y congelado dé como resultante un producto alimenticio que se ajuste a la definición del helado correspondiente.
	Mezcla líquida pasteurizada para helados	Es el producto líquido que contiene todos los ingredientes necesarios, en las cantidades apropiadas, de manera que al someterlo a proceso de congelamiento, dé como resultado un producto alimenticio que se ajuste a la definición del helado correspondiente.

### 3.5.5 Designación. <sup>(26)</sup>

El producto se designará:

- a) “Helado de...”, si el producto llevara en sus ingredientes fruta o sabores naturales en una proporción en peso mayor a los sabores artificiales.
- b) “Helado sabor a...”, si el producto lleva en sus ingredientes sabores artificiales en una mayor proporción en peso que los ingredientes naturales.
- c) “Nombre comercial”, nombre comercial o fantasía seguido de una de las designaciones anteriores.

### **3.5.6 Especificaciones y Características** <sup>(26)</sup>

#### **3.5.6.1 Características Generales.**

Los helados y las mezclas para helados deben ser elaborados y envasados bajo estrictas condiciones higiénicas sanitarias y Buenas Prácticas de Fabricación. Así como de cualquier alteración que pueda afectar la comestibilidad, la adecuada conservación y el buen aspecto del producto final.

#### **3.5.6.2 Requisitos Físicos y Químicos**

Los helados deben cumplir con los requisitos físicos y químicos especificados en el Cuadro N°3.

Cuadro N° 3: Requisitos físicos y químicos de los helados. <sup>(26)</sup>

Características	Tipo de helado					
	Helado de leche	Helado de Crema	Helado con Grasa Vegetal	Helado de Crema vegetal	Helado de Agua	Nieve
Sólidos totales, en porcentaje en masa, mínimo	30	35	30	35	15	20
Grasa de leche, en porcentaje en masa.	≤7%	≥8%	0	0	0	0
Grasa no láctea, en porcentaje en masa	0	0	≤7%	≥8%	0	0
Proteínas en porcentaje en masa, mínimo.	1.5	2	1.5	2	0	0
Masa por volumen, en g/L, mínimo.	475	475	475	475	710	710

### 3.5.6.3 Características Sensoriales

**-Textura:** los helados deben tener una textura suave característica uniformemente libre de hielo, en el caso de los helados de agua y las nieves en los cuales la presencia de hielo no constituirá defecto si los mismos no son mayores de 5mm.

**-Color:** Los helados debe tener el color propio del tipo y sabor que corresponda.

**-Olor y sabor:** los helados deben tener olor y sabor agradable y característico, sin la presencia de olores o sabores extraños o anormales.

**-Apariencia:** los helados deben tener una apariencia atractiva y uniforme, exceptuando los helados preparados con fruta, nueces, con trozos de chocolate, u otros similares, en los cuales los trozos de dichos ingredientes deben estar uniformemente distribuidos en la masa del helado. Los helados que se designen como "de....(nombre específico de frutas)..." deben tener las frutas o productos de frutas en cantidad suficiente para caracterizar el producto.

### **3.5.7 Materias Primas y Materiales.** <sup>(26)</sup>

Los ingredientes que se emplean en la elaboración de helados deben ser limpios, sanos y libres de contaminación; además deben cumplir con las normas salvadoreñas correspondientes y en su defecto con las normas del Codex Alimentarius de la FAO/OMS. Los principales ingredientes son los que se indican a continuación:

-Leche, constituyentes lácteos y productos lácteos, pasteurizados, concentrados, deshidratados, fermentados, reconstituidos o combinados.

-Aceites comestibles y grasas comestibles no lácteas autorizadas.

-Proteínas comestibles no lácteas.

-Edulcorantes: sacarosa, jarabe de maíz o glucosa, azúcar invertida, dextrosa, fructosa, lactosa o mezclas de ellos, y edulcorantes artificiales.

-Agua potable.

-Huevos y/o productos derivados de los mismos, libres de sabores y olores extraños.

-Frutas y productos derivados de las mismas.

-Otros productos alimenticios, tales como el café, cacao, miel de abejas, jengibre, almendras, nueces, licores

-Aditivos alimentarios.

### **3.5.8 Proceso de Elaboración del Helado.** <sup>(21)</sup>

En la actualidad, el helado se elabora mediante la congelación de una mezcla pasteurizada, que se somete a un proceso de incorporación de aire y congelación. A esta mezcla se le conoce como la base del helado (*mix*), la cual suele estar fabricada a partir de frutas para el caso de los helados de agua, y de lácteos para los helados de leche. <sup>(12)</sup>

Existen ocho aspectos a considerar como pasos irremplazables en la fabricación de helados <sup>(12)</sup>, dichas actividades son:

#### **-Recepción y almacenamiento de los ingredientes líquidos.**

Los principales ingredientes líquidos son la leche entera o desnatada, nata o crema con diferentes concentraciones de grasa, azúcares en forma de jarabe y diversas grasas. Requiriendo distintas temperaturas de almacenamiento, ya que un máximo periodo de tiempo de almacenamiento podría ocasionar alteraciones como la acidificación de la leche o el enranciamiento de las grasas.

#### **-Recepción y almacenamiento de los ingredientes sólidos.**

Los Ingredientes sólidos son principalmente leche en polvo, azúcar, suero en polvo, emulsificantes, estabilizantes, mantequilla y grasas vegetales. La humedad y la temperatura, son las principales condiciones críticas en el almacenamiento son ya que debido a las características higroscópicas de los polvos se facilita la absorción de agua y con esto la formación de grumos que perjudican al proceso.

**-Pesaje y dosificación.**

Toda la materia prima es dosificada a los respectivos recipientes. Los sólidos se miden en peso y los líquidos en volumen, después de esto se mezclan.

**-Mezcla de todos los ingredientes.**

En esta etapa se procederá a unir, todos los ingredientes líquidos (leche, crema de leche, etc.) en primera instancia y posteriormente se añadirán los sólidos (leche en polvo, azúcar, estabilizantes, etc.). Esta operación se efectúa en los tanques de mezcla con la ayuda de un agitador. En primera instancia se mezclará la crema de leche, con la leche en polvo reconstituida, luego se aplicará calor y se agregarán los otros ingredientes secos. La adición del estabilizante se hace con la mitad del azúcar empleada, con el fin de lograr una mejor dispersión del estabilizante en la mezcla del helado. La otra mitad se añade a la temperatura de 50°C aprox. Todos los ingredientes así mezclados reciben el nombre de "mezcla base".

**-Homogenización y pasteurización de la mezcla.**

La mezcla resultante se somete a un proceso de pasteurización, donde es calentada, alcanzando la temperatura de pasteurización (83-85 °C) en un periodo de 15 a 25 s. Posteriormente se enfría con agua (15-20 °C) y luego con agua helada a (2-3 °C). La temperatura final de la mezcla es de 5 °C; en esas condiciones es transferida al recipiente de maduración.

**-Maduración.**

Luego de pasteurizada y homogenizada la mezcla, esta se enfría rápidamente en una cámara de refrigeración a temperaturas entre 2 a 4°C por un tiempo de 4 a 5 horas, se lleva a cabo una fermentación hasta alcanzar un pH de 5,5 y se "madura" la mezcla, Durante esta etapa la grasa se solidifica (se torna cristalina), los estabilizantes se hinchan así como las proteínas, se mejora la suavidad y el

cuerpo del helado, se aumenta la viscosidad y facilita el incremento del aire durante el batido.

#### **-Agregado de aditivos.**

Los aditivos son integrados a la mezcla después del periodo de maduración, o más bien dicho antes de la etapa de almacenamiento en congelación. En el caso de los colorantes, estos pueden adicionarse directamente al helado <sup>(2)</sup>

#### **-Congelación de la mezcla.**

La congelación, define en gran medida la calidad del producto final. Tiene dos importantes funciones:

- 1). incorporación de aire por agitación vigorosa hasta conseguir el cuerpo deseado.
- 2). congelación rápida para obtener pequeños cristales que se reflejan en una buena textura.

**CAPITULO IV**  
**DISEÑO METODOLOGICO**



## **4.0 DISEÑO METODOLOGICO**

### **4.1 TIPO DE ESTUDIO**

#### **-Transversal**

La investigación se llevó a cabo en un periodo de seis meses, de abril a septiembre del año 2018.

#### **-Prospectivo**

Es un estudio que se basó en investigaciones previas y llevará consecuencias actuales y futuras, puesto que se realizaron ensayos y análisis que servirán como antecedentes para posteriores investigaciones relacionadas con el tema, que se enfocará en la incorporación de cultivos probióticos en el proceso de elaboración de helado a escala de laboratorio.

#### **-Experimental:**

Se realizaron ensayos en cuanto a la formulación y elaboración de helado, a la cual se incorporaron concentraciones de microorganismos estandarizadas, y se evaluó su viabilidad en un periodo de almacenamiento 0 a 20 días, para realizar una propuesta de formulación final en base a los resultados obtenidos.

### **4.2 INVESTIGACIÓN BIBLIOGRAFICA**

Se realizó una investigación consultando libros, revistas, artículos científicos en las siguientes bibliotecas:

-Dr. Benjamín Orozco de la Facultad de Química y Farmacia, Universidad de El Salvador

- Central de la Universidad de El Salvador.
- Ciencias Agronómicas de la Universidad de El Salvador.
- Facultad de Ingeniería y Arquitectura, Universidad de El Salvador.
- Universidad Salvadoreña Alberto Masferrer (USAM)
- Internet.

#### **4.3 INVESTIGACION DE CAMPO.** <sup>(18)</sup>

**UNIVERSO:** Los dos lotes de helado que se elaboraron de un Kg cada uno, que contenían las siguientes concentraciones de probióticos  $10^7$  UFC/g (Lote 1) y  $10^6$  UFC/g (Lote 2).

**MUESTRA:** Cada lote de 1 Kg de helado se envaso en 20 frascos de 50 gramos de cada lote, de los cuales se realizó un muestreo al azar de 2 frascos de cada concentración a los que se les realizó las siguientes determinaciones: monitoreo de pH, control de características sensoriales y evaluación de la viabilidad a frecuencia de 0, 5, 10, 15, 20 días a temperaturas de almacenamiento de -10 a 10 °C.

#### **4.4 PARTE EXPERIMENTAL.** <sup>(6)</sup>

El desarrollo experimental se realizó en el Laboratorio de Microbiología de Alimentos del Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD) de la Universidad de El Salvador.

##### **4.4.1 Propuesta, Formulación y Proceso de elaboración de Helado:**

Para obtener un producto cremoso se realizaron ensayos en serie, en el cual se desarrolló de la siguiente manera: (Ver Anexo N°2)

- Formulación y Recepción de Materias Primas.

- Pesada y Dosificación.
- Mezclado.
- Pasteurizado y homogenización.
- Enfriado y Maduración.
- Adición de Probióticos.
- Batido y Congelación.
- Adición de Aditivos.
- Envasado.
- Endurecimiento y Almacenamiento.

#### 4.4.1.1 Formulación.

Basado en la clasificación y a las materias primas y materiales que describe la Norma Salvadoreña Obligatoria para Helados y mezclas de Helados (NSO 67.01.11:04) se elaboró una fórmula con el propósito de obtener un helado cremoso <sup>(26)</sup> (Ver Tabla N°1).

TABLA N°1: FORMULACIÓN PARA LA ELABORACIÓN DE HELADO. <sup>(26)</sup>

Materia Prima	(Lote 1- 10 <sup>7</sup> UFC/g) (%)	(Lote 2- 10 <sup>6</sup> UFC/g) (%)
Base Cremosa de Leche.	50.00	50.00
Azúcar.	14.00	14.00
Leche líquida entera.	15.90	35.00
Saborizantes Naturales.	20.00 (Fresa)	0.90 (Café)
Colorantes.	0.09	0.099
Probióticos*	0.01*	0.001*
Total	100%	100%

\*Cantidades inoculadas de la mezcla de probióticos con las que se obtuvo 2 diferentes productos a concentraciones de 10<sup>6</sup>UFC/g (L2) y 10<sup>7</sup> UFC/g (L1).

NOTA: Cálculos para preparar 1 Kg y fórmulas detalladas de cada lote. (Ver Anexo N°3)

Los ingredientes líquidos son: colorantes, leche entera, base cremosa de leche con diferentes concentraciones de grasa según marca.

Los Ingredientes sólidos son: azúcar, saborizantes naturales y la mezcla de probióticos (se realizó una estandarización mediante diluciones seriadas, para reconstituir y activar los microorganismo y no correr el riesgo que los microorganismo agregados directamente en polvo en el proceso de elaboración no se puedan recuperar al final en el producto elaborado.

Tiempo total de preparación: 3 a 5 horas aproximadamente.

#### **4.4.1.2 Pesada y Dosificación.** <sup>(20)</sup>

La materia prima se dosificó en los respectivos recipientes, en su mayoría plástico y otros de acero inoxidable. Para fines de exactitud en la fórmula tanto materia prima sólida como líquida las mediciones se hicieron en unidades de peso.

#### **4.4.1.3 Mezclado.** <sup>(20)</sup>

Después de pesar todas las materias primas sólidas o líquidas, se procedió a almacenar por una hora la base cremosa de leche a temperaturas de 5 a 10 °C la cual estaba en un bowl de acero inoxidable; los saborizantes naturales, leche entera líquida y el azúcar se mezclaron y homogenizaron, calentando a temperatura de 50°C aproximadamente para asegurar que se mezclaran completamente.

