



ESTRATEGIAS PARA MEJORAR LA SOBREVIVENCIA DE PROBIÓTICOS EN HELADOS

STRATEGIES TO IMPROVE THE SURVIVAL OF PROBIOTIC IN ICE CREAM

Gabriela Ramos-Clamont Montfort^{1*}, Lily Elena Hernández-González², Silvia Guadalupe Fernández-Michel², María de Lourdes Froto-Madariaga² y Luz Vázquez-Moreno¹

¹Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. Carretera a la Victoria Km 0.6, Hermosillo, Sonora, 83000, México.

²Escuela de Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma de Coahuila. Blvd. Torreón-Matamoros Km 7, Ejido el Águila, Ciudad Universitaria, Torreón, Coahuila, 27000, México.

INTRODUCCIÓN

Los alimentos funcionales son aquellos que producen un efecto benéfico a la salud. Entre ellos se encuentran el yogurt y las leches fermentadas a las que se les añaden probióticos (Stanton *et al.*, 2005). Debido al importante sector que ocupan estos alimentos, a la tendencia actual de consumir productos funcionales y a las ganancias que producen, existe el interés de adicionar probióticos a otros alimentos, como helados, cereales, chocolate, bebidas lácteas no fermentadas, etc. Ya que la eficacia de los probióticos depende de que lleguen vivos y sean capaces de adherirse a la mucosa y enterocitos del colon, es necesario que sean capaces de resistir ambientes adversos durante la elaboración y vida de anaquel del producto y durante su consumo, a través de su paso por el tracto gastrointestinal (Burgain *et al.*, 2011). Por lo tanto, es importante considerar una serie de factores tecnológicos durante el proceso, para garantizar que los probióticos permanezcan viables en el alimento. Siendo los helados un producto de gran aceptación entre niños y adolescentes, en esta revisión nos enfocaremos a los aspectos a considerar para elaborar helados probióticos.

PROBIÓTICOS, DEFINICIÓN, EFICACIA Y USO EN LOS ALIMENTOS

Los probióticos son microorganismos vivos que administrados en cantidades adecuadas, producen beneficios a la salud (FAO/WHO, 2002). Los probióticos para consumo humano pertenecen, aunque no exclusivamente, a los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*. En la tabla 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. Estos son los siguientes: 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 y 6) Poder adherirse al intestino (Ross *et al.*, 2005).

Muchas compañías internacionales comercializan alimentos con probióticos, a los que atribuyen determinados efectos benéficos en la salud; en la tabla 2 se resumen algunos. Como se observa, estos productos son primordialmente yogurts y leches fermentadas. Sin embargo, otras empresas están desarrollando y comercializando nuevos alimentos funcionales con probióticos. Por ejemplo, el instituto Rosell y Lal'food introdujeron al mercado chocolates y barras nutritivas conteniendo cepas de lactobacilos y bifidobacterias. Por su parte, el Grupo Kerry de Irlanda comercializa jugo de naranja con probióticos encapsulados, y en Latinoamérica, Dos Pinos y Chr Hansen comercializan una nieve probiótica (Burgain *et al.*, 2011). Además, hay interés en el desarrollo de cereales, bebidas no lácteas y productos de soya adicionados con probióticos (Granato *et al.*, 2010).

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 (Champagne y Gardner, 2005). De manera general, se considera que consumiendo diariamente 100 g de alimento que contenga entre 10⁶ y 10⁷ UFC/g viables, se producirá un efecto benéfico para la salud (Talwalkar *et al.*, 2004; Jayamanne y Adams, 2006).

Tabla 1. Microorganismos probióticos usados en alimentos para humanos

Table 1. Probiotic microorganism used in human food products

Género	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>
Otras especies	<i>Sacharomyces boulardii</i> , <i>S. cerevisiae</i> , <i>Streptococcus termophilus</i>

Fuente: Sanders (2008).

Tabla 2. Efectos benéficos atribuidos a algunos alimentos que contienen probióticos**Table 2.** Beneficial effects attributed to some foods that contain probiotics

Indicación contra	Cepa	Compañía
Diarrea infantil	<i>L. rhamnosus</i> GG <i>L. casei</i> DN 114001	Danimals (yogur para beber) DanActive (leche fermentada)
Diarrea por <i>C. difficile</i> asociada a tratamiento con antibióticos	<i>L. rhamnosus</i> GG <i>S. boulardii</i> <i>L. casei</i> DN114001	Danimals (yogur para beber) Florastor (polvo) DanActive (leche fermentada)
Tránsito intestinal lento, inflamación intestinal	<i>B. animalis</i> DN 173 010	Activia (yogurt)
Mantenimiento de la salud	<i>L. reuteri</i> ATCC 55730 <i>L. casei</i> DN 114001 <i>L. casei</i> Shirota	Stonyfield yogurt Dan Active (Leche fermentada) Yakult
Alergia (dermatitis en niños)	<i>L. rhamnosus</i> GG	Danimals (yogur para beber)
Intolerancia a la lactosa	<i>L. bulgaricus</i> y <i>S thermophilus</i> (la mayoría de las cepas)	Todo yogur con cultivos vivos
Cólicos en niños	<i>L. reuteri</i> ATCC 55730	Gotas Reuteri
Soporte inmunológico	<i>B. lactis</i> HN019 (aka HOWARU™ o DR10) <i>B. lactis</i> Bb12 <i>L. rhamnosus</i> GG <i>L. casei</i> DN	Jugos de frutas; suplementos lácteos, Danisco Fórmula infantil Nestlé Danimals (yogur para beber) DanActive (leche fermentada)

Fuente: Sanders (2008).

