

UNIVERSIDAD DE OVIEDO  
Programa de Doctorado  
“Investigación en Medicina”

TESIS DOCTORAL

“Evaluación de la calidad microbiológica,  
físicoquímica y los microorganismos probióticos  
en productos lácteos fermentados comerciales en  
la ciudad de Ocotlán, Jalisco”

**Pedro Javier Guerrero Medina**

**Oviedo 2012**



## RESUMEN DEL CONTENIDO DE TESIS DOCTORAL

1.- Título de la Tesis	
Español/Otro Idioma: "Evaluación de la calidad microbiológica, fisicoquímica y los microorganismos probióticos en productos lácteos fermentados comerciales en la ciudad de Ocotlán, Jalisco".	Inglés: : "Evaluation of the microbiological quality, physicochemical and the probiotics microorganisms, in lacteal fermented commercial products in the city of Ocotlan, Jalisco"
2.- Autor	
Nombre: Pedro Javier Guerrero Medina	
Programa de Doctorado: Investigación en Medicina	
Órgano responsable: Departamento de Medicina	

### RESUMEN (en español)

Las bacterias ácido-lácticas (BAL) están asociadas con los alimentos y la salud, son objeto de estudio de investigación biotecnológica. En la microbiota intestinal encontramos a los probióticos con una potencial aplicación en la prevención de las infecciones intestinales. La FAO/OMS, los definen como "microorganismos vivos que cuando son administrados en cantidades adecuadas confieren un beneficio a la salud del huésped". En la actualidad el consumo de alimentos con probióticos se está incrementando, en virtud de tener propiedades en la salud. Bajo esta premisa resulta importante conocer las evidencias científicas que avalen estas características saludables, la cantidad y tipo de microorganismos probióticos y los productos comerciales, que impactan el sector alimentario en Ocotlán. En México, hay en venta lácteos fermentados, con probióticos. Sin embargo, no hay normas, ni guías de evaluación. El Objetivo es evaluar la calidad microbiológica, fisicoquímica y los microorganismos probióticos en productos lácteos fermentados comerciales en la ciudad de Ocotlán, Jalisco. Los métodos realizados son: 1. Investigación de mercado. 2. Revisión bibliográfica de guías y técnicas de evaluación de BAL. 3. Evaluación del Yogurt. 4. Evaluación de Leches fermentadas. 5. Variabilidad genética de BAL. 6. Estudio de percepción de lácteos fermentados y probióticos. Se realizó un censo de lácteos fermentados vendidos en Ocotlán. Una revisión bibliográfica en bases de información. Se evaluaron 60 muestras de yogurt, 60 muestras de leches fermentadas. Se aislaron 40 cepas de BAL y se evaluó la diversidad genética y su perfil bioquímico. Se aplicaron 112 encuesta.

Los parámetros evaluados fueron: Fisicoquímicos: temperatura, pH, acidez, viscosidad. Microbiológicos: coliformes totales, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella*, BAL. Organolépticos: color, olor, sabor y textura. Perfil Bioquímico: Tinción de Gram, movilidad, catalasa, resistencia a sales biliares, resistencia al ácido, fermentación de lactosa, glucosa y fructosa. La diversidad genética por el método de RAPD y una encuesta.

El Censo de lácteos fermentados, generó el listado de productos que se comercializaban en Ocotlán. Se definieron los análisis y valorar el Yogurt y Leches fermentadas. El análisis comparativo de recuentos microbianos del yogurt versus los límites permitidos en la Norma,