#### **4.4.1.4 Pasteurización y homogenización.** <sup>(20)</sup>

La mezcla resultante se sometió a un proceso de pasteurización, la cual se calentó hasta alcanzar una temperatura de 80-85 °C, en un periodo de 15 a 25

segundos. En este paso se terminó de homogenizar parte de la mezcla que pudo haber quedado sin disolver gracias al calentamiento.

#### **4.4.1.5 Enfriado y Maduración.** <sup>(20)</sup>

Luego de pasteurizada y homogenizada la mezcla, se enfrió con agua (15-20 °C) y luego con agua helada a (10 a 15 °C), se colocó rápidamente en la refrigeradora a temperaturas entre 2 a 4°C por un tiempo entre una hora y hora y media, donde se llevó a cabo la fermentación hasta alcanzar un pH de 5,5; madurándose la mezcla, Durante esta etapa se hincharon las proteínas contenidas en la leche, mejorando la suavidad y el cuerpo del helado que se pretendía obtener, se aumentó la viscosidad y facilitó el incremento del aire durante el batido.

#### **4.4.1.6 Adición de Probióticos.** <sup>(5)</sup>

La cantidad de inóculo de probiótico no está definida, depende de la resistencia de cada especie, por lo que se añadió una concentración mayor a  $10^7$  UFC/g <sup>(2828)</sup>, después que se incorporó los probióticos se dejó que descendiera nuevamente la temperatura aproximadamente de 15 a 10°C, por lo que se llevó a refrigeración por unos 30 minutos.

#### **4.4.1.7 Batido y Congelación.** <sup>(20)</sup>

Después se procedió a la operación de esponjamiento (overrun) que consiste en batir la base cremosa de leche después de estar aproximadamente una hora a temperaturas de 5 a 10 °C con la ayuda de una batidora eléctrica incorporando aire para aumentar el volumen del helado e impartirle una textura suave y esponjosa.

#### **4.4.1.8 Adición de Aditivos.** <sup>(20)</sup>

Después de haber batido la base cremosa de leche, la base del helado se formó, y este es el momento en el que se agregó saborizantes naturales, leche líquida

entera y el azúcar (mezcla pasteurizada), se adicionaron los colorantes, u otros aditivos y así poder disponer de dos diferentes sabores.

#### **4.4.1.9 Envasado.** <sup>(28)</sup>

El producto final elaborado se colocó en frascos de material plástico, según la cantidad a envasar.

#### **4.4.1.10 Endurecimiento y almacenamiento.** <sup>(28)</sup>

Finalmente, la mezcla se almacenó (-10 a 10°C).

### **4.4.2 PROCESO PARA LA ELABORACIÓN DEL HELADO**

A continuación se detalla paso a paso el procedimiento para la Elaboración de Helado a Nivel de Laboratorio:

-Limpiar y sanitizar el área donde se procederá a elaborar el producto, lavar los recipientes que serán utilizados durante el proceso de elaboración, verificando que cada una se encuentre en buen estado.

-Pesar la materia prima tanto sólida como líquida, utilizando una balanza semianalítica o granataria, según disposición, en recipientes correspondientes. Las cantidades de materia prima a pesar tanto para lote 1 como para lote 2 se detallan a continuación: (Ver Anexo N°3)

- Leche Entera Líquida
- Base Cremosa de Leche
- Azúcar
- Saborizantes Naturales
- Colorantes

-Probióticos: en forma de Mezcla (Probio-Tec®) que contiene 4 Cepas de Microorganismos Probióticos. (Ver Anexo N° 4)

-Después de haber pesado toda la materia prima a utilizarse en el proceso de elaboración del helado, la base cremosa de leche debe estar contenida en un bowl de acero inoxidable y se tapa con film plástico, almacenándola en la refrigeradora a temperaturas de 5 a 10°C por un periodo de una hora aproximadamente.

-En otro recipiente de acero inoxidable adicionar las siguientes materias primas:

-Leche entera líquida

-Azúcar

-Saborizantes Naturales (en el caso de la fresas se recomienda un tratamiento de desinfección y luego contarlas en trozos para facilitar su incorporación)

Todas estas materias primas se mezclan y homogenizan, calentando a temperatura de 50°C aproximadamente para asegurar que se mezclen completamente, con la ayuda de una batidora manual y así se evita que la mezcla se pueda caramelizar.

-Inmediatamente se pasteuriza la mezcla, por medio del calentamiento a 80-85 °C durante 20 ó 25 segundos. (Evitar que la mezcla se rebalse).

-Enfriar la Mezcla mediante un baño de agua fría a (15-20°C) y luego seguir enfriando en otro baño de agua helada a (15-10°C), después se coloca rápidamente en la refrigeradora a temperaturas entre 2 a 4°C por un tiempo de una hora y media aproximadamente, tiempo en el cual se lleva a cabo una fermentación hasta alcanzar un pH de 5,5 y se madura la mezcla.

-Pasada hora y media realizar la siguiente determinación:

-Medición de pH a temperatura ambiente. <sup>(18)</sup> (Ver Anexo N°5)

-Calentar la mezcla madurada a fuego hasta alcanzar aproximadamente 30 - 40°C e incorporar las cantidades de probiótico dependiendo de cada lote a fabricar (Ver Anexo N°9). Después se tapa con papel film y se lleva nuevamente a refrigeración por 30 minutos aproximadamente hasta alcanzar una temperatura de 15 a 10°C.

-Batir la Base cremosa de leche que se había almacenado previamente en refrigeración mediante una Batidora eléctrica, para favorecer la incorporación de aire, para aumentar el volumen del helado e impartirle una textura suave y esponjosa.

-Después de haber batido con la base cremosa de leche, la base del helado se ha formado, y este es el momento en el que se agrega la mezcla anterior previamente pasteurizada (que contiene los saborizantes naturales, la leche líquida entera y el azúcar) mezclando lentamente con una paleta de goma (Realizar lentamente para evitar la pérdida de aire en el helado), de igual forma se adicionan los colorantes, u otros aditivos y así poder disponer de una gran variedad de sabores y colores.

- Envasar el producto final en frascos con capacidad de 50 gramos, sellar para evitar algún tipo de contaminación y Rotular con la fecha de elaboración, reportando el valor de pH obtenido.

-Almacenar el producto envasado en un freezer a temperaturas de -10°C a 10°C, durante los siguientes 20 días para posteriores análisis.

#### **4.4.3 Determinación de la concentración, Estandarización y Recuento inicial de la mezcla de probióticos (Probio Tec®). <sup>(18)</sup>**



Se trabajó con las concentraciones  $10^6 \text{UFC/g}$  y  $10^7 \text{UFC/g}$  para realizar el recuento inicial en la mezcla. Y con las concentraciones  $10^9 \text{UFC/g}$  y  $10^{10} \text{UFC/g}$  que se adicionaron en el proceso de elaboración del helado.

Comprende de las siguientes partes:

- Determinación de la Concentración de Probióticos presentes en la Mezcla. (Probio Tec®)
- Estandarización de la Mezcla Probiótica a  $10^{10} \text{UFC/g}$  y  $10^9 \text{UFC/g}$ .
- Estandarización de la Mezcla Probiótica a  $10^7 \text{UFC/g}$  y  $10^6 \text{UFC/g}$
- Recuento inicial de la Mezcla Probiótica.

#### **4.4.3.1 Determinación de la Concentración de Probióticos presentes en la Mezcla (Probio-Tec®).** <sup>(18)</sup> (Ver Anexo N°6)

- Pesar 1 gramo de la mezcla de probióticos y transferir a un tubo de ensayo que contiene 9.0mL de solución salina estéril, homogenizar durante dos minutos (Dilución  $10^{-1}$ )
- Realizar diluciones seriadas hasta llegar a la dilución  $10^{-9}$
- De la última dilución inocular por duplicado alícuotas de 1.0mL y 0.1mL en placas de Petri estériles.
- Adicionar 20mL de Agar MRS a cada placa y mezclar en forma de ocho.
- Incubar a 30-37°C de 48 a 72 horas en condiciones de aerobiosis.
- Realizar los cálculos necesarios para determinar la cantidad de microorganismos presentes en la suspensión estandarizada.

#### **4.4.3.2 Estandarización de la mezcla de probióticos (Probio Tec®) a $10^9 \text{UFC/g}$ y $10^{10} \text{UFC/g}$ .** <sup>(18)</sup> (Ver Anexo N°7)

Estas dos concentraciones fueron útiles para incorporarlas en el proceso de elaboración del helado y así en el producto final poder obtener concentraciones benéficas para la salud del consumidor.

-Pesar 1 gramo del polvo de la mezcla de probióticos (Probio Tec®) equivalente a  $1.7 \times 10^{11}$  UFC/g y transferir a un tubo de ensayo que contiene 9.0mL de solución salina estéril, homogenizar durante dos minutos (Dilución 1:10) obteniendo una concentración de  $10^{10}$  UFC/g.

-De la dilución 1:10 transferir 1.0mL con una pipeta estéril a un tubo de ensayo que contiene 9.0mL de solución salina estéril, homogenizar durante dos minutos (Dilución 1:100) obteniendo una concentración de  $10^9$  UFC/g.

#### **4.4.3.3 Estandarización de la mezcla de probióticos (Probio Tec®) a $10^6$ UFC/g y $10^7$ UFC/g.** <sup>(18)</sup> (Ver Anexo N°8)

Estas dos concentraciones se utilizaron para realizar el recuento inicial de los microorganismos probióticos presentes en la mezcla y así tener la certeza que el microorganismo se encontraba vivo antes de adicionarse en el proceso de elaboración del helado, además estos valores fueron útiles como valores de referencia con respecto a los obtenidos en cada día de muestreo durante el periodo de 20 días de almacenamiento a temperaturas de -10 a 10°C.

-Partiendo de la dilución 1:100 ( $10^9$  UFC/g), transferir 0.1mL con una pipeta estéril a un tubo de ensayo que contiene 9.9mL de solución salina estéril, homogenizar durante dos minutos (Dilución 1:10000) obteniendo una concentración de  $10^7$  UFC/g.

-De la dilución 1:10000 transferir 1.0mL con una pipeta estéril a un tubo de ensayo que contiene 9.0mL de solución salina estéril, homogenizar durante dos minutos (Dilución 1:100000) obteniendo una concentración de  $10^6$  UFC/g.

#### **4.4.3.4 Recuento inicial de la mezcla de probióticos.** <sup>(18)</sup> (Ver Anexo N°10)

Este recuento sirvió para verificar la viabilidad de los probióticos antes de agregarse al producto para cerciorarse que los microorganismos estuvieran vivos y estos pudieran ser recuperados en los días de muestreo respectivos.

El Recuento se realizó Mediante el método de placa vertida utilizando medio de cultivo MRS.

##### **Para la solución estandarizada $10^7$ UFC/g.**

- Transferir una alícuota de 0.1mL de la solución estandarizada a 9.9mL de Agua peptona estéril (dilución 1:100).
- Realizar otra dilución 1:100 y por último realizar una dilución 1:10 ( $10^{-5}$ )
- De la última dilución inocular por duplicado alícuotas de 1.0mL y 0.1mL en placas de Petri estériles.
- Adicionar 20mL de Agar MRS a cada placa y mezclar en forma de ocho.
- Incubar a 30-37°C de 48 a 72 horas en condiciones de aerobiosis.
- Realizar los cálculos necesarios para determinar la cantidad de microorganismos presentes en la suspensión estandarizada.

##### **Para la solución estandarizada $10^6$ UFC/g.**

- Transferir una alícuota de 0.1mL de la solución estandarizada a 9.9mL de Agua peptona estéril (dilución 1:100).
- Realizar dos diluciones 1:10 de modo que la última dilución será ( $10^{-4}$ ).
- De la última dilución inocular por duplicado alícuotas de 1.0mL y 0.1mL en placas de Petri estériles.
- Adicionar 20mL de Agar MRS a cada placa y mezclar en forma de ocho.
- Incubar de 30-37°C por 48 a 72 horas en condiciones de aerobiosis.

-Realizar los cálculos necesarios para determinar la cantidad de microorganismos presentes en la suspensión estandarizada.

#### **4.4.4 Evaluación de la viabilidad de la mezcla de probióticos (Probio Tec®). <sup>(18)</sup> (Ver Anexo N°11)**

La viabilidad de los microorganismos se realizó a muestras almacenadas a temperatura de -10°C a 10°C a los 0 días, 5 días, 10 días, 15 días y 20 días, tanto al lote 1 (concentración de  $10^7$  UFC/g) como al lote 2 (concentración de  $10^6$  UFC/g), pues estos microorganismos deben estar vivos a la hora de que el consumidor ingiera el alimento, y así estos puedan adherirse a las mucosas intestinales y ejerzan todas las propiedades benéficas que se les atribuyen, por ello es que se verificó la cantidad de células que sobreviven en temperaturas de almacenamiento de -10 a 10°C (congelación), comparándola con los valores obtenidos en el recuento inicial.

Para todos los días de muestreo se empleó el siguiente procedimiento:

- Pesar asépticamente 25 g de la muestra en bolsa estéril.
- Adicionar 225mL de agua peptona estéril y mezclar en stomacher durante 1 minuto a 260 rpm.
- Transferir asépticamente la mezcla homogenizada a un recipiente estéril de boca ancha con tapón de rosca.
- Realizar diluciones seriada de modo de llegar a  $10^{-6}$  de las muestras que proceden del lote 1 y a  $10^{-5}$  de las muestras que proceden del lote 2.
- De la última dilución inocular por duplicado alícuotas de 1.0mL y 0.1mL en placas de Petri estériles.
- Adicionar 20mL de Agar MRS a cada placa y mezclar en forma de ocho.
- Incubar a 30-37°C de 48 a 72 horas en condiciones de aerobiosis.