DEFINICIÓN E IMPORTANCIA DE LOS HELADOS COMO ALIMENTO

Un posible vehículo para los probióticos es el helado. Este alimento se produce mediante la congelación con o sin agitación de una mezcla pasteurizada, compuesta por una combinación de ingredientes lácteos (20 % de sólidos de leche y no menos de 10% de grasa de leche). Además, puede contener grasas vegetales (hasta 11 %), emulsificantes y estabilizantes (0,2-0,5 %), azúcar (hasta 15-20 %), colorantes naturales o artificiales permitidos (0,01 %). Otros ingredientes que se incorporan son frutas, huevo y sus derivados y saborizantes (NOM-036-SSA1-1993). Físicoquímica, 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 dispersas o solubilizadas, proteínas, sales, vitaminas, polisacáridos y azúcares (Eisner *et al.*, 2005). La tecnología para producir este alimento se ha desarrollado rápidamente durante las últimas décadas, convirtiéndose en una industria muy rentable a nivel mundial.

Existen alrededor de 240 tipos de helados que se consumen en cualquier época del año, cuyos nutrientes son bien asimilados por el organismo humano (Güven y Karaca 2002; Tait *et al.*, 2003). En México, estos productos tienen gran aceptación entre niños y adolescentes, 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 (Alamprese *et al.*, 2002; Di Criscio *et al.*, 2010, Soukoulis *et al.*, 2010).

ELABORACIÓN DE HELADOS PROBIÓTICOS

Los helados probióticos pueden dividirse en helados probióticos simples y en helados de yogurt adicionados con probióticos. En el segundo caso, además de los probióticos, se usan cultivos iniciadores del yogurt (*Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* y *Lactobacillus delbruekii* subsp. *bulgaricus*). Las operaciones unitarias para producirlos se esquematizan en la figura 1.

De manera general, los ingredientes se reciben, pesan, mezclan y homogenizan, para posteriormente pasteurizarse a 80 °C durante 20 a 30 s, seguido de un enfriamiento a 4 °C. Esta mezcla debe calentarse entre 37 y 40 °C para añadir a los cultivos microbianos liofilizados o previamente activados. Si se trata de helado de yogurt se añaden los cultivos iniciadores y los cultivos probióticos, también llamados adjuntos. Si es un helado común, sólo se añaden los probióticos. Luego se lleva a cabo una fermentación hasta alcanzar un pH de 5,5 y se "madura" la mezcla, enfriándola a 4 °C, durante 24 h. La cantidad de inóculo de probiótico no está definida, depende de la resistencia de cada especie, por lo que se recomienda añadir una concentración mayor a 10⁷ UFC/g (Mohammadi *et al.*, 2011).