fueron negativos, por lo tanto, dentro de norma. La temperatura del 33% de las muestras, el 7% de los valores de pH están fuera de norma. La acidez estuvo dentro del límite. El perfil organoléptico denota sabores y texturas suaves. En Leches fermentadas, las BAL oscilaron de  $4.18 \times 10^7$  a  $2.94 \times 10^4$ , ufc/g. Al comparar los resultados de BAL, con el codex alimentario, no cubren los límites mínimos, excepto una marca. La temperatura fue de 2°C a 14°C, la acidez del 0.58% al 1.0%, y el pH de 3.67 a 4.42. En la Variabilidad Genética de BAL, los coeficientes de Jaccard más altos corresponden a cada uno de los productos analizados. El perfil bioquímico de las BAL, no es concluyente para diferenciarlas. En el estudio de percepción, El 60% de los encuestados son del sexo femenino, el 85.45%, consumen lácteos fermentados, el 41.07% comen el yogurt cuchareable, el 78.18% ha oído de los probióticos, el 15.12% coinciden que son microorganismos o bacterias, el 66.27% refieren algún tipo de malestar digestivo.

Conclusiones. 1. Los yogurt de beber y batido expendidos en la ciudad de Ocotlán se encuentran dentro de norma respecto de los recuentos microbianos. 2. Los parámetros fisicoquímicos del yogurt fueron aceptables y de acuerdo a la norma a excepción del pH en una marca. 3. La calidad microbiológica del yogurt fue aceptable y dentro de norma. 4. En las leches fermentadas la norma mexicana no establece una cantidad mínima de bacterias lácticas por ml de producto. 5. Todas las marcas de las leches fermentadas contenían bacterias ácido lácticas viables. 6. La temperatura de almacenamiento de las leches fermentadas sobrepasaba el límite establecido por la norma. 7. Los parámetros de acidez y pH de las leches fermentadas están en conformidad de la normatividad vigente, excepto una marca respecto del pH. 8. Toda la Microbiología Sanitaria de las leches fermentadas fue negativa y dentro de norma. 9. En la variabilidad genética de las bacterias ácido lácticas de las leches fermentadas, el dendograma UPGMA derivado de los coeficientes de similitud calculados por el método Jaccard establece la existencia de cuatro grupos de diversidad genética. 10. En el estudio de percepción, el producto lácteo fermentado más consumido es el yogurt.

### RESUMEN (en Inglés)

Lactic acid bacteria (LAB) are associated with food and health, are object of study of biotechnology research. Paired with the intestinal microbiota with probiotics find a potential application in preventing intestinal infections. The FAO/WHO, probiotics defined as "live microorganisms which when administered in adequate amounts confer a health benefit on the host". Currently the probiotic food consumption is increasing, by virtue of having health properties. Under this premise it is important to know the scientific evidence substantiating these health benefits, the amount and type of probiotic and commercial products that impact the food industry in Ocotlan. In Mexico, there are for sale fermented milk products with probiotic. However, there are no rules or guidelines for evaluation. The objective is to evaluate the microbiological, physicochemical quality and probiotic microorganisms in fermented milk products business in the city of Ocotlán, Jalisco. The methods performed are: 1. Market research. 2. Literature review of guidelines and assessment techniques BAL. 3. Yogurt



Assessment. 4. Evaluation of fermented milks. 5. Genetic variability of BAL. 6. Perception study of fermented dairy.

A census of probiotics sold in Ocotlan. A literature review in databases. We evaluated 60 samples of yogurt, 60 samples of fermented milks. 40 strains were isolated from BAL and assessed the genetic diversity and biochemical profile. We administered 112 survey.

The parameters evaluated were: Physicochemical: temperature, pH, acidity, viscosity. Microbiological: total coliforms, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella*, BAL. Organoleptic: color, smell, taste and texture. Biochemical Profile: Gram stain, motility, catalase, bile salt resistance, acid resistance, fermentation of lactose, glucose and fructose. The genetic diversity by RAPD method and a survey.