-Realizar observación Macroscópicas de colonias típicas de los microorganismos probióticos.

-Realizar los cálculos necesarios para determinar la cantidad de microorganismos presentes en la muestra.

#### **4.5 METODO ESTADISTICO.** <sup>(6)</sup>

Se planteó la hipótesis de trabajo, para realizar un Análisis de Varianza (ANOVA), con el objetivo de corroborar si existen diferencias significativas entre los resultados del recuento de microorganismo en cada lote fabricado de helado con respecto el recuento inicial de la mezcla de probióticos (Probio Tec®).

##### **4.5.1 HIPOTESIS**

###### **Hipótesis Nula:**

No hay una diferencia significativa en los resultados del recuento de microorganismo en cada lote fabricado de helado con respecto el recuento inicial de la mezcla de probióticos (Probio Tec®).

**CAPITULO V**  
**RESULTADOS Y DISCUSION DE RESULTADOS**

## 5.0 RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

### 5.1 Implementación del proceso de elaboración de dos lotes de helado a escala de laboratorio. (Ver Anexo N°2)

Se realizó el proceso de elaboración de helado paso a paso. (Ver Anexo N°12)



Figura N°1: Mezcla de Probióticos (Probio Tec®) utilizados en el proceso de elaboración de helado en escala de laboratorio.



**ENSAYO N°1**

**ENSAYO N°2**

**PRODUCTO FINAL**

Figura N°2: Resultados en los Ensayos realizados hasta obtener un producto con textura cremosa.



Figura N°3: Características Generales y Sensoriales presente en cada ensayo.

#### **-Ensayo N° 1**

En el primer ensayo se obtuvo sabor y olor característico agradable, color aceptable, textura y apariencia no aceptable debido a que la materia prima emulsificante no se logró incorporar en el proceso de elaboración, presentando una apariencia y textura compacta poco agradable; pH obtenido 6.9.

#### **-Ensayo N° 2**

En el segundo ensayo se obtuvo sabor y olor característico agradable, color aceptable, textura y apariencia no aceptable, ya que al momento del mezclado, la mezcla se caramelizó debido a una mala agitación, además de que no le logró una incorporación total del emulsificante, presentando partículas extrañas en el producto elaborado; pH obtenido 6.8.

#### **-Producto final**

En ninguno de los ensayos anteriores se logró incorporar completamente el emulsificante, dándoles características negativas al producto razón por la que se optó por utilizar una base cremosa de leche de marca comercial, la cual en su composición detalla materias primas como estabilizantes, emulsificantes y otras útiles en la elaboración de helado, obteniendo como resultado dos productos: Uno con sabor y olor a fresa y otro a café, colores característicos, apariencia



atractiva y uniforme y textura suave y cremosa; pH obtenido: Helado de fresa 5.20; Helado de Café 6.8.

## 5.2 Determinación de la concentración microorganismos probióticos presentes en la mezcla de probióticos Probio-Tec®. (Ver Anexo N°6)

Tabla N° 2: Resultado del recuento obtenido en la determinación de la concentración (unidades formadoras de colonias) de microorganismos probióticos presentes en mezcla (Probio Tec®)

Diluciones	Recuento			
Alícuota 0.1mL	20 UFC	15 UFC	18 UFC	180 UFC/mL
Alícuota 1.0mL	150 UFC	152 UFC	151 UFC	151 UFC/mL
Dilución 10 <sup>-9</sup>				1.7x10 <sup>2</sup> UFC/mL
Dilución 10 <sup>-8</sup>				1.7x10 <sup>3</sup> UFC/mL
Dilución 10 <sup>-7</sup>				1.7x10 <sup>4</sup> UFC/mL
Dilución 10 <sup>-5</sup>				1.7x10 <sup>6</sup> UFC/mL
Dilución 10 <sup>-3</sup>				1.7x10 <sup>8</sup> UFC/mL
Dilución 10 <sup>-1</sup>				1.7x10 <sup>10</sup> UFC/mL
	<b>Mezcla</b>			<b>1.7x10<sup>11</sup> UFC/g</b>

En la Tabla N°2, se observan los resultados de las Unidades Formadoras de Colonias (UFC) presentes en las alícuotas de 0.1mL y 1.0mL de la última dilución (10<sup>-9</sup>), después de haber incubado por 72 horas de 30-37°C, dando un resultado en esa dilución una concentración de 1.7x10<sup>2</sup> UFC/mL y mediante cálculos con la formula  $C_1V_1=C_2V_2$  o el Factor de Dilución (Ver Anexo N°13) se obtuvo la concentración de probióticos presentes en la Mezcla (Probio Tec®), siendo un resultado final de 1.7x10<sup>11</sup> UFC/g , además se puede observar macroscópicamente las diferentes morfologías de los microorganismos que detalla la mezcla (Ver Anexo N°14)

### 5.3 Estandarización de la mezcla Probio-Tec® a concentraciones de $10^6$ UFC/g, $10^7$ UFC/g, $10^9$ UFC/g y $10^{10}$ UFC/g. (Ver Anexo N°7 y N°8)

#### 5.3.1 Recuento inicial en soluciones estandarizadas $10^6$ UFC/g y $10^7$ UFC/g (Ver Anexo N°10 y N°15)

Tabla N°3: Resultado del recuento obtenido en cada suspensión estandarizada.

Recuento en Estandarización $10^7$		UFC/mL		
Alícuota 0.1mL	12	13	13	130
Alícuota 1.0mL	101	145	123	123
Dilución $10^{-5}$	-----	-----	-----	$1.3 \times 10^2$
Dilución $10^{-4}$	-----	-----	-----	$1.3 \times 10^3$
Dilución $10^{-2}$	-----	-----	-----	$1.3 \times 10^5$
En la Suspensión	-----	-----	-----	<b><math>1.3 \times 10^7</math> UFC/mL</b>
Recuento en Estandarización $10^6$		UFC/mL		
Alícuota 0.1mL	13	8	11	110
Alícuota 1.0mL	96	107	102	102
Dilución $10^{-4}$	-----	-----	-----	$1.1 \times 10^2$
Dilución $10^{-2}$	-----	-----	-----	$1.1 \times 10^4$
En la Suspensión	-----	-----	-----	<b><math>1.1 \times 10^6</math> UFC/mL</b>

En la Tabla N°3, se observan los resultados (Los cálculos se realizaron de igual forma como los reportados en la Tabla N°2) del recuento inicial de los microorganismos probióticos presentes en la mezcla después de haber incubado de 30-37°C por 72 horas, obteniendo los valores  $1.3 \times 10^7$  UFC/mL para la suspensión  $10^7$  y  $1.1 \times 10^6$  UFC/mL para la suspensión  $10^6$ , estos valores son llamados valores de referencia, puesto que se tomaron en cuenta para la posterior comparación con los valores de recuento de viabilidad obtenido en cada día de muestreo. También con estos valores se demuestra que los microorganismos probióticos realmente están vivos y se pueden recuperar con facilidad de un cultivo liofilizado.

#### 5.4 Evaluación de la viabilidad de la mezcla de probióticos en los dos lotes del helado a temperatura de almacenamiento de -10 a 10°C, mediante recuentos en placa a los 0, 5, 10, 15 y 20 días.

A continuación se presentan los resultados del recuento de viabilidad obtenidos en cada día de muestreo después de haber incubado por 72 horas de 30-37°C en condiciones aeróbicas.

Tabla N° 4: Recuento de viabilidad obtenido en cada día de muestreo.

Días	Helado 10 <sup>7</sup> (Lote 1)	UFC/g				Helado 10 <sup>6</sup> (Lote 2)	UFC/g			
0	Alícuota 0.1mL	2	2	2	20	Alícuota 0.1mL	2	2	2	20
	Alícuota 1-0mL	5	26	16	16	Alícuota 1.0mL	2	3	3	3
	Dilución 10 <sup>-6</sup>				1.8x10 <sup>1</sup>	Dilución 10 <sup>-5</sup>				1.2x10 <sup>1</sup>
	Dilución 10 <sup>-5</sup>				1.8x10 <sup>2</sup>	Dilución 10 <sup>-3</sup>				1.2x10 <sup>3</sup>
	Dilución 10 <sup>-3</sup>				1.8x10 <sup>4</sup>	Dilución 10 <sup>-1</sup>				1.2x10 <sup>5</sup>
	Dilución 10 <sup>-1</sup>				1.8x10 <sup>6</sup>	Helado (Café)				1.2x10 <sup>6</sup>
	Helado (Fresa)				1.8x10 <sup>7</sup>					
5	Alícuota 0.1mL	10	2	6	60	Alícuota 0.1mL	6	6	6	60
	Alícuota 1-0mL	20	35	28	28	Alícuota 1.0mL	12	22	17	17
	Dilución 10 <sup>-6</sup>				4.4x10 <sup>1</sup>	Dilución 10 <sup>-5</sup>				3.9x10 <sup>1</sup>
	Dilución 10 <sup>-5</sup>				4.4x10 <sup>2</sup>	Dilución 10 <sup>-3</sup>				3.9x10 <sup>3</sup>
	Dilución 10 <sup>-3</sup>				4.4x10 <sup>4</sup>	Dilución 10 <sup>-1</sup>				3.9x10 <sup>5</sup>
	Dilución 10 <sup>-1</sup>				4.4x10 <sup>6</sup>	Helado (Café)				3.9x10 <sup>6</sup>
	Helado (Fresa)				4.4x10 <sup>7</sup>					
10	Alícuota 0.1mL	7	4	6	60	Alícuota 0.1mL	8	3	6	60
	Alícuota 1-0mL	12	10	11	11	Alícuota 1.0mL	13	14	14	14
	Dilución 10 <sup>-6</sup>				3.6x10 <sup>1</sup>	Dilución 10 <sup>-5</sup>				3.7x10 <sup>1</sup>
	Dilución 10 <sup>-5</sup>				3.6x10 <sup>2</sup>	Dilución 10 <sup>-3</sup>				3.7x10 <sup>3</sup>
	Dilución 10 <sup>-3</sup>				3.6x10 <sup>4</sup>	Dilución 10 <sup>-1</sup>				3.7x10 <sup>5</sup>
	Dilución 10 <sup>-1</sup>				3.6x10 <sup>6</sup>	Helado (Café)				3.7x10 <sup>6</sup>
	Helado (Fresa)				3.6x10 <sup>7</sup>					
15	Alícuota 0.1mL	1	1	1.0	10	Alícuota 0.1mL	0	2	1	10
	Alícuota 1-0mL	2	2	2	2	Alícuota 1.0mL	1	1	1	1
	Dilución 10 <sup>-6</sup>				6.0x10 <sup>0</sup>	Dilución 10 <sup>-5</sup>				5.5x10 <sup>0</sup>
	Dilución 10 <sup>-5</sup>				6.0x10 <sup>1</sup>	Dilución 10 <sup>-3</sup>				5.5x10 <sup>2</sup>
	Dilución 10 <sup>-3</sup>				6.0x10 <sup>3</sup>	Dilución 10 <sup>-1</sup>				5.5x10 <sup>4</sup>
	Dilución 10 <sup>-1</sup>				6.0x10 <sup>5</sup>	Helado (Café)				5.5x10 <sup>5</sup>
	Helado (Fresa)				6.0x10 <sup>6</sup>					

Tabla N° 4. Continuación.

	Alícuota 0.1mL	0	1	0.5	5	Alícuota 0.1mL	0	0	0	0
	Alícuota 1-0mL	2	3	3	3	Alícuota 1.0mL	2	3	3	3
	Dilución 10 <sup>-6</sup>				4.0x10 <sup>0</sup>	Dilución 10 <sup>-5</sup>				1.5x10 <sup>0</sup>
20	Dilución 10 <sup>-5</sup>				4.0x10 <sup>1</sup>	Dilución 10 <sup>-3</sup>				1.5x10 <sup>2</sup>
	Dilución 10 <sup>-3</sup>				4.0x10 <sup>3</sup>	Dilución 10 <sup>-1</sup>				1.5x10 <sup>4</sup>
	Dilución 10 <sup>-1</sup>				4.0x10 <sup>5</sup>	Helado (Café)				1.5x10 <sup>5</sup>
	Helado (Fresa)				4.0x10 <sup>6</sup>					

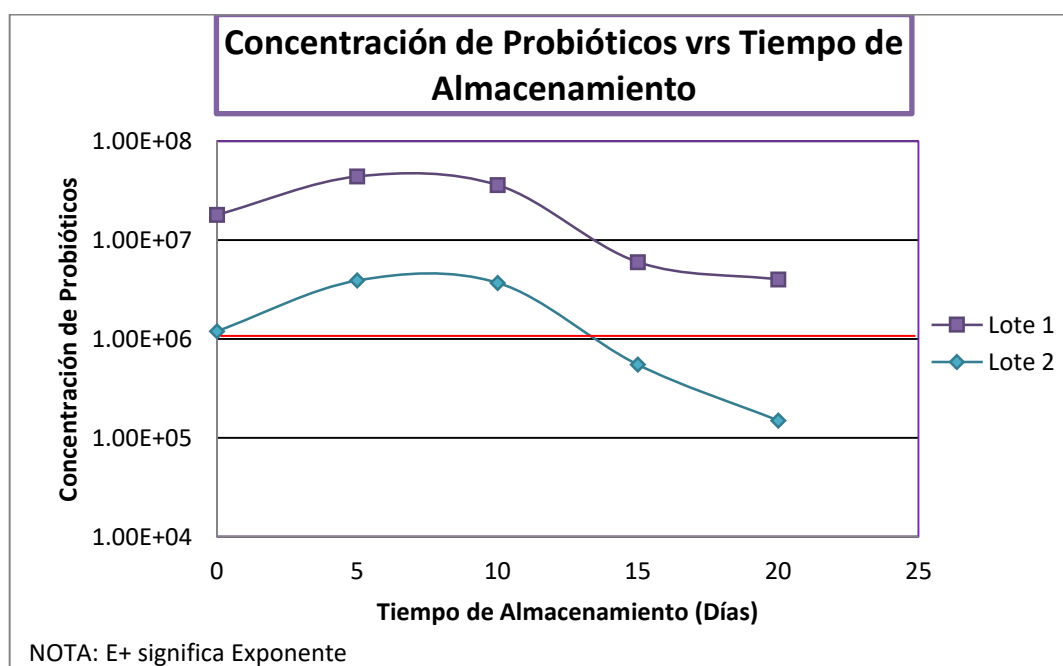


Figura N°4: Gráfico del Recuento de Vialidad obtenido tanto para Helados del lote 1 y como del lote 2, en el transcurso de 20 días de almacenamiento a temperaturas de -10 a 10 °C.