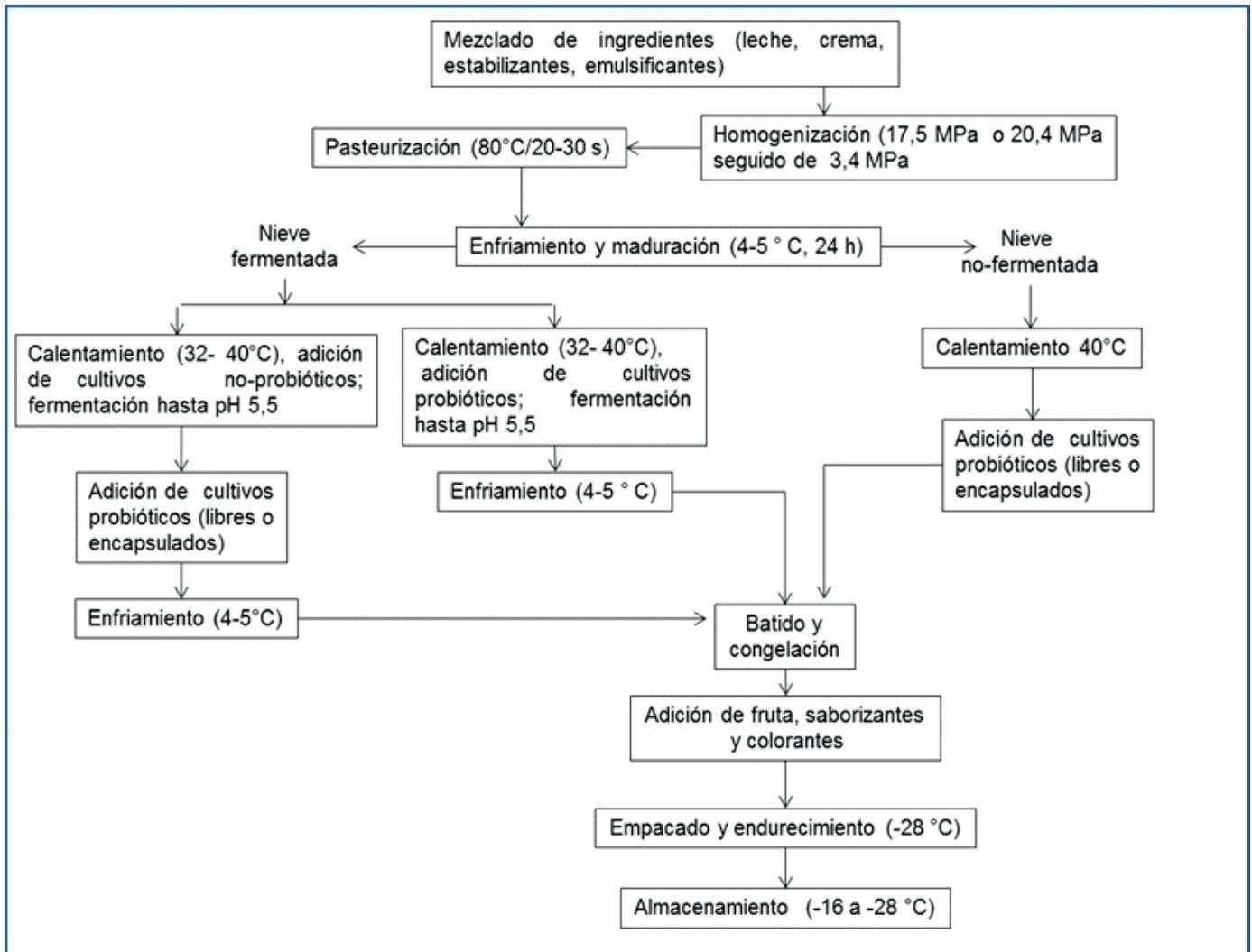


Figura 1. Diagrama de flujo para la producción de helados probióticos. Adaptado de Mohammadi *et al.* (2011).

Figure 1. Process flow diagram for manufacture of probiotic ice cream. Adapted from Mohammadi *et al.* (2011).

Completado el periodo de maduración, se procede a la operación de esponjamiento (overrun) que consiste en batir la mezcla incorporando aire para aumentar el volumen del helado e impartirle una textura suave y esponjosa. Finalmente, la mezcla se congela (-28 °C) y se almacena (-16 a -28 °C) hasta su comercialización (Cruz *et al.*, 2009; Mohammadi *et al.*, 2011).

ASPECTOS A CONSIDERAR PARA CONSERVAR LA SOBREVIVENCIA DE LOS PROBIÓTICOS INCORPORADOS A HELADOS

La efectividad de los probióticos depende de que lleguen vivos y se establezcan en el colon (Ross *et al.*, 2005). Debido a que los productos lácteos son hasta el momento los principales alimentos que contienen probióticos, la Federación Internacional de Lácteos recomienda que un mínimo de 10^7 UFC/g estén vivos en el momento en que se consume el alimento (Homayouni *et al.*, 2008). Sin embargo, diferen-

tes estudios indican una supervivencia menor, cuando los probióticos son incorporados a los helados (Hekmat y Mc Mahon, 1992; Dave y Shah, 1998; Godward *et al.*, 2000). Lo anterior se debe a que, tanto durante el proceso de elaboración del helado, como en el almacenamiento, los probióticos se ven sujetos a estreses osmóticos, mecánicos, oxidativos o por frío (Burgain *et al.*, 2011). Para atenuar estos efectos, es importante: 1) Elegir al probiótico más adecuado; 2) Conocer las condiciones del proceso que afectan a la supervivencia a fin de hacer adecuaciones y 3) Buscar estrategias para proteger a los probióticos del estrés (Homayouni *et al.*, 2008).

ELECCIÓN DEL PROBIÓTICO

Es preferible elegir a los géneros y especies con mayor tolerancia a la acidez, a la presencia de oxígeno, de altas concentraciones de azúcares y a las bajas temperaturas (Homayouni *et al.*, 2008). En la tabla 3 se muestra la tolerancia de algunos probióticos ante estos estreses. De manera general,

Tabla 3. Especies de probióticos tolerantes a diferentes estreses**Table 3.** Stress tolerant species of probiotics

Microorganismo	Resistencia a azúcar	Resistencia a oxígeno	Resistencia a bajas temperaturas
Bifidobacterium			
<i>B. bifidum</i> (Bb12)	R	R	R
<i>B. infantis</i> (1912)	-	-	R
<i>B. lactis</i> (BLC-1)	-	R	R
<i>B. lactis</i> (DD920)	-	-	R
<i>B. longum</i> (Bb-46)	S	S	S
Lactobacillus			
<i>L. acidophilus</i> (2401)	-	-	S
<i>L. acidophilus</i> (DD910)	-	-	R
<i>L. acidophilus</i> (La5)	R	R	S
<i>L. acidophilus</i> (L10)	-	-	R
<i>L. casei</i> (Lc01)	R	R	R
<i>L. johnsoni</i> (La1)	R	-	R
<i>L. paracasei subesp. Paracasei</i> (LCSI)	-	-	R