The Census of fermented dairy, generated the list of products marketed in Ocotlan. We defined the analysis and evaluate the Yogurt and Fermented Milks. The comparative analysis of microbial counts of yogurt versus limitation permitted by the Official, were negative, therefore, within the norm. The temperature of the 33% samples, and 7% of pH values are outside the norm. The acidity was within the limit. The organoleptic profile shows soft flavors and textures. In fermented milks, accounts of BAL ranged from  $4.18 \times 10^7$  to  $2.94 \times 10^4$  cfu/g. When comparing the results of BAL with the food codex limits do not cover the minimum, except for a brand. The temperature was 2°C to 14°C, acidity of 0.58% to 1.0%, and pH of 3.67 to 4.42. In the genetic variability of BAL, the highest Jaccard coefficients corresponding to each of the products tested. The biochemical profile of the BAL, not conclusive to differentiate. In the perception study, 60% of respondents were female, the 85.45%, consume fermented milk, the 41.07% eat yogurt cuchareable, the 78.18% having heard of probiotics, the 15.12% agree the microorganisms or bacteria, 66.27% reported some type of digestive upset

Conclusions. 1. The drinking yoghurt and milkshake expended in Ocotlán city are within standard on microbial counts. 2. The physicochemical parameters were acceptable and yogurt according to standard except for a brand pH. 3. The microbiological quality of yogurt was acceptable and within standard. 4. In fermented milks the Mexican standard does not set a minimum amount of lactic acid bacteria per ml of product. 5. All brands of fermented milks containing viable lactic acid bacteria. 6. The storage temperature of fermented milks exceeded the limit set by the standard. 7. The parameters of acidity and pH of fermented milks are in accordance with current regulations, except a mark on the pH. 8. All Sanitary Microbiology of fermented milks was negative and within standard. 9. In the genetic variability of the lactic acid bacteria of fermented milks, the UPGMA dendrogram derived from similarity coefficients calculated by the Jaccard method establishes the existence of four groups of genetic diversity. 10. In the study of perception, but spent fermented dairy product is yogurt.

## **Dedicatoria**

Dedico esta tesis:

A mi esposa **María de Jesús Gutiérrez Cervantes**, ya que sin su comprensión y apoyo no hubiera iniciado, ni terminado este trabajo.

A mi Director **Dr. Radhamés Hernández Mejía**, por su orientación, conocimiento, ayuda y paciencia, fundamentales para la realización de esta investigación.

## INDICE

<b>Certificaciones</b>	
<b>Resumen</b>	
<b>Dedicatoria</b>	<b>1</b>
<b>Índice</b>	<b>2</b>
<b>Introducción</b>	<b>8</b>
1. Justificación	13
2. Planteamiento Teórico	13
3. Definición	15
4. Historia	16
5. Taxonomía Bacterias Acido Lácticas	20
6. Flora Intestinal	26
7. Microorganismos Probióticos	28
8. Métodos de identificación de microorganismos probióticos	31
9. Prebióticos	39
10. Rol de los probióticos en la salud y la enfermedad	41
11. Los probióticos y la Nutrición	47
12. Los probióticos y la Biotecnología	50
13. Marketing de los Probióticos	55
14. Legislación de los Probióticos	58
15. El Futuro de los probióticos	60
<b>Hipótesis</b>	<b>64</b>
<b>Objetivo</b>	<b>65</b>
Objetivos General y particulares	65
<b>Material y Métodos</b>	<b>66</b>
<b>Resultados</b>	<b>83</b>
<b>Discusión</b>	<b>107</b>
<b>Conclusiones</b>	<b>113</b>
<b>Bibliografía</b>	<b>114</b>
<b>Anexos</b>	<b>130</b>
Anexo 1 Medios de cultivo	130