En la tabla N° 4, se observan los resultados (Los cálculos se realizaron de igual forma como los reportados en la Tabla N°2) del recuento de viabilidad de microorganismos probióticos presentes en la mezcla para cada lote de helado fabricado durante el periodo de almacenamiento, después de haber incubado

por 72 horas a 30-37°C. Se puede visualizar que a partir del día 15 los microorganismos en ambos lotes disminuyen un logaritmo en su crecimiento.

La disminución del crecimiento puede ser debido al efecto del congelamiento ya que se produce un estrés por la formación de los cristales de hielo, al efecto del batido o esponjamiento, ya que durante la producción de helado se promueve un esponjamiento mediante la adición de aire por batido. Esta operación mejora la textura del producto, previniendo el endurecimiento excesivo y el derretido en la boca, pero al mismo tiempo, incorpora una considerable cantidad de oxígeno, tóxico para los probióticos o también al efecto del tiempo de congelamiento, como se puede observar en (Figura N°4), después del recuento del día 0 en ambos lotes hay una fase de crecimiento, en la cual el microorganismo ya se había adaptado a la matriz alimentaria, sin embargo a partir del día 10 los microorganismos van disminuyendo paulatinamente hasta que disminuyen su concentración esperada a partir del día 15.

Aunque se observe la disminución en su crecimiento, el helado sabor a café (Lote 2) hasta aproximadamente el día 14 (Figura N°4) aún se considera un alimento funcional, porque está por arriba de la concentración recomendada por la FAO/OMS (mayor de  $1.0 \times 10^6$  UFC/g), del día 15 al día 20 es más marcada la disminución del crecimiento con respecto al lote 1, puesto que el pH en este producto quedó demasiado alto, proporcionándole un ambiente aún más desfavorable para los microorganismos. Por otro lado el helado sabor fresa (Lote 1) después de finalizado el periodo de almacenamiento, se considera alimento funcional, puesto que aunque se note la disminución de 1 logaritmo a partir del día 15 (Figura N°4), aún se mantiene arriba de  $1.0 \times 10^6$  UFC/g, ya que fue inoculado con mayor concentración de probióticos, según su formulación.

## **5.5 Determinación de los cambios de pH y las características sensoriales**

**en los dos lotes del helado a temperatura de almacenamiento de -10 a 10°C, con frecuencias de 0, 5, 10, 15 y 20 días.**

En cada día de muestreo se realizó un control de los cambios que pudieran existir en las características Sensoriales del producto en el periodo de almacenamiento y monitoreo en las mediciones de pH. Además se llevó un control de Presencia o Ausencia al inicio y al final del período de almacenamiento (día 0 y día 20) de microorganismos como: *Escherichia coli*, *Salmonella sp.* y *Staphylococcus aureus.*, siendo estas las determinaciones microbiológicas que exige la Norma Salvadoreña Obligatoria (NSO 67.01.11:04) para Helados y mezclas de Helados.

(26)

Tabla N° 5: Control de las características sensoriales obtenidas en cada día de muestreo para cada lote (helado sabor fresa y helado sabor café)

Días	Color		Olor	Sabor		Textura	Apariencia
0	Rosa	Café	Característico	Fresa	Café	Cremosa	Uniforme
5	Rosa	Café	Característico	Fresa	Café	Cremosa	Uniforme
10	Rosa	Café	Característico	Fresa	Café	Cremosa	Uniforme
15	Rosa	Café	Característico	Fresa	Café	Cremosa	Uniforme
20	Rosa	Café	Característico	Fresa	Café	Cremosa	Uniforme

Tabla N° 6 Valores de pH obtenidos en las mediciones de cada día de muestreo

Helado 10 <sup>7</sup> (Lote1)				
Días	Medición de pH			Promedio
0	5.2	5.1	5.2	5.17
5	5.15	5.17	5.16	5.16
10	5.14	5.14	5.13	5.14
15	5.1	5.08	5.1	5.09
20	5.05	5.06	5.06	5.06
Helado 10 <sup>6</sup> (Lote2)				
Días	Medición de pH			Promedio
0	6.8	6.81	6.8	6.80
5	6.75	6.76	6.73	6.75
10	6.73	6.75	6.74	6.74
15	6.73	6.75	6.72	6.73
20	6.71	6.7	6.71	6.71

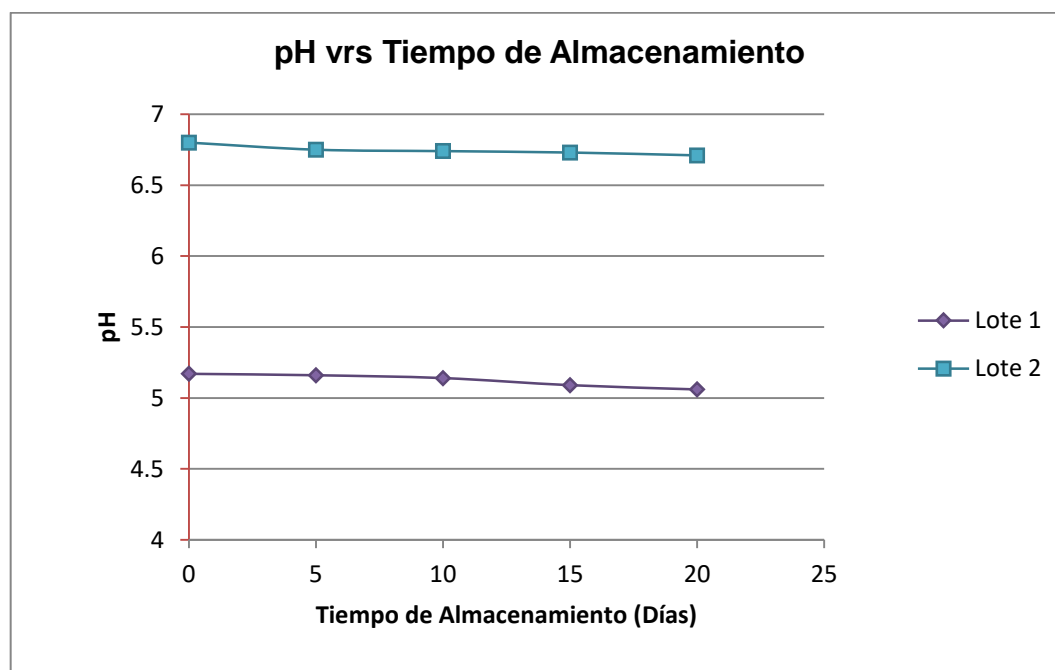








Figura N°5: Gráfico del comportamiento de pH en cada lote de helado fabricado con respecto al periodo de almacenamiento

En la Tabla N°5, se observa que a medida transcurre el periodo de almacenamiento las características sensoriales se mantienen iguales, dando como resultado una buena aceptación del producto. Y en la Tabla N°6 y Figura N°5, se puede observar que a medida aumenta el periodo de almacenamiento el pH en los productos va disminuyendo lentamente, esto se debe a que los microorganismos probióticos son productores de ácido láctico, también se observa que el producto del lote 2 desde el principio refleja un pH de 5.16, puesto que en la formulación el saborizante natural utilizado fue un almíbar de fresas, y la acidez de este también se ve reflejada en el valor de pH.

Tabla N°7: Control de *Escherichia coli*, *Salmonella sp.* y *Staphylococcus aureus* en helados al inicio y al final del periodo de almacenamiento.

Microorganismo	Día 0	Día 20
<i>Escherichia coli</i>	Ausencia 	Ausencia 
<i>Salmonella sp.</i>	Ausencia 	Ausencia 
<i>Staphylococcus aureus</i>	Ausencia 	Ausencia 



El proceso de elaboración de helado a escala de laboratorio se llevó a cabo bajo las Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) desde la recepción de materias primas, durante el desarrollo del procedimiento para la elaboración del producto hasta su envasado y almacenamiento, con el objetivo de ofrecer un alimento inocuo que no vaya a provocar efectos negativos en el consumidor, por ello en la Tabla N°7 se refleja el resultado del monitoreo de *E. coli*, *Salmonella sp* y *S aureus*, que la NSO 67.01.11:04 exige, dando certeza que los productos han sido elaborado bajo las mejores condiciones posibles.

#### **5.6 Comparación del recuento de viabilidad de los probióticos en el producto elaborado con el recuento inicial de la mezcla de Probióticos (Probio-Tec®). aplicando el método estadístico Análisis De Varianza (ANOVA).**

Se realizó el análisis de varianza (ANOVA), con el objetivo de corroborar si existen diferencias significativas entre los resultados del recuento de microorganismo en cada lote fabricado de helado con respecto el recuento inicial de la mezcla de probióticos (Probio Tec®).

Para ello se planteó la siguiente hipótesis:

Hipótesis Nula:

No hay una diferencia significativa en los resultados del recuento de microorganismo en cada lote fabricado de helado con respecto el recuento inicial de la mezcla de probióticos (Probio Tec®).

El tratamiento de datos se hizo mediante el Programa de Excel y los resultados fueron los siguientes:

Tabla N° 8: Resultados del recuento inicial (valor de referencia) y del recuento de viabilidad en cada día de muestreo de cada lote.

Día	Rec. del Std. (Lote 1)	Helado 10 <sup>7</sup> (Lote 1)	Rec. del Std. (Lote 2)	Helado 10 <sup>6</sup> (Lote 2)
0	1.30x10 <sup>7</sup>	1.80x10 <sup>7</sup>	1.10x10 <sup>6</sup>	1.20x10 <sup>6</sup>
5	1.30x10 <sup>7</sup>	4.40x10 <sup>7</sup>	1.10x10 <sup>6</sup>	3.90x10 <sup>6</sup>
10	1.30x10 <sup>7</sup>	3.60x10 <sup>7</sup>	1.10x10 <sup>6</sup>	3.70x10 <sup>6</sup>
15	1.30x10 <sup>7</sup>	6.00x10 <sup>6</sup>	1.10x10 <sup>6</sup>	5.50x10 <sup>5</sup>
20	1.30x10 <sup>7</sup>	4.00x10 <sup>6</sup>	1.10x10 <sup>6</sup>	1.50x10 <sup>5</sup>

Tabla N° 9: ANOVA para el recuento de viabilidad del lote 1 (helado 10<sup>7</sup>UFC/g) comparado con su respectivo estándar.

ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	1.805x10 <sup>14</sup>	1	1.805x10 <sup>14</sup>	0.8602	0.38946617	5.987377607
Dentro de los grupos	1.259x10 <sup>15</sup>	6	2.09833x10 <sup>14</sup>			
Total	1.4395x10 <sup>15</sup>	7				

Tabla N° 10: ANOVA para el recuento de viabilidad del lote 2 (helado 10<sup>6</sup>UFC/g) comparado con su respectivo estándar.

ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	1.90125x10 <sup>12</sup>	1	1.90125x10 <sup>12</sup>	0.9504	0.367261039	5.987377607
Dentro de los grupos	1.20025x10 <sup>13</sup>	6	2.00042x10 <sup>12</sup>			
Total	1.39038x10 <sup>13</sup>	7				

En esta investigación se utilizó el método estadístico Análisis de Varianza (ANOVA), puesto es un método para comparar dos o más medias. Se realizó un análisis de varianza de un factor, debido a que nuestra variable es la

concentración ya sea en el recuento inicial de la mezcla de probióticos, como en el recuento de viabilidad de cada muestreo.

Se utilizó un nivel de confianza del 95% y un nivel de significancia del 5% ( $\alpha=0.05$ ), de todos los resultados que reporta el programa de Excel para ambos lotes (Tabla N°9 y N°10) nos centramos en el Valor de la Probabilidad (“P Valor”), los cuales son 0.38946617 para el Lote 1 y 0.367261039 para el Lote 2.

Como el nivel de significancia es de 0.05 y el “P valor” es mayor en ambos lotes, se Acepta la hipótesis nula la cual dice: “No hay una diferencia significativa en los resultados del recuento de microorganismo en cada lote fabricado de helado con respecto el recuento inicial de la mezcla de probióticos (Probio Tec®).” Con un 95% de confiabilidad.