R: resistente; S: sensible; ----- no determinado

Fuente: Homayouni *et al.*, 2008.

los lactobacilos (anaerobios facultativos) son más resistentes que las bifidobacterias, que requieren condiciones estrictas de anaerobiosis para sobrevivir (Ross *et al.*, 2005). Sin embargo, en helados enriquecidos con vitamina C, inoculados con *Bifidobacterium bifidus* y *B. lactis* se han demostrado niveles de sobrevivencia de 10^7 UFC/g después de 15 semanas de almacenamiento a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Favaro-Trindade *et al.*, 2006). Entre las especies de lactobacilos que han sido inoculadas a los helados se encuentran *L. acidophilus*, *L. rhamnosus*, *L. johnsonii* y *L. rhamnosus* GG (Cruz *et al.*, 2009).

Por su parte, Homayouni *et al.* (2008), inocularon diferentes probióticos en helados con diferentes cantidades de sacarosa (10, 15, 20 y 25 %), presencia de sustancias reductoras (0.5 % de L-cisteína y 0.5 % de L-ascorbato) y bajas temperaturas (4 y $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) durante diferentes periodos de tiempo (1-3 meses). Después de estos periodos, se sometieron las muestras a condiciones simuladas del tracto gastrointestinal demostrando que las cepas más resistentes fueron *L. casei* (Lc01) y *B. lactis* (Bb12).

Como puede notarse, la elección del probiótico a incorporar se basa más en su resistencia a los estreses medio ambientales del helado, que al efecto benéfico que ejerce. Sin embargo, existen estrategias para proteger al probiótico, las cuales se discutirán más adelante, que pueden posibilitar la incorporación de cepas menos resistentes. Una vez elegido

el probiótico y antes de hacer una producción a nivel industrial, es necesario hacer un análisis sensorial a los helados inoculados, para asegurarse que la adición del probiótico no influya negativamente en la aceptación del producto (Favaro-Trindade *et al.*, 2007).

CONSIDERACIONES SOBRE CONDICIONES DEL PROCESO QUE AFECTAN A LA SOBREVIVENCIA Ajuste de Formulación en Base al Efecto de los Ingredientes

Uno de los factores que más influye en la sobrevivencia de los probióticos es la acidez. Por ello, la viabilidad de estas bacterias es mayor cuando se añaden al helado solas, que cuando se acompañan de cultivos iniciadores (Cruz *et al.*, 2009). De manera general, se considera que el pH óptimo de sobrevivencia de los lactobacilos es de 5,5 a 6,0, mientras que el de las bifidobacterias es entre 6,0 y 7,0 (Mohammadi *et al.*, 2011). Cuando se fabrican helados de yogurt, la producción de ácido láctico por los cultivos iniciadores puede disminuir el pH a niveles menores de 5,5. Ello produce la inactivación de enzimas importantes para el metabolismo de los probióticos y disminuye su sobrevivencia debido al efecto bactericida de las concentraciones de ácido en el medio (Cruz *et al.*, 2009). La opción es utilizar a los probióticos más resistentes al ácido, por ejemplo, *L. casei* (Lc01), cuando se elabore helado de yogurt.

El uso de pulpas y jugos de frutas ácidas también puede afectar la viabilidad, tanto de las bifidobacterias, como de algunos lactobacilos (Cruz *et al.*, 2009). Como alternativas para aumentar la resistencia de los probióticos en estas condiciones, se encuentran las de someter previamente a los microorganismos a un aumento gradual de la acidez para que adquieran resistencia mediante la expresión de proteínas inducidas por estrés; otra alternativa es usar sales de carbonato o citrato en la mezcla. También se pueden añadir promotores del crecimiento, especialmente prebióticos como inulina y oligofruktanos (Mohammadi *et al.*, 2011).

Por otro lado, debe considerarse que la adición de frutas muy ácidas afecta las características sensoriales del helado, disminuyendo la aceptación del consumidor (Favaro-Trindade *et al.*, 2006, 2007; Cruz *et al.*, 2009). Por lo anterior, la práctica más común es usar frutos levemente ácidos, asegurándose de establecer un sistema de análisis de peligros y puntos críticos de control (HACCP) para evitar contaminaciones de la pulpa o jugos con microorganismos saprófitos (Cruz *et al.*, 2009).

Existe controversia sobre el efecto de los lípidos en la sobrevivencia de los probióticos. Haynes y Playne (2002) y Favaro-Trindade *et al.* (2007) no encontraron efecto protector al aumentar el contenido graso de la mezcla, mientras que Turgut y Cakmakci (2009) encontraron una mayor sobrevivencia para *Lactobacillus acidophilus*, *L. paracasei* y *Bifidobacterium lactis* al aumentar el contenido de grasa en la mezcla de 5 al 10 %. Al parecer el efecto protector de los lípidos depende de la especie de probiótico utilizado y por

ello es importante conocer a fondo el comportamiento del microorganismo que se piense añadir (Mohammadi *et al.*, 2011).