Anexo 2 Soluciones, reactivos y material	144
Anexo 3 Abreviaturas	153

## Índice de tablas y figuras

- Tabla no. 1 Composición de las leches fermentadas
- Tabla no. 2 Hitos en la historia de los alimentos fermentados
- Tabla no. 3 Origen de algunos productos importantes de leches fermentadas
- Tabla no. 4 Características diferenciales de las bacterias acidolácticas
- Tabla no. 5 Características del género *Lactobacillus*
- Tabla no.6 Principales características que permiten la diferenciación de los géneros *Aeriscardovia*, *Bifidobacterium*, *Parascardovia* y *Scardovia* pertenecientes a la familia *Bifidobacteriaceae*
- Tabla no. 7 Microorganismos usados como probióticos
- Tabla no. 8 Medios de cultivo y condiciones para el cultivo y recuento de algunas bacterias lácticas
- Tabla no. 9 Leches fermentadas expandidas en los supermercados de la ciudad de Ocotlán
- Tabla no. 10 Métodos para la identificación y tipificación de especies de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*
- Tabla no. 11 Principales mecanismos de acción propuestos de los Probióticos
- Tabla no. 12 Principales microorganismos probióticos y algunos de sus efectos beneficiosos para la salud
- Tabla no. 13 Requerimientos para estudios clínicos de alimentos probióticos para uso clínico y funcional.
- Tabla no. 14 Rol de los probióticos en la salud y la enfermedad
- Tabla no. 15 Mecanismos de acción de los Probióticos
- Tabla no. 16 Productos tradicionales y otros más modernos con cepas probióticas
- Tabla no. 17 Algunos microorganismos probióticos utilizados en la elaboración de leches fermentadas
- Tabla no. 18 Institutos para información sobre legislación en salud en la Unión Europea
- Tabla no. 19 Leches fermentadas expandidas en los supermercados de la ciudad de Ocotlán

- Tabla no. 20 Análisis fisicoquímico del yogurt en sus versiones cuchareable y de beber
- Tabla no. 21 Análisis organoléptico de los yogurts en sus versiones cuchareable y de beber
- Tabla no. 22 Características Fisicoquímicas, Microbiológicas y Organolépticas del yogurt de beber expendido en la ciudad Ocotlán
- Tabla no. 23 Características Fisicoquímicas, Microbiológicas y Organolépticas del yogurt batido expendido en la ciudad Ocotlán.
- Tabla no. 24 Parámetros fisicoquímicos y bacterias ácido lácticas evaluados de las leches fermentadas expendida en la ciudad de Ocotlán, Jalisco
- Tabla no. 25 Parámetros microbiológicos evaluados de las leches fermentadas expendida en la ciudad de Ocotlán, Jalisco
- Tabla no. 26 Parámetros organolépticos evaluados de las leches fermentadas expendida en la ciudad de Ocotlán, Jalisco
- Tabla no. 27 Parámetros fisicoquímicos y microbianos evaluados de los productos lácteos fermentados expendidos en la ciudad de Ocotlán, Jalisco
- Tabla no. 28 Parámetros sanitarios evaluados de los productos lácteos fermentados expendidos en la ciudad de Ocotlán, Jalisco.
- Tabla no. 29 Parámetros organolépticos evaluados de los productos lácteos fermentados expendidos en la ciudad de Ocotlán, Jalisco.
- Tabla no. 30 Matriz de similaridad de Jaccard
- Tabla no. 31 Perfil bioquímico de las bacterias ácido lácticas aisladas de leches fermentadas expendidas en la ciudad de Ocotlán, Jalisco
- Tabla no. 31 Rangos de edad, ocupación y grado académico de los encuestados sobre preferencias de productos lácteos fermentados
- Tabla no. 32 Variedad, marca y cantidad de productos lácteos y fermentados consumidos por los encuestados sobre preferencias de productos lácteos fermentados

Tabla no. 33 Causa y frecuencia de consumo de productos lácteos fermentados consumidos por los encuestados sobre preferencias de productos lácteos fermentados

Tabla no. 34 Causa y frecuencia de consumo de productos lácteos fermentados consumidos por los encuestados sobre preferencias de productos lácteos fermentados

Tabla no. 35 Percepción de ¿que son y para qué sirven los probióticos? por los encuestados sobre preferencias de productos lácteos fermentados

Tabla no.36 Frecuencia y tipo de alimentos que consumen al día de los encuestados sobre preferencias de productos lácteos fermentados

Tabla no. 37 Número de horas que duermen por día los encuestados sobre preferencias de productos lácteos fermentados

Tabla no.38 Tipo de malestar intestinal padecido por los encuestados sobre preferencias de productos lácteos fermentados