**CAPITULO VI**  
**CONCLUSIONES**

## 6.0 CONCLUSIONES

1. La mezcla de probióticos en el helado sabor fresa reporta una excelente viabilidad durante todo el periodo de almacenamiento de 20 días y el helado sabor café reporta su viabilidad requerida hasta el día 15, por lo que los productos elaborados se consideran alimentos funcionales ya que se recupera una cantidad de probióticos mayor a  $1 \times 10^6$  UFC/g, concentración mínima exigida por la FAO/OMS.
2. La acidez provocada por la adición de los microorganismos probióticos durante el periodo de almacenamiento, no altera las características sensoriales del helado.
3. El helado elaborado ha demostrado ser una excelente matriz alimentaria para la administración de cepas probióticas, con poblaciones suficientes para clasificarse como un alimento funcional de gran aceptación, para todo tipo de público y dirigido a mejorar la salud de la población.
4. La orientación de las investigaciones futuras estudian cada vez más la ciencia de los helados, con el objetivo de que las poblaciones consuman alimentos más sanos y mantengan una vida saludable.
5. En base al efecto que ejercen sobre la salud y a la resistencia que presentan a diferentes condiciones de estrés a los que son sometidos durante la elaboración y vida de anaquel de los helados, es de suma importancia elegir el tipo de cepas de microorganismos probióticos a incorporar en el proceso.
6. Al aplicar el método estadístico ANOVA, no existen diferencias significativas en los resultados del recuento de microorganismo en cada lote fabricado de helado con respecto el recuento inicial de la mezcla de probióticos (Probio Tec®).

**CAPITULO VII**  
**RECOMENDACIONES**

## 7.0 RECOMENDACIONES

1. En estudios posteriores determinar las cepas de microorganismos probióticos sobrevivientes en el producto después de 15 y 20 días de almacenamiento de todas las contenidas en la mezcla probiótica.
2. Seleccionar el tipo de cepas a incorporar en el helado, tanto en base al efecto que ejercen sobre la salud, como a su tolerancia o resistencia a diferentes condiciones de estrés a los que son sometidos durante el proceso de elaboración y durante el periodo de almacenamiento de los helados.
3. Proteger los probióticos mediante una técnica de encapsulamiento para obtener una mejor viabilidad de los microorganismos en los helados.
4. De las soluciones estandarizadas de la mezcla de probióticos, inocular concentraciones mayores a  $10^9$  UFC/mL al helado, para asegurar un mayor recuento de viabilidad de los microorganismos, y la matriz alimentaria sea considerada un alimento funcional.
5. Adicionar prebióticos, promotores del crecimiento y crioprotectores en la formulación del producto, con el objetivo de mejorar la sobrevivencia de los microorganismos probióticos en los helados.
6. Realizar ajustes adecuados a la formulación y al proceso, para garantizar la sobrevivencia de los probióticos en el helado y la vida de anaquel por un tiempo de 3 meses.
7. En estudios posteriores agregar otros saborizantes naturales y/o artificiales al helado con el objetivo de obtener una amplia gama de sabores a disposición de todo tipo de consumidor.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Alamprese, C., Foschino, R., Rossi, M., Pompei, C. y Savani, L. Survival of *Lactobacillus johnsonii* La1 and influence of its addition in retail-manufactured ice cream produced with different sugar and fat concentrations. *International Dairy Journal*. 2002. 12(2-3): 201-208.
2. Alteca. 2006. Utilización de colorantes naturales en la fabricación de helados.
3. Andrade Bracedo M. J. Evaluación de la Viabilidad del uso de *Lactobacillus acidophilus* LA-5 en la elaboración de Helados. Universidad de Azuay, Cuenca, Ecuador, 2003, p-18-20.
4. Axelsson, L. Lactic Acid Bacteria En: Salmminen S, Editor. *Microbiology and Functional Aspects*. New York: Marcel Dekker;1998.p. 1-72.
5. Barefoot, S. F. and Klaenhammer, T. R. Purification and characterization of the *Lactobacillus acidophilus* bacteriocin lactacin B. *Appl. Environ Microbiol*. 1984. 49: 328-334.
6. Bonilla, G. Estadística I (1991). Elementos de estadística descriptiva y probabilidad. 4ª ed. UCA editores. San Salvador, El Salvador.
7. Cabezón Palominos, Patricia. (2010) Adición de cepas probióticas en leche en polvo 26% MG. Tesis de Magíster, Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias, Escuela de Graduados, Valdivia, Chile.
8. Caicedo Cipagauta, Y. M. Estudio de la viabilidad de la incorporación de bacterias probióticas micro encapsuladas en helados. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia. 2010, p. 26, 42.



9. Campos J. A. Cultivos Probióticos y Protectores, Propiedades Funcionales (Nutracéticas) de Valor Agregado en los Derivados Lácteos y Cárnicos Mexicanos. Jun/Jul 26-37.2002.
10. CENAP, Centro Nacional de Productividad. "Seminario Control Higiénico y Sanitario en Plantas procesadoras de Alimentos. San Salvador, 1990.
11. Champagne, C. P. y Gardner, N. J. Challenges in the addition of probiotic cultures to foods. *Critical Reviews of Food Science and Nutrition*. 2005 C45:61–84.
12. Collado Amores, M.C (2004), Caracterización de cepas del género *Bifidobacterium* con carácter probiótico. Tesis doctorado no publicada, Universidad politécnica de Valencia, escuela técnica superior de Ingenieros Agrónomos, España. [Accedido el 10 de marzo de 2014]. Disponible en: <http://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/1907/tesisUPV2209.pdf?sequence=1>
13. Conde M. C., Hernández S. B. y Galán M. F. Empresa productora de helados sin lactosa. BiKarCaFri y Asociados S.A. de C.V. 2006. 98 p
14. Cruz, A.G., Antunes, A.E.C., Sousa, A.L. C.O.P., Faria, J.A.F. y Saad, S. M. I.. Ice-cream as a probiotic food carrier. *Food Research International*. 2009 42(9): 1233-1239.
15. Di Criscio, T., Fratianni, A., Mignogna, R., Cinquanta, L., Coppola, R., Sorrentino, E. y Panfili, G. Production of functional probiotic, prebiotic, and synbiotic ice creams. *Journal of Dairy Science*. 2010. 93(10): 4555-4564.

16. Eisner, M. D., Wildmoser, H. y Windhab, E. J. Air cell microstructuring in a high viscous ice cream matrix. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering*, 2005 Aspects. 263(1-3): 390-399.
17. FAO/ OMS. Consulta de Expertos FAO/OMS sobre Evaluación de las Propiedades Saludables y Nutricionales de los Probióticos en los Alimentos, 2001.p.2.
18. Food and Drug Administration FDA. Bacteriological Analytical Manual (BAM).1998.8ed.E.E.U.U. Recuperado de: <http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/default.html>.
19. Fuller R., Probiotics 2. Applications and practical aspects, IX edition, United Kingdom: Chapman & Hall, 1997 paginas: 1-3
20. Fuller, R. (1994) History and development of probiotics. Christian Hansen, Denmark.
21. Galán Méndez, IQ. F. Formulación, Caracterización físico-química y sensorial de un helado funcional elaborado a partir de leche de cabra. Universidad Veracruzana. Veracruz, México. 2010.
22. Gilliland's, C R Nelson. Assimilation of cholesterol by *Lactobacillus acidophilus*. *Applied and Environmental Microbiology*.1985;49:377-381.
23. Goff H. D. Ice Cream and Frozen Desserts. Department of Food Science. University of Guelph. 2006, p. 154:1-48.
24. Gonzáles-Martínez y otros. BACTERIOCINAS DE PROBIÓTICOS. Facultad de Salud Pública y Nutrición, 2003, Vol. 4 N°2.

25. Güven, M. y Karaca, O.B. The effects of varying sugar content and fruit concentration on the physical properties of vanilla and fruit ice-cream-type frozen yogurts. *International Journal of Dairy Technology*. 2002. 55(1): 27-31
26. HELADOS Y MEZCLAS DE HELADOS, ESPECIFICACIONES. (primera actualización). Norma Salvadoreña Obligatoria NSO 67.01.11:04 I.C.S 67.100
27. Jayamanne, V. S. y Adams, M. R. Determination of survival, identity and stress resistance of probiotic bifidobacteria in bio-yoghurts. *Letters in Applied Microbiology*. 2006 42(3): 189-194.
28. Mohammadi, R., Mortazavian, A., Khosrokhavar, R. y da Cruz, A. Probiotic ice cream: viability of probiotic bacteria and sensory properties. *Annals of Microbiology*. 2011 61(3): 411-424.
29. Productos lácteos. Yogurt especificaciones. (primera actualización). Norma Salvadoreña Obligatoria NSO 67.01.10:08 Diario Oficial, N.º 384 (28/07/2009).
30. Ross, R.P., Desmond, C., Fitzgerald, G.F. y Stanton, C. Overcoming the technological hurdles in the development of probiotic foods. *Journal of Applied Microbiology*. 2005. 98(6): 1410-1417.
31. Saavedra JM. Microbes to fight microbes: A not so novel approach to controlling diarrheal disease. *J. Pediatr Gastroenterol Nutr* 1995; 1995; 21: 125-129
32. Saavedra, J. M. Clinical applications of probiotic agents. *Amer. J. Clin. Nutr.* 2001; 29 (4): 1147-1151.

33. Salcedo Hernández, R. Bautista J., Vázquez Acosta, M. H. Barbosa corona, J. E. (2007) Probioticos y Conservadores Naturales de Alimentos. DIALNET OAI Articles. Recuperado de [http://biblioteca.uniwersaria.net/htm\\_bura/ficha/parans/tittle/probioticos-conservadores-naturales-alimentos/id/44756650.html](http://biblioteca.uniwersaria.net/htm_bura/ficha/parans/tittle/probioticos-conservadores-naturales-alimentos/id/44756650.html).
34. Salminen, S. and Von Wrigh, A. Lactic Acid Bacteria. Marcel Dekker: Inc New York; 1993.
35. Samaniego F. Lactobacillus spp.: Importantes promotores de actividad probiótica, antimicrobiana y bioconservadora. Centro de estudios Biotecnologicos. Facultad de Agronomía. Universidad de Matanzas, Cuba. P 5,6.
36. Sanders, M.E. (2008). Products with probiotics, [en línea]. Disponible en: <<http://www.usprobiotics.org>>. [Fecha de acceso 10 de junio, 2012]
37. Soukoulis, C., Lyroni, E. y Tzia, C. Sensory profiling and hedonic judgement of probiotic ice cream as a function of hydrocolloids, yogurt and milk fat content. LWT - Food Science and Technology. 2010. 43(9): 1351-1358.
38. Tait, M. J., Finney, D. J. y Narhan, S. K. 2003. Ice cream: Dietary importance. En Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition. C, Benjamin (ed.), 2003. p. 3233-3236. Aca-demic Press, Oxford.
39. Talwalkar, A. I. y Kailasapathy, K. A. Effect of microen-capsulation on oxygen toxicity in probiotic bacteria. Australian Journal of Dairy Technology. 2003. C58:36–39.

40. Valderrama J. Información Tecnológica, Centro de Información Tecnológica, vol. 12 No. 6, (año 12, edición 71), La Serena, Chile: Valderrama y Faúndez. (2001), páginas 36-37.
41. Wood, B.J. The lactic acid bacteria in health and disease. London: Elsevier Applied Science; 1992.

**ANEXOS**

ANEXO N°1.

**2 Resumen de eventos de notificación hasta SE 27**

No	Evento	Semana	Acumulado		Diferencia	(%)
		epidemiológica	2017	2018	absoluta	Diferencial para 2018
		27				
1	Infección respiratoria aguda	40,225	1,187,452	994,106	193,346	(-16 )
2	Casos con sospecha de dengue	143	6,220	2,580	3,640	(-59 )
3	Casos con sospecha de chikungunya	8	347	171	176	(-51 )
4	Casos con sospecha de Zika	3	264	184	80	(-30 )
5	Paludismo Confirmado *	0	3	1	2	(-67 )
6	Diarrea y gastroenteritis	7,652	224,792	223,193	1,599	(-1 )
7	Parasitismo intestinal	3,643	96,310	96,072	238	(0 )
8	Conjuntivitis bacteriana aguda	1,069	33,079	30,298	2,781	(-8 )
9	Neumonías	813	20,318	14,871	5,447	(-27 )
10	Mordido por animal trans. de rabia	373	10,877	11,326	449	(4 )

\* Casos importados

Figura N° 6: Boletín Epidemiológico, semana 27, Julio 2018, Ministerio de Salud de El Salvador (MINSAL)

ANEXO N°2.