La presencia de azúcares en la formulación del helado, en particular de sacarosa, puede afectar negativa o positivamente a la sobrevivencia de los probióticos. Por un lado, producen un efecto osmótico y por el otro, actúan como crioprotectores (Güven y Karaca, 2002). El efecto final dependerá del tipo y concentración de azúcar, de la especie del probiótico, de la temperatura, velocidad y método de congelación y del tiempo de almacenamiento (Champagne y Rastall, 2009). *B. bifidum* (Bb12), *L. acidophilus* (La5) y *L. johnsonii* (La1) se encuentran entre las especies más resistentes a la concentración de azúcares, mientras que *B. longum* (Bb 46) es la más sensible (Homayouni *et al.*, 2008).

Efecto del Congelamiento

El proceso de congelamiento de la nieve puede afectar a la pared celular del probiótico. Esto debido al estrés mecánico provocado por los cristales de hielo, al daño por frío a las membranas celulares, a la condensación de solutos en el medio y a la deshidratación de la célula (Gill, 2006). Hekmat y McMahon (1992) demostraron que la congelación de la nieve disminuye en 1 ciclo logarítmico a las poblaciones de *L. acidophilus*, mientras que encontraron una disminución del 10 % de las poblaciones de *B. Lactis* y *B. animalis*. Es importante elegir microorganismos que puedan resistir la deshidratación causada por la congelación, sin que sus paredes celulares se rasguen. Como factor adicional, se recomienda el uso de crioprotectores para proteger a la membrana. Entre estos, destacan los fructooligosacáridos y la inulina (Cruz *et al.*, 2009). Por otro lado, entre más rápido sea el proceso de congelamiento, más pequeños serán los cristales de hielo formados y por lo tanto menor será el daño que provoquen a la pared y a la membrana celular de los probióticos (Gill, 2006).

Efecto del Batido y Esponjado

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. Al mismo tiempo, incorpora una considerable cantidad de oxígeno, tóxico para los probióticos (Cruz *et al.*, 2009). Hay que recordar que la producción de ATP en estos microorganismos se lleva a cabo por la vía fermentativa (anaerobia) y por tanto, sus células carecen de un sistema para "atrapar oxígeno" (bifidobacterias) o lo expresan de manera reducida (lactobacilos). Esta ausencia de cadena transportadora de electrones en su metabolismo, promueve la conversión de O_2 a H_2O_2 , el cual se acumula en la bacteria como tal (por carecer de catalasa), o como radicales libres (aniones superóxido, radicales hidróxido), provocando eventualmente la muerte del organismo (Vasiljevic y Shah, 2008).

El efecto tóxico del oxígeno depende de la cantidad

de volumen de aire añadido; algunos estudios indican que si el esponjamiento es menor al 106 % del volumen de la mezcla inicial, se puede reducir la pérdida de viabilidad de los probióticos en un 10 % (Modler *et al.*, 1990; Magariños *et al.*, 2007).

Efecto del Tiempo de Almacenamiento

El efecto del tiempo de almacenamiento del helado en la sobrevivencia del probiótico depende de la especie, formulación de la mezcla, temperatura de almacenamiento y tecnología de producción, entre otras (Hekmat y McMahon, 1992; Vasiljevic y Shah, 2008). En general se observa una reducción de las poblaciones entre 0,6 a 3 ciclos logarítmicos (0,6 a 3 log), después de almacenar la nieve a $-18^\circ C$ durante 2 a 3 meses. Por ello, es recomendable inocular al helado con concentraciones altas de bacteria para que después de este tiempo sigan estando viables más de 10^7 UFC/g y así puedan ejercer el efecto benéfico esperado (Cruz *et al.*, 2009).

La temperatura de almacenamiento es determinante. Es importante considerar que muchas bacterias lácticas alargan su fase lag y pierden viabilidad cuando se almacenan a temperaturas muy bajas (Naidu *et al.*, 1999). Se recomienda almacenar el producto terminado entre -20 a $-28^\circ C$, evitando variaciones importantes de temperatura y procesos de congelamiento-descongelamiento. De esta manera puede conservarse la viabilidad de *L. rhamnosus* GG hasta por un año y la de *L. acidophilus* y *B. bifidum* hasta por 17 semanas (Mohammadi *et al.*, 2011).

ESTRATEGIAS PARA MEJORAR LA SOBREVIVENCIA DE LOS PROBIÓTICOS AÑADIDOS A HELADOS

Como ya se indicó, la primera estrategia consiste en usar a las especies más adecuados. De manera general, los lactobacilos son más resistentes que las bifidobacterias (Homayouni *et al.*, 2008). Por ejemplo, *L. johnsonii* La-1 sobrevive hasta 8 meses en formulaciones de helados con alta concentración de azúcar (Haynes y Playne, 2002) y *L. acidophilus* representa una buena elección cuando se elaboran helados de yogurt con pH menor a 5,0 (Godward *et al.*, 2000).