Tabla no. 39 Frecuencia y tipo de uso del baño al día de los encuestados sobre preferencias de productos lácteos fermentados

### **Figuras**

Figura no. 1. Esquema del árbol filogenético de las bacterias LAB, que también incluye algunos aerobios y anaerobios facultativos Gram-positivos

Figura no. 2. Esquema, árbol filogenético sin raíz de las BAL, incluye algunos aerobios y anaerobios facultativos, gram-positivos de la subdivisión baja G+C. Nota: distancias evolutivas son aproximada

Figura no. 3 Procedimientos para el aislamiento y caracterización de cepas nuevas de probióticos

Figura no. 4 Guía para la evaluación de probióticos para uso alimentario FAO/OMS

Figura no. 5 La interacción entre probiótico, prebiótico y flora intestinal

Figura no. 6 Mercado de Probióticos y Prebióticos en Estados Unidos de América

Figura no. 7 Dendograma UPGMA derivado de los coeficientes de similaridad calculados por el método de Jaccard mostrando la relación entre las cepas de Lactobacillus y Bifidobacterias, analizados con RAPDs

## Introducción

La Ciencia es la actividad humana creativa cuyo objetivo es la comprensión de la naturaleza y cuyo propósito es el conocimiento, obtenido por medio de un método científico organizado en forma deductiva, que aspira alcanzar el mayor consenso posible. El viejo problema de la ciencia, ¿cómo se inicia la ciencia?: con observaciones o con teorías. La filosofía de la ciencia se inicia con Aristóteles (384-322 a.C.) quien propuso que la investigación científica se realiza por medio de dos operaciones lógicas, la inducción y la deducción. La primera de ellas consiste en alcanzar principios de aplicación universal a partir de hechos concretos, yendo de lo particular a lo general; en cambio, la segunda operación lógica es derivar instancias específicas partiendo de leyes o proposiciones globales, yendo de lo general a lo particular, Pérez-Tamayo (1989).

Los científicos y los filósofos emplean habitualmente el término genérico “ciencia” para designar todos los conocimientos incluidos en las diversas ramas científicas, y la expresión “método científico” para referirse a los criterios y procedimientos empleados por el hombre de ciencia en la elaboración y desarrollo de sus disciplinas específicas. El uso de estos términos tiene implicaciones connotativas; sugiere implícitamente que los criterios y procedimientos son semejantes en todas las ciencias, Rosenblueth (1994). Rosenblueth manifiesta: creo que estas implicaciones son inaceptables, el grupo de las ciencias es heterogéneo, algunas de las diferencias que existen entre ellas son fundamentales; no dependen solamente del hecho de que estudian clases distintas de fenómenos o de entes, sino también de que tienen propósitos disímolos y aplican por lo tanto métodos de estudio diferentes. Por estas razones no creo que sea posible formular una definición de ciencia que abarque todas sus ramas; tal definición tendría que ser tan general que sería aplicable a muchas actividades no científicas.

Bojalil y Aznavurian (1984), en su capítulo de política y filosofía en la Biología menciona: No puede haber una ciencia sin un grado de compromiso, sobre todo en países sin un grado alto de producción que permita hacer ambas aproximaciones de la ciencia: la básica y la aplicada. La desviación de los hechos científicos concretos a una posición puramente política conlleva atraso, no sólo en

la ciencia básica sino en todo lo que deriva de ella. ¿Quién define la relevancia o irrelevancia de la ciencia? Bojalil y Aznavurian (1984).

¿Qué es la vida, cuál es su origen? ¿Cómo han surgido los seres vivos que nos rodean? La respuesta a estas preguntas constituye uno de los problemas más grandes de la Ciencias Naturales y ha preocupado al pensamiento humano desde los tiempos inmemorables. Al observar a la naturaleza que nos rodea, solemos dividirla en mundo de los seres vivos y mundo inanimado Oparin (1968). El Origen de la Vida trata de explicar en dos teorías opuestas: El Materialismo versus El Idealismo y Religión, la Evolución de la vida, también maneja la dicotomía de la Biogénesis contra la Abiogénesis o generación espontánea.