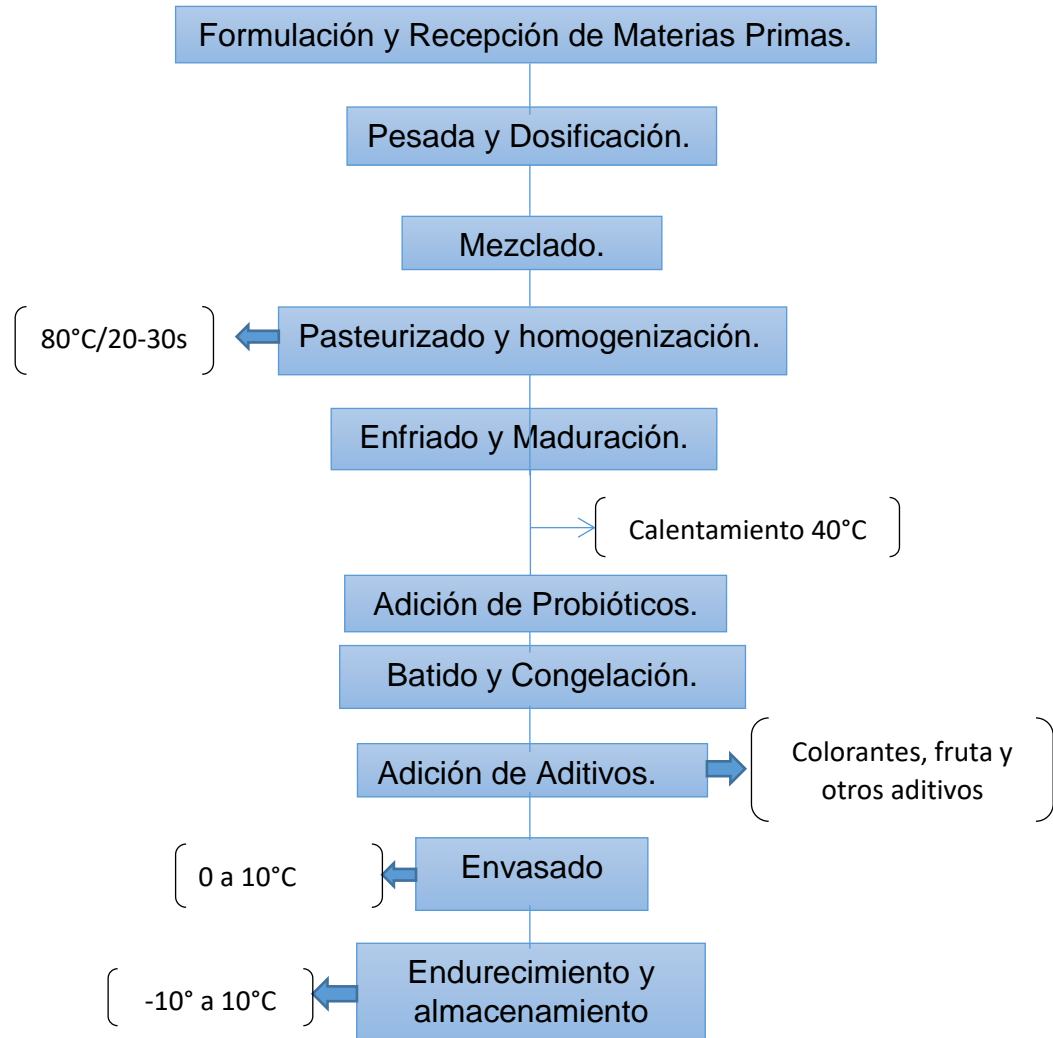


Figura N°7: Esquema del procedimiento para preparación de helado.



### ANEXO N°3.

Cálculos de cantidades para la preparación de 1Kg de helado para la fórmula 1 y 2:

Para Leche Entera Líquida

Lote 1

1 Kg-----100%

X Kg----- 15.9%

X=0.159 Kg de Leche entera líquida

En gramos

$$0.159 \text{ Kg} \times \frac{1000 \text{ g}}{1 \text{ Kg}} = 159.00 \text{ g}$$

Lote 2

1 Kg-----100%

X Kg----- 35.0%

X=0.350 Kg de Leche entera líquida

En gramos

$$0.350 \text{ Kg} \times \frac{1000 \text{ g}}{1 \text{ Kg}} = 350.00 \text{ g}$$

TABLA N°11: FÓRMULAS PARA LA PREPARACIÓN DE HELADO. (26, 21, 5)

<b>Materia Prima</b>	<b>Formula 1 (Lote 1) (1Kg)</b>	<b>Formula 2 (Lote 2) (1Kg)</b>
Base Cremosa de Leche.	500.00 g	500.00 g
Azúcar.	140.00 g	140.00 g
Leche Entera Líquida.	159.00 g	350.00 g
Saborizantes Naturales.	200.00 g de fresas	9.00 g De café
Colorantes.	0.90 g	0.99 g
Probióticos	0.10 g (Equivalente en 1ml de una solución estandarizada a $10^{10}$ UFC/mL)	0.01 g (Equivalente en 1ml de una solución estandarizada a $10^9$ UFC/mL)
Total	1000.0 g	1000.0 g

## ANEXO N°4.



### FD-DVS ABY-3 - Probio-Tec™

#### Información de Producto

<b>Descripción</b>	Cultivo láctico Termófilo Cultivo mezcla de cepas definidas, que contiene <i>Lactobacillus acidophilus</i> LA-5™ y <i>Bifidobacterium</i> BB-12™, <i>Streptococcus thermophilus</i> y <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> . Las cepas probióticas en este cultivo tienen una larga historia de uso seguro. ABY-3 es suministrado en forma de producto granulado liofilizado.	
<b>Aplicación</b>	El cultivo producirá una leche fermentada con alta viscosidad y aroma medio/suave y una baja post-acidificación. ABY-3 es ideal para la elaboración de los siguientes tipos de productos lácteos fermentados: <ul style="list-style-type: none"><li>• Firme</li><li>• Batido</li><li>• Líquido</li></ul>	
<b>Envasado</b>	<b>Tamaño de envase</b>	<b>Número de producto</b>
	10 x 50u	669852
	25 x 200u	666092
	20 x 500u	666091
<b>Disponibilidad:</b>	Los siguientes cultivos ABY están disponibles en forma de cultivos congelados DVS y liofilizados DVS: ABY-1, ABY-2 y ABY-3.	
<b>Almacenamiento y caducidad:</b>	Los cultivos liofilizados deben ser almacenados a -18°C (0°F) o menos. Si los cultivos se almacenan a esta temperatura o inferior, la caducidad es de como mínimo 24 meses. Si los cultivos se almacenan a +5°C (41°F) la caducidad es de como mínimo 6 semanas.	
<b>Modo de empleo</b>	Sacar los cultivos del congelador justo antes de su utilización. <b>NO DESCONGELAR.</b> Limpiar la parte superior del sobre con cloro. Abrir el sobre y añadir los gránulos liofilizados directamente al producto pasteurizado mientras se agita lentamente. Agitar la mezcla durante 10-15 minutos hasta distribuir totalmente.	
<b>Dosis</b>	La dosis recomendada de FD-DVS ABY-3:	

Nivel de inoculación de DVS	Cantidad de leche a inocular	
	1,000 l	5,000 l
500U/2500 l	200U	1000U
500U/5000 l	100U	500U

El beneficio máximo de una dosis de inoculación de 0.02%, sobre la velocidad de acidificación, se obtiene a una temperatura de acidificación de 43°C. Para obtener el recuento de células de BB-12 y LA-5 como se indica en el catálogo técnico Nu-trish , una dosis mínima de inoculación de 0.02% debe ser aplicada.

BSu/ABY-3/B-FD-PI/Marzo 2004/1:2

Figura N°8: Ficha Técnica de la Mezcla de Probióticos (Probio Tec®)

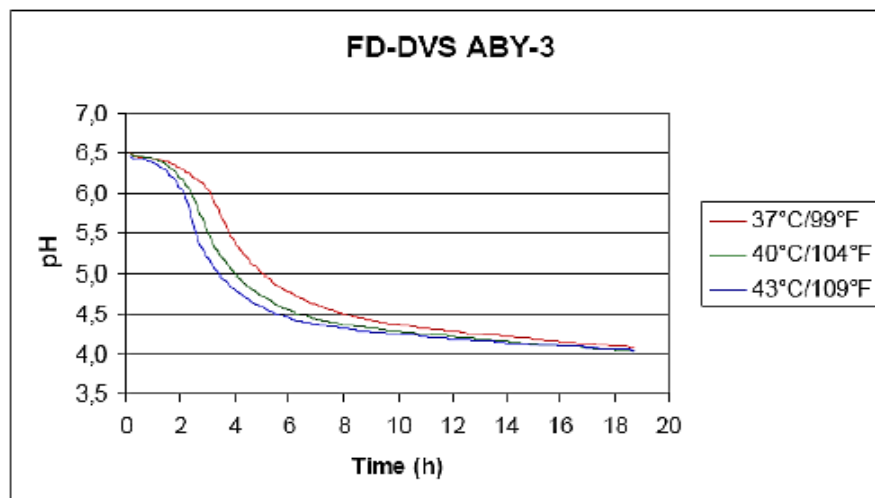
## Continuación ANEXO N°4.

CHR HANSEN

**Certificado Kosher** ABY-3 es un cultivo con aprobación Kosher (Círculo K D) para ser utilizado durante todo el año, excepto en Pascua Judía.

### Información técnica

Figura 1. El efecto de la temperatura sobre la acidificación.



**Condiciones de fermentación:**  
Leche entera + 2% leche desnatada en polvo (85 °C /30 minutos)  
500u/2.500 l. inoculación.

Nota: La exactitud de estas gráficas es relativa y está sujeta a error experimental.

**Servicio Técnico** Las instalaciones de Chr. Hansen distribuidas por todo el mundo y el personal de nuestro centro de tecnología aplicada están a su disposición para proporcionarle ayuda e instrucciones.

### Referencias

Referencias y métodos de análisis están disponibles bajo solicitud.

La información anteriormente mencionada se ofrece exclusivamente a título informativo. Chr. Hansen declina toda responsabilidad por las pérdidas o daños que pudieran derivarse de la aplicación en la práctica de la información facilitada.

BSu/FD-DVS ABY-3 vs1 Marzo 2004/2:2

Figura N°9: Ficha Técnica de la Mezcla de Probióticos (Probio Tec®)

ANEXO N°5.



Figura N°10: Esquema para la lectura de pH.

ANEXO N°6.

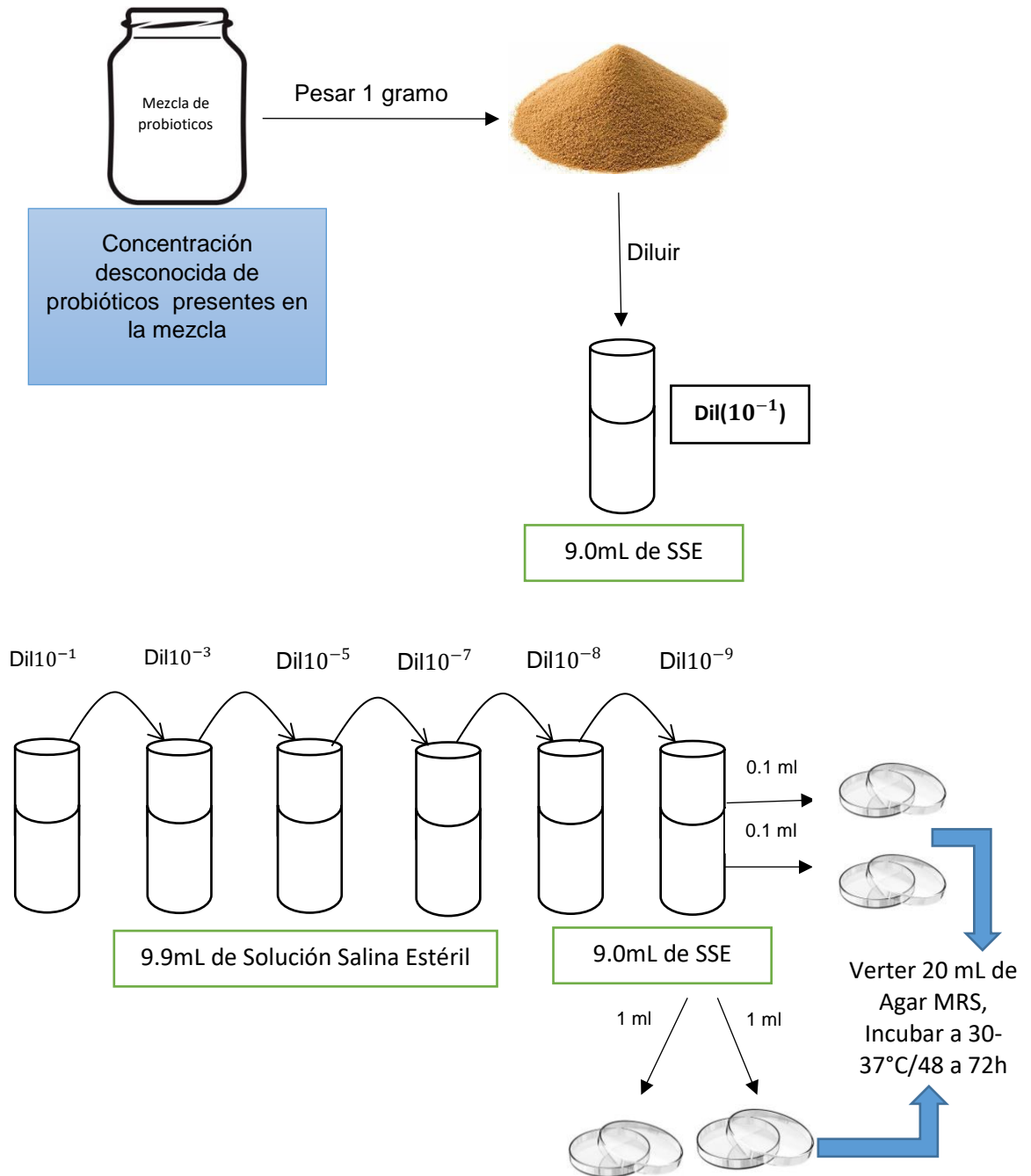


Figura N°11 Esquema para la Determinación de la Concentración de Probióticos presentes en la mezcla (Probio Tec®)

ANEXO N°7.