Otra práctica es añadir factores o promotores de crecimiento a la formulación, como caseína, hidrolizados de proteínas de suero, extractos de levadura, glucosa, L-cisteína y algunas vitaminas (Champagne y Rastall, 2009). *L. acidophilus* es una de las especies que conserva mejor su viabilidad cuando se añaden a la formulación L-cisteína e hidrolizados de proteínas de suero (Dave y Shah, 1998). Además de actuar como promotor del crecimiento de probióticos, la L-cisteína produce un ambiente reductor que elimina parte del O_2 incorporado en la nieve después del batido. Las concentraciones recomendadas de L-cisteína en la mezcla son de 50 mg/kg (Mohammadi *et al.*, 2011).

De especial importancia es la adición de prebióticos; estos son carbohidratos que estimulan selectivamente el crecimiento de los probióticos sin ser digeridos por el huma-

no y también protegen a las bacterias de algunos estreses. Por ejemplo, la adición de oligofruktosa e inulina en concentraciones de 1 a 4 %, protege la viabilidad de *Bifidobacterium animalis* Bb12 durante el almacenamiento del helado (Akalin y Eris, 2003). La adición de inulina también mejora la resistencia al daño por congelación a pH menores de 5,5 de *L. acidophilus* y *B. lactis* (Champagne y Rastall, 2009). Además

de la inulina pueden agregarse otros prebióticos, como almidones resistentes, goma arábica, galactooligosacáridos y otros carbohidratos no digeribles (Mohammadi *et al.*, 2011).

En la tabla 4 se presenta un resumen de los factores que pueden dañar a los probióticos adicionados a la nieve y las acciones para disminuir estos daños.

Tabla 4. Principales métodos para mejorar la viabilidad de los probióticos en helado

Table 4. Main methods to improve the viability of probiotic bacteria in ice cream

Etapa del proceso	Estrés	Efecto biológico	Métodos para mejorar la protección de los probióticos
Mezclado	Disminución de pH por adición de fruta ácida	Interrupción de transferencia de masa entre células, inactivación enzimática; inanición celular	Selección de cepas tolerantes, adición de protectores y promotores del crecimiento
Fermentación (helados de yogurt y otros postres congelados fermentados)	Disminución de pH sobre todo menores de 5,5	Interrupción de transferencia de masa entre células, inactivación enzimática; inanición celular	Selección de cepas tolerantes, adición de prebióticos y otros promotores del crecimiento Control de pH durante la fermentación (terminarla a pH 5,5); Aumentar concentración de inóculo de probióticos
	Alta acidez titulable	Efecto bactericida	
	Alto potencial redox	Restricción e inactivación de rutas metabólicas; muerte	
	Alta concentración de azúcares	Estrés osmótico	
	Aditivos alimentarios que dañen al probiótico	Daño a la pared celular y a otras partes de la célula	
Congelación	Antagonismos con cultivos iniciadores de la fermentación	Pérdida de viabilidad por la producción de inhibidores; competencia por nutrientes	Selección de cepas tolerantes; encapsulamiento de probióticos; uso de crioprotectores; congelado ultrarápido. Aumentar la concentración de inóculo de probióticos
	Daño mecánico debido a la formación de cristales de hielo	Rompimiento celular	
	Estrés por temperatura	Shock término durante la congelación	
Batido	Estrés químico y bioquímico	Condensación de solutos dañino, deshidratación celular	Selección de especies tolerantes al oxígeno; encapsulamiento de probióticos; uso de atrapadores o reductores de O ₂ (<i>L-cisteína</i>). Empaque con agentes reductores o impermeables al oxígeno; aumentar inóculo
	Toxicidad al oxígeno	Producción de H ₂ O ₂	
Almacenamiento en congelación	Tiempo	Daño celular durante la congelación muerte gradual durante el almacenamiento	Selección de especies tolerantes; uso de bacterias encapsuladas; evitar temperaturas oscilantes; uso de atrapadores o reductores de O ₂

Adaptado de Cruz *et al.* (2009) y Mohammadi *et al.* (2011).

Microencapsulamiento

Una estrategia exitosa para proteger a los probióticos es proveerlos de una microcápsula o barrera física semipermeable, que los proteja del O₂, pH, tensiones mecánicas, bajas temperaturas y otros estreses. Para elaborar estas barreras, se emplean algunos polímeros de calidad alimenticia, como proteínas, lípidos y carbohidratos (Krasaekoopt *et al.*, 2003). Otras ventajas asociadas al encapsulamiento de probióticos son: protección de las células contra bacteriófagos, aumento de la sobrevivencia y del tiempo de vida de anaquel, así como de la estabilidad durante el almacenamiento (Burgain *et al.*, 2011).

Homayouni *et al.* (2008), elaboraron nieves con *L. casei* (Lc-01) and *B. lactis* (Bb-12) encapsulados en proteínas de suero, adicionando 1 % de almidones resistentes y se almacenaron durante 180 días. La sobrevivencia de los probióticos encapsulados fue 30 % mayor a la de los que se agregaron libres a la nieve. Por su parte Ahmadi *et al.* (2012), elaboraron helado de yogurt inoculado con *L. acidophilus* La-5 encapsulado con fructooligosacáridos en alginato de sodio. El encapsulamiento protegió al probiótico efectivamente, ya que después de 60 días de almacenamiento únicamente disminuyeron las cuentas en 1 ciclo logarítmico (1 log), mientras que la disminución en las cuentas de las nieves adicionadas con probióticos libres fueron hasta de 9,55 log.