Las Posiciones Filosóficas Tradicionales Bojalil y Aznavurian (1984), respecto a la naturaleza de la vida son fundamentalmente tres: el vitalismo, el mecanicismo y el organicismo. Estas corrientes claramente no tienen como concepto mucho apoyo entre los biólogos-filósofos, pero uno puede encontrar dentro de las explicaciones que se dan en los trabajos científicos sobre la vida, que se cae en una y otra vez en estas posiciones.

- **Vitalismo.** Esencialmente, el vitalismo sostiene que en todas las cosas vivas existe un principio o factor intrínseco, que no es medible y tampoco observable y que activa la vida. Esta posición no encuentra soporte metodológico y las críticas desde el punto de vista de la filosofía han sido importantes; el vitalismo tiende a abandonarse pero algunos lo reviven a través de las nuevas denominaciones como por ejemplo el neovitalismo o el vitalismo crítico, que se aproxima a la concepción organicista.
- **Mecanicismo.** El nombre indica claramente lo que se quiere definir: Los organismos no son diferentes de las máquinas más finas, los organismos se estructuran a partir de partículas simples, es decir que el todo es la suma de las partes y que están arregladas de tal modo que una fuente de energía interna puede moverlos y que tiene una intencionalidad. Esta explicación se ha modernizado debido a los descubrimientos de la biología molecular. El ADN funcionaría como fuente de energía y tiene la información necesaria que reproduce sin cambios las estructuras de los organismos vivos y sus funciones.

- **Organicismo.** Las funciones de los organismos, se entienden en el todo y no pueden ser comprendidas utilizando las leyes de la física y química, únicamente. El organicismo se ha encontrado también con el problema metodológico al dificultarse la delimitación de problemas que pueden ser sometidos a experimentación. La teoría evolucionista ha tratado de unificar las teorías derivada de la taxonomía y de la ecología incluyendo la relación de los organismos con su medio.

En el mismo sentido la Salud y calidad de vida es una lucha de la Salud contrapuesta a la enfermedad. Las tres teorías o enfoque que pertenecen al paradigma de los microorganismos probióticos son:

- **La Salud:** es un estado completo de bienestar físico, mental y social, y no solamente la ausencia de afecciones o enfermedades.
- **La nutrición:** es el proceso biológico en el que los organismos asimilan los alimentos y los líquidos necesarios para el funcionamiento, el crecimiento y el mantenimiento de sus funciones vitales. La nutrición también es el estudio de la relación entre los alimentos con la salud, especialmente en la determinación de una dieta. Aunque alimentación y nutrición se utilizan frecuentemente como sinónimos, son términos diferentes ya que: La nutrición hace referencia a los nutrientes que componen los alimentos y comprende un conjunto de fenómenos involuntarios que suceden tras la ingestión de los alimentos, es decir, la digestión, la absorción o paso a la sangre desde el tubo digestivo de sus componentes o nutrientes, su metabolismo o transformaciones químicas en las células y excreción o eliminación del organismo. La nutrición es la ciencia que examina la relación entre dieta y salud.
- **La alimentación:** comprende un conjunto de actos voluntarios y conscientes que van dirigidos a la elección, preparación e ingestión de los alimentos, fenómenos muy relacionados con el medio sociocultural y económico (medio ambiente) y determinan al menos en gran parte, los hábitos dietéticos y estilos de vida.

- **La Biotecnología.** Se define como las técnicas o métodos para elaborar productos (alimenticios, farmacéuticos, químicos) utilizando entidades biológicas.