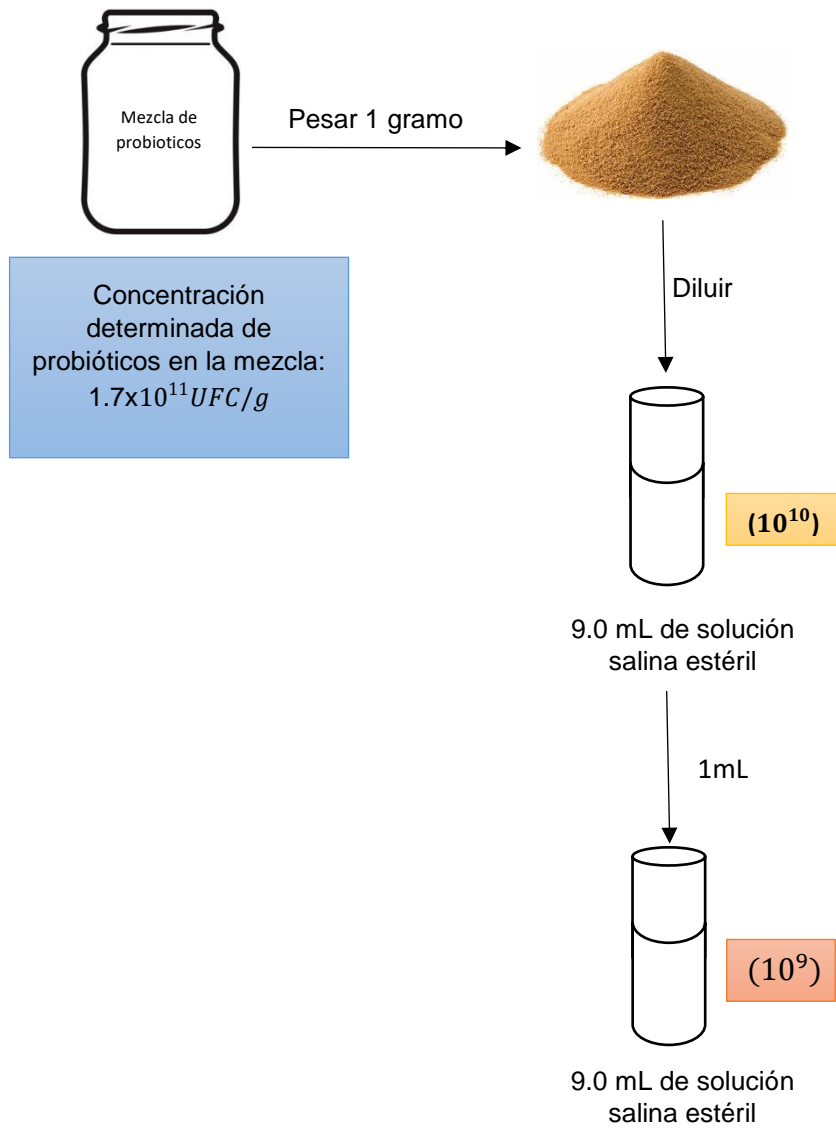


Figura N°12: Esquema de estandarización de la mezcla de probióticos (Probio Tec®) a  $10^{10} \text{ UFC/g}$  y  $10^9 \text{ UFC/g}$

ANEXO N°8.

-Partiendo de la  $10^9$ UFC/g.

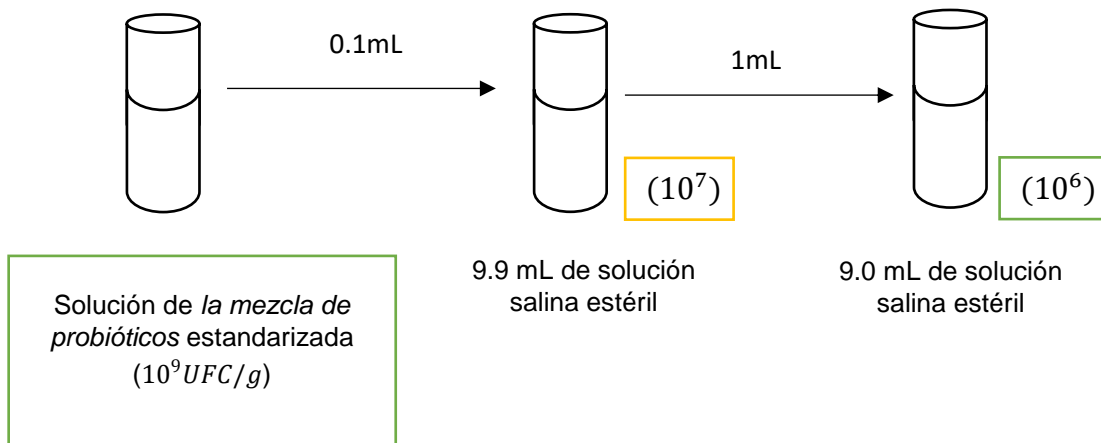
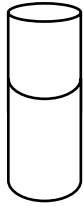
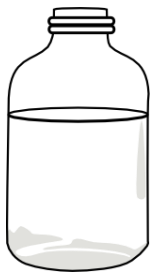
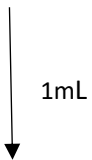


Figura N°13: Esquema de estandarización de la mezcla de probióticos (Probio Tec®) a  $10^7$ UFC/g y  $10^6$ UFC/g para el recuento inicial de microorganismos.

ANEXO N°9.



Solución de la mezcla de probióticos estandarizada ( $10^{10}$ UFC/g)

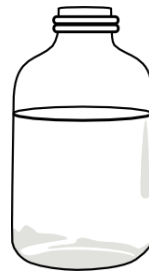
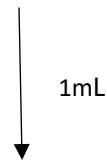


999.0 g de mezcla de helado después de la maduración

Para obtener  $10^7$ UFC/g en el producto elaborado



Solución de la mezcla de probióticos estandarizada ( $10^9$ UFC/g)



999.0 g de mezcla de helado después de la maduración

Para obtener  $10^6$ UFC/g en el producto elaborado

Figura N°14: Esquema de incorporación de la mezcla (Probio Tec®) estandarizada a  $10^{10}$ UFC/g y a  $10^9$ UFC/g, para obtener  $10^7$ UFC/g y  $10^6$ UFC/g respectivamente en el producto de cada lote.



ANEXO N°10.

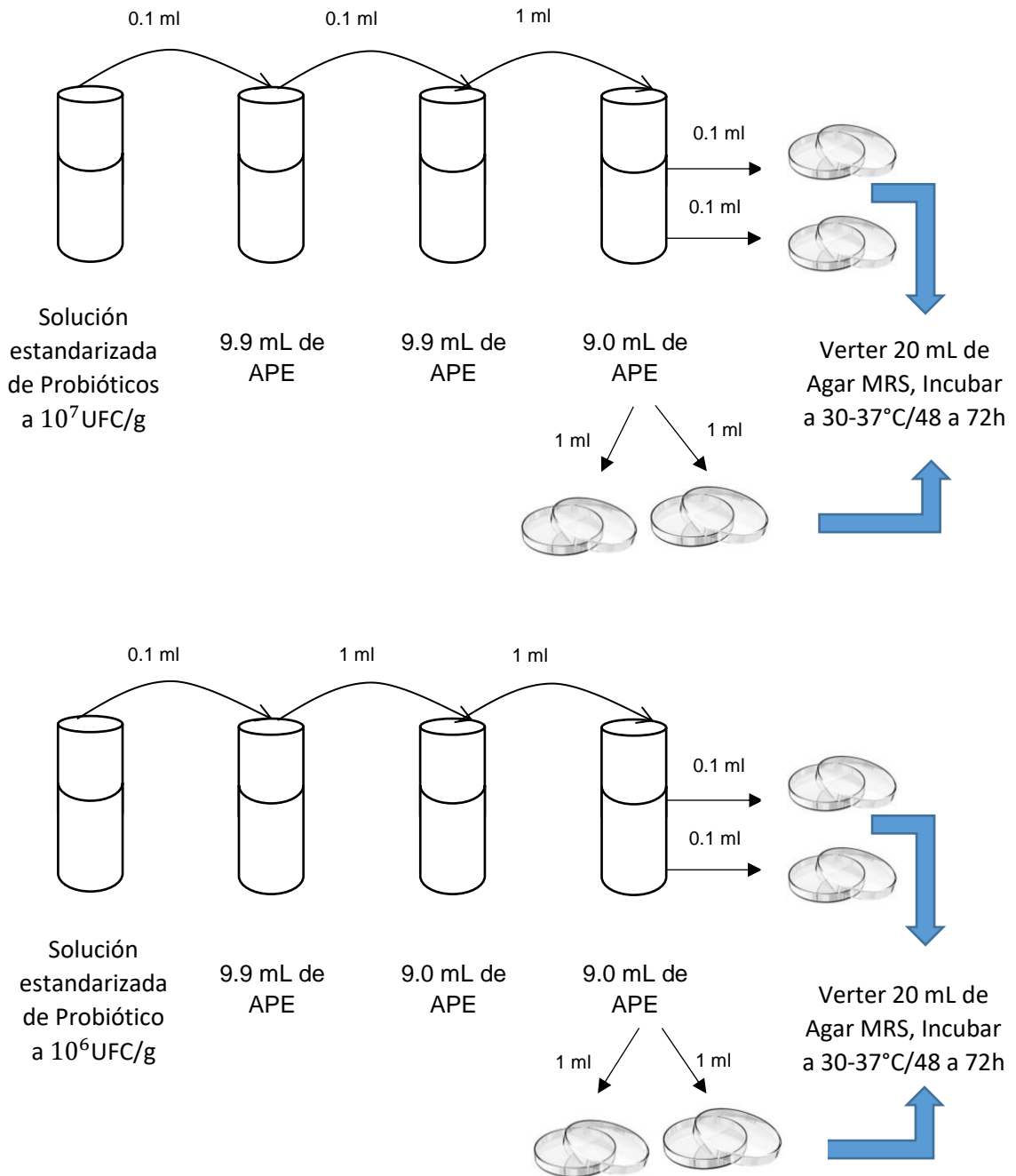


Figura N°15: Esquema de Recuento inicial de la mezcla de probióticos (Probio Tec®) antes de la incorporación al proceso de elaboración del helado.

# ANEXO N°11.

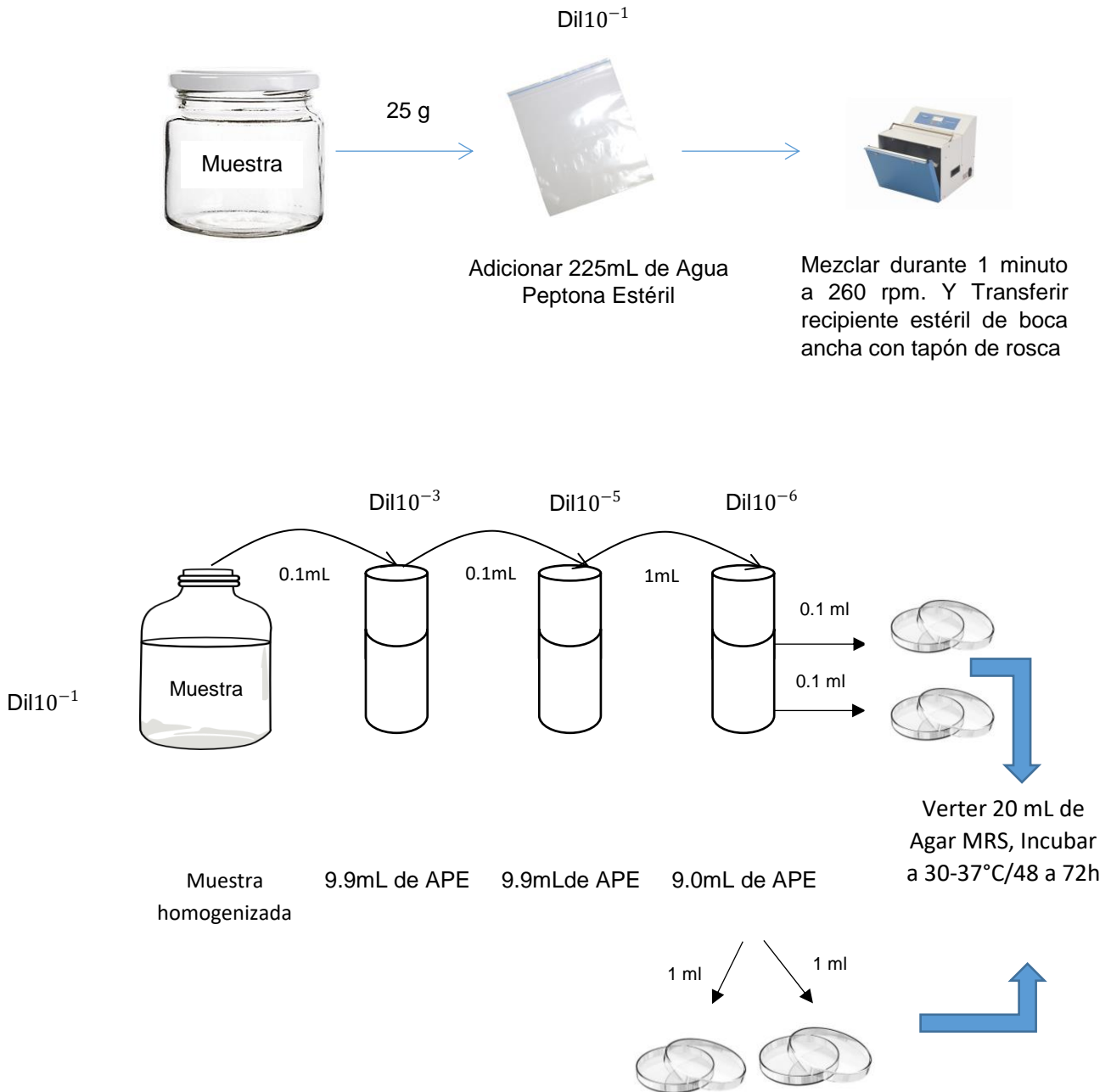


Figura N°16: Esquema del recuento de la mezcla de probióticos (Probio Tec®) en periodos de 0 días, 5 días, 10 días, 15 días y 20 días de almacenamiento a temperaturas de -10° a 10 °C.