Otros probióticos encapsulados que se han incorporado al helado con mejores resultados que, cuando se añaden en forma libre son *L. delbrueckii* spp *bulgaricus*, *B. infantis* y *B. bifidum* (Homayouni *et al.*, 2008).

Existen diferentes tipos de matrices encapsulantes que se pueden utilizar. El entrecruzamiento es una alternativa económica, considerada como segura (GRAS) y que permite la liberación de la bacteria en el intestino. Sin embargo, los alginatos presentan limitada resistencia al paso por el estómago. Por otro lado, las proteínas de suero lácteo tienen efecto de amortiguador de pH y crean zonas anóxicas en la cápsula, que protegen del oxígeno a los microorganismos (Burgain *et al.*, 2011). Por ello, una solución para mejorar la resistencia de las cápsulas de alginato pudiera ser añadirles una capa adicional de proteínas de suero. El acumulamiento de varias capas en la microcápsula usando diferentes metodologías puede resultar en una mayor protección para el probiótico, siempre y cuando se garantice su liberación en el intestino grueso, para que pueda ejercer su efecto benéfico (Krasaekoopt *et al.*, 2003; Burgain *et al.*, 2011).

Para mejorar la sobrevivencia de los probióticos, el diámetro de las cápsulas debe ser mayor o igual a 40 µm. Por otro lado, no debe superar los 150 µm para no afectar las propiedades sensoriales del helado (Krasaekoopt *et al.*, 2003). A pesar de los buenos resultados obtenidos, la cantidad de investigaciones en las que se estudian los efectos de la incorporación de probióticos encapsulados al helado es escasa; más aún la cantidad de aplicaciones industriales (Sanders, 2008). Lo anterior representa un campo abierto para la investigación en esta área.

CONCLUSIONES

La incorporación de probióticos en la nieve es una buena oportunidad para obtener alimentos funcionales de gran aceptación, dirigidos a mejorar la salud de la población. Es importante elegir el tipo de cepas a incorporar, tanto en base al efecto que ejercen sobre la salud, como a su resistencia a diferentes estreses a los que serán sometidos durante la elaboración y vida de anaquel de los helados. Además, se pueden realizar ajustes adecuados a la formulación y al proceso, para garantizar la sobrevivencia de los probióticos en el helado hasta por varios meses.

REFERENCIAS

- Ahmadi, A., Milani, E., Madadlou, A., Mortazavi, S., Mokarram, R. y Salarbashi, D. 2012. Synbiotic yogurt-ice cream produced via incorporation of microencapsulated lactobacillus acidophilus (la-5) and fructooligosaccharide. *Journal of Food Science and Technology*. 3:1-7.
- Akalin, A.S. y Erişir, D. 2008. Effects of inulin and oligofructose on the rheological characteristics and probiotic culture survival in low-fat probiotic ice cream. *Journal of Food Science*. 73(4): M184-M188.
- Alamprese, C., Foschino, R., Rossi, M., Pompei, C. y Savani, L. 2002. 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*. 12(2-3): 201-208.
- Burgain, J., Gaiani, C., Linder, M. y Scher, J. 2011. Encapsulation of probiotic living cells: From laboratory scale to industrial applications. *Journal of Food Engineering*. 104(4): 467-483.
- Champagne, C. P. y Rastall, R. A. 2009. Some technological challenges in the addition of probiotic bacteria to foods. *En Prebiotics and Probiotics Science and Technology*. D Charalampopoulos y R.A., Rastall (ed.), pp 763-806. Springer, Berlin.
- Champagne, C. P. y Gardner, N. J. 2005. Challenges in the addition of probiotic cultures to foods. *Critical Reviews of Food Science and Nutrition*. 45:61-84.
- Cruz, A. G., Antunes, A. E. C., Sousa, A. L.C. O. P., Faria, J. A. F. y Saad, S. M. I. 2009. Ice-cream as a probiotic food carrier. *Food Research International*. 42(9): 1233-1239.
- Dave, R. I. y Shah, N. P. 1998. Ingredient Supplementation effects on viability of probiotic bacteria in yogurt. *Journal of Dairy Science*. 81(11): 2804-2816.
- Di Criscio, T., Fratianni, A., Mignogna, R., Cinquanta, L., Coppola, R., Sorrentino, E. y Panfili, G. 2010. Production of functional probiotic, prebiotic, and synbiotic ice creams. *Journal of Dairy Science*. 93(10): 4555-4564.
- Eisner, M. D., Wildmoser, H. y Windhab, E. J. 2005. Air cell microstructuring in a high viscous ice cream matrix. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 263(1-3): 390-399.
- FAO/WHO. 2002. Joint working group report on drafting guidelines for the evaluation of probiotic in food. FTP FAO 85. Ontario, Canada.

- Favaro-Trindade, C. S., Bernardi, S., Bodini, R. B., De Carvalho-Balheiro, J. C. y De Almeida, E. 2006. Sensory acceptability and stability of probiotic microorganisms and vitamin C in fermented acerola (*Malpighia emarginata* DC) ice cream. *Journal of Food Science*. 71(6): S492-S495.
- Favaro-Trindade, C. S., de Carvalho-Balheiro, J. C., Dias, P. F., Amaral-Sanino, F. y Boschini, C. 2007. Effects of culture, pH and fat concentration on melting rate and sensory characteristics of probiotic fermented yellow mombin (*Spondias mombin* L) ice creams. *Food Science and Technology International*. 13(4): 285-291.
- Gill, C. O. 2006. Microbiology of frozen foods. *En Handbook of Frozen Food Processing and Packaging*. S. Da-Wen (ed.), pp. 85-100. CRC Press. Boca Raton, Florida.
- Godward, G., Sultana, K., Kailasapathy, K., Peiris, P., Arumugaswamy, R. y Reynolds, N. 2000. The importance of strain selection on the viability of probiotic bacteria in dairy foods. *Milchwissenschaft*. 55:441-445.
- Granato, D., Branco, G.F., Nazzaro, F., Cruz, A.G. y Faria, J.A.F. 2010. Functional foods and nondairy probiotic food development: Trends, concepts, and products. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 9(3): 292-302.
- Güven, M. y Karaca, O.B. 2002. 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*. 55(1): 27-31.
- Haynes, I. N. y Playne, M. J. (2002). Survival of probiotic cultures in low fat ice cream. *Australian Journal of Dairy Technology*. 57:10-14.
- Hekmat, S. y McMahon, D. J. 1992. Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* in ice cream for use as a probiotic food. *Journal of Dairy Science*. 75(6): 1415-1422.
- Homayouni, A., Ehsani, M. R., Azizi, A., Razavi S. H. y Yarmand, M. S. 2008. Growth and survival of some probiotic strains in simulated ice cream conditions. *Journal of Applied Science*. 8: 379-382.
- Jayamanne, V. S. y Adams, M. R. 2006. Determination of survival, identity and stress resistance of probiotic bifidobacteria in bio-yoghurts. *Letters in Applied Microbiology*. 42(3): 189-194.
- Krasaekoopt, W., Bhandari, B. y Deeth, H. 2003. Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt. *International Dairy Journal*. 13(1): 3-13.
- Magariños, H., Selaive, S., Costa, M., Flores, M. y Pizarro, O. 2007. Viability of probiotic microorganisms (*Lactobacillus acidophilus* La-5 and *Bifidobacterium animalis* subsp. lactis Bb-12) in ice cream. *International Journal of Dairy Technology*. 60(2): 128-134.
- Mohammadi, R., Mortazavian, A., Khosrokhavar, R. y da Cruz, A. 2011. Probiotic ice cream: viability of probiotic bacteria and sensory properties. *Annals of Microbiology*. 61(3): 411-424.
- Modler, H., McKellar, R., Goff, H. y Mackie, D. 1990. Using ice cream as a mechanism to incorporate bifidobacteria and fructooligosaccharides into the human diet. *Cultured Dairy Products Journal*. 25:4-9.
- Naidu, A.S., Bidlack, W.R. y Clemens, R.A. 1999. Probiotic spectra of lactic acid bacteria (LAB). *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 39(1): 13-126.
- NOM-036-SSA1-1993. NORMA Oficial Mexicana, Bienes y servicios. Helados de crema, de leche o grasa vegetal, sorbetes y bases o mezclas para helados. Especificaciones sanitarias. *Diario Oficial de la Nación*. Mar, 10,1995. p.4.
- Ross, R.P., Desmond, C., Fitzgerald, G.F. y Stanton, C. 2005. Overcoming the technological hurdles in the development of probiotic foods. *Journal of Applied Microbiology*. 98(6): 1410-1417.
- Sanders, M.E. (2008). Products with probiotics, [en línea]. Disponible en: <<http://www.usprobiotics.org>>. [Fecha de acceso 10 de junio, 2012].
- Soukoulis, C., Lyroni, E. y Tzia, C. 2010. Sensory profiling and hedonic judgement of probiotic ice cream as a function of hydrocolloids, yogurt and milk fat content. *LWT - Food Science and Technology*. 43(9): 1351-1358.
- Stanton, C., Ross, R.P., Fitzgerald, G.F. y Sinderen, D.V. 2005. Fermented functional foods based on probiotics and their biogenic metabolites. *Current Opinion in Biotechnology*. 16(2): 198-203.
- 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.), pp. 3233-3236. Academic Press, Oxford.
- Talwalkar, A. I. y Kailasapathy, K. A. 2003. Effect of microencapsulation on oxygen toxicity in probiotic bacteria. *Australian Journal of Dairy Technology*. 58:36-39.
- Turgut, T. y Cakmakci, S. 2009. Investigation of the possible use of probiotics in ice cream manufacture. *International Journal of Dairy Technology*. 62 :444-451.
- Vasiljevic, T. y Shah, N. P. 2008. Probiotics: "From Metchnikoff to bioactives". *International Dairy Journal*. 18(7): 714-728