ANEXO N°12.

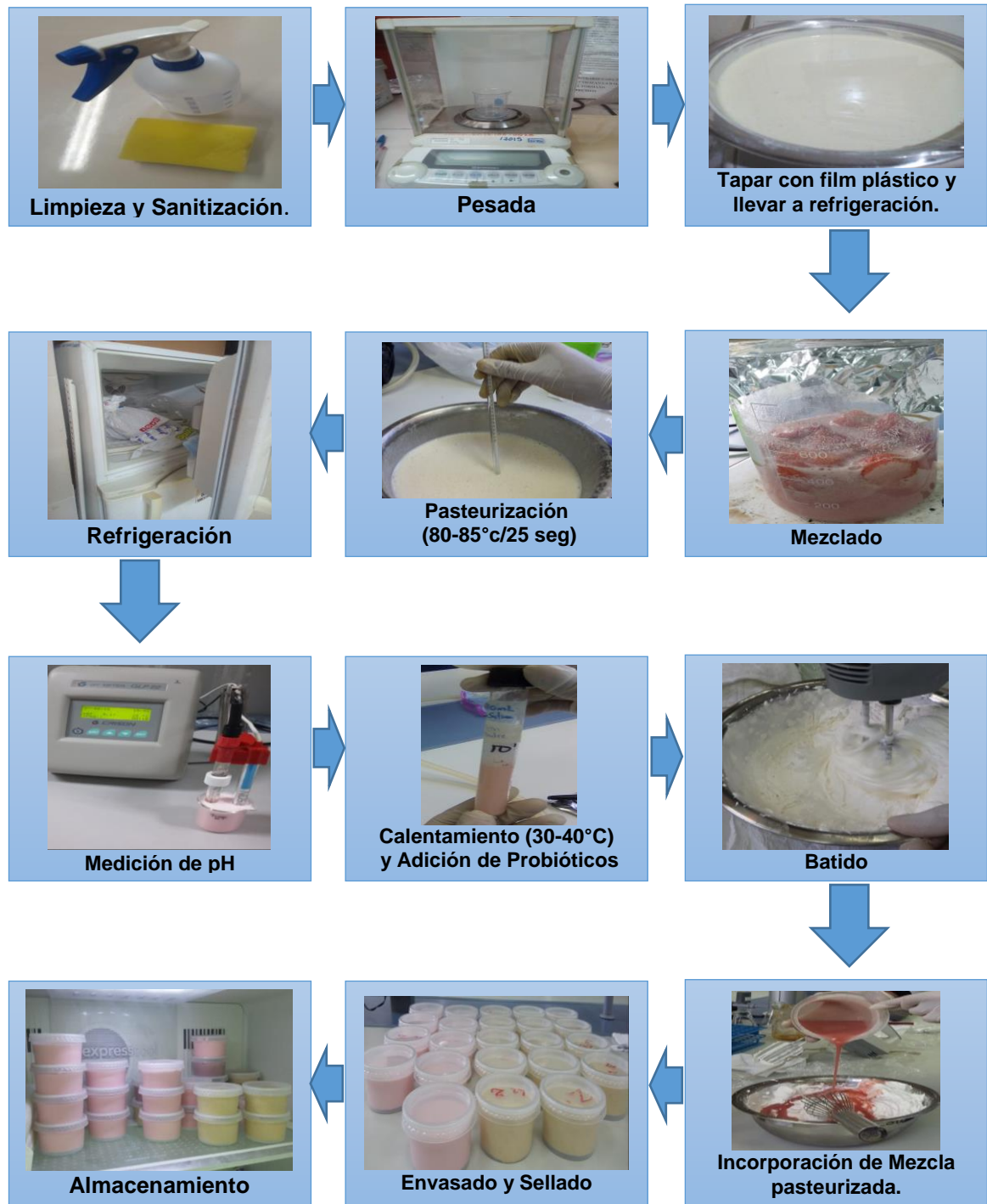


Figura N°17: Diagrama del proceso de elaboración de helado paso a paso.

### ANEXO N°13.

Cálculos para encontrar la concentración de probióticos presentes en la mezcla (Probio Tec®), Partiendo de la Dilución  $10^{-9}$ .

<b>Dilución <math>10^{-9}</math></b>	Alícuota 0.1mL	20 UFC	15 UFC
	Alícuota 1.0mL	150 UFC	152 UFC

-Alícuota 0.1mL

$$\text{Promedio} = \frac{20 \text{ UFC} + 15 \text{ UFC}}{2}$$

Promedio = 17.5, aprox. 18 UFC/0.1mL

18 UFC-----0.1mL

X UFC-----1.0mL

X=180 UFC/mL

-Alícuota 1.0mL

$$\text{Promedio} = \frac{150 \text{ UFC} + 152 \text{ UFC}}{2}$$

Promedio = 151 UFC/mL

-Promedio entre dos alícuotas (Placas)

$$\text{Promedio} = \frac{180 \text{ UFC} + 151 \text{ UFC}}{2}$$

Promedio = 165.5, aprox. 166 UFC/mL

Notación Científica=  $1.7 \times 10^2$  UFC/mL,

Multiplicando por el Factor de Dilución (FD), se encuentra la concentración de probióticos presentes en la mezcla.

$$\text{FD} = \frac{\text{Volumenes hechos}}{\text{Alícuotas Tomadas}}$$

$$\text{FD} = \frac{10\text{mL} \cdot 10\text{mL} \cdot 10\text{mL} \cdot 10\text{mL} \cdot 10\text{mL} \cdot 10\text{mL}}{0.1\text{mL} \cdot 0.1\text{mL} \cdot 0.1\text{mL} \cdot 1\text{mL} \cdot 1\text{mL}}$$

$$\text{FD} = 1 \times 10^9$$

- Concentración de Probióticos presentes en la Mezcla.

$$[\text{Probióticos}] = 1.7 \times 10^2 \text{ UFC/mL} \cdot \text{FD}$$

$$[\text{Probióticos}] = 1.7 \times 10^2 \text{ UFC/mL} \cdot 1 \times 10^9$$

$$[\text{Probióticos}] = 1.7 \times 10^{11} \text{ UFC/g}$$

Sus unidades finales son UFC por gramo, debido que ya es tomado en cuenta el gramo de muestra que se pesó para hacer la determinación.

ANEXO N°14.

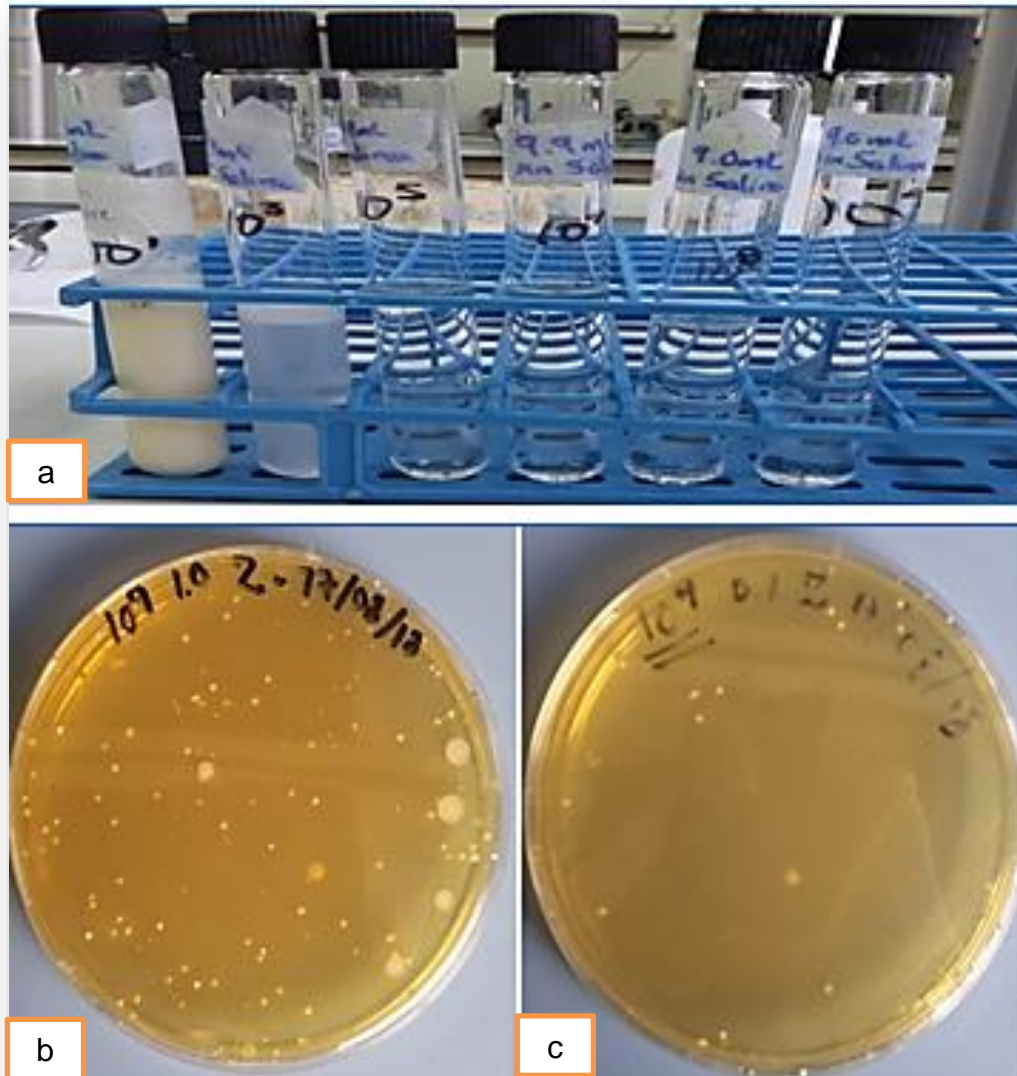


Figura N°18: Preparación de diluciones y Recuento en Dilución  $10^{-9}$  para la determinación de la Concentración de probióticos presentes en Mezcla (Probio Tec®)

ANEXO N°15.

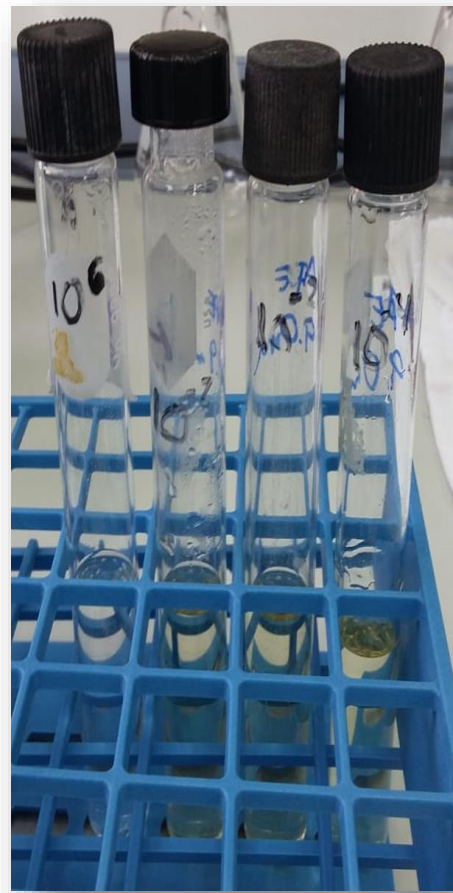
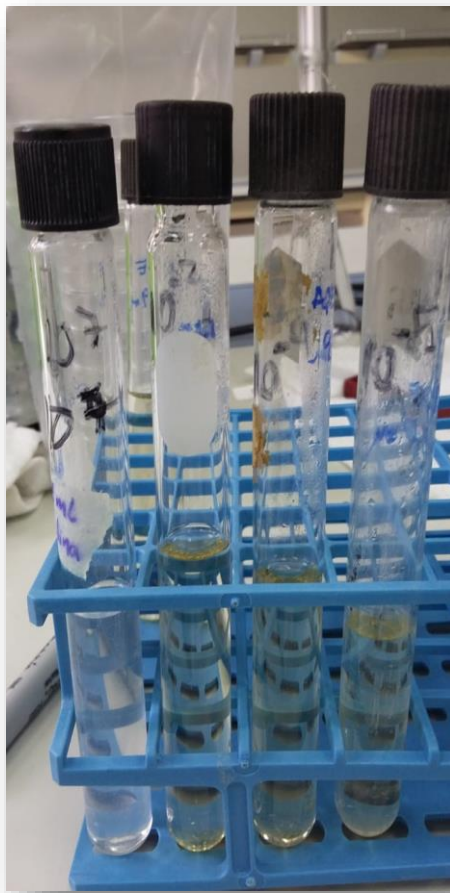


Figura N°19: Diluciones de soluciones estandarizadas a  $10^7$  y  $10^6$ , utilizadas para el recuento inicial de la mezcla de probióticos.