Los Alimentos son cualquier sustrato degradable por los seres vivos, para ellos requieren de un sistema enzimático que provea las enzimas para escindir los productos alimenticios y extraer su energía. Las categorías alimentarias son las proteínas, los carbohidratos, los lípidos y como cofactores las vitaminas y los minerales. Todo ello en un ambiente acuoso. El balance en el consumo en cantidad y diversidad de alimentos, define la dieta diaria de consumo contrastada con el tipo de actividad que desarrolla el humano, y sus necesidades se establecen en una nutrición adecuada. La preocupación principal por los alimentos es su precio, su calidad, su variedad, la facilidad con que se preparan, los efectos del procesado y de los productos químicos añadidos en su salubridad y su valor nutritivo Fenema et al. (2000).

Desde otra perspectiva, la biotecnología de los Alimentos hace el uso de la microbiología, la bioquímica y la ingeniería de una forma integrada con el objeto de utilizar los microorganismos, las células y los cultivos de tejido (o sus partes) para obtener productos útiles. Involucra métodos para asegurar microbiológicamente los alimentos y el uso de los microorganismos en la producción de alimentos, bebidas, aditivos y productos alimenticios. Los microorganismos que involucran directa o indirectamente en los sistemas alimentarios incluyen bacterias, hongos, levaduras y algas. La microbiología industrial, es la base fundamental de la biotecnología, se inició empíricamente con la producción de vino, vinagre, cerveza y sake y con las fermentaciones tradicionales de hongos utilizados en Asia y África para la producción de alimentos. Shetty et al. (2006); Crueger y Crueger (1989).

La presente investigación de la “**Evaluación de la calidad microbiológica, fisicoquímica y los microorganismos probióticos en productos lácteos fermentados comerciales en la ciudad de Ocotlán, Jalisco**”, tiene como objetivo primordial ofrecer un conjunto de elementos de diagnóstico y pronóstico,

que permitan identificar y jerarquizar adecuadamente los productos lácticos fermentados con probióticos.

#### **El estudio nos permite:**

- Caracterizar a los productos lácteos con microorganismos probióticos, la industria que los produce, destacando: la importancia de la misma dentro de la región, su situación y perspectivas de su producción.
- Generar el conocimiento de una realidad de los microorganismos probióticos en los campos de la salud, nutrición, ciencia y tecnología de la ciudad de Ocotlán.
- Detectar los retos, riesgos y oportunidades que ofrece la actual coyuntura económica nacional y mundial, los espacios tecnológicos, productivos y comerciales competitivos, y el proceso de globalización de mercados.
- Identificar nuevas oportunidades de negocios para los productos lácteos con microorganismos probióticos.
- Definir y diseñar esquemas de producción de productos lácteos con microorganismos probióticos.

#### **Del estudio:**

Primero, el estudio está estructurado enfocado a la variedad de productos lácteos con microorganismos probióticos en la ciudad de Ocotlán.

Segundo, se orienta a evaluar dichos productos, aislando, cuantificando y perfilando los microorganismos presentes.

Tercero, genera alternativas de producción de productos lácteos con probióticos. Y finalmente, agrupa conclusiones, que se desprenden del estudio.

#### **Su metodología:**

Para llegar a los resultados del presente se hará acopio de la información a través de la aplicación de un censo del sector comercial de supermercados y autoservicios de la ciudad de Ocotlán. Se realizará un levantamiento del diagnóstico bioquímico, microbiológico y tecnológico de los productos probióticos. Se procesarán los datos para llegar a la identificación, desagregación y agregación, en su caso, de lo relevante. Se realizará el análisis de la misma en

relación con el objetivo que se busca alcanzar y se procederá a su interpretación basándose en la experiencia y a la validación de las mismas fuentes representativas de la industria hasta producir las conclusiones y recomendaciones.

## **1. Justificación**

En la actualidad el consumo de alimentos con microorganismos probióticos se está incrementando exponencialmente, gracias al interés de los consumidores en virtud de tener propiedades de colonizar el tracto intestinal, formar parte de la flora intestinal y con ello generar beneficios en la salud de los consumidores. Bajo esta premisa resulta importante conocer las evidencias científicas que avalen estas características saludables, la cantidad y tipo de microorganismos que están tipificados como probióticos y los productos comerciales, que impactan el sector alimentario en la ciudad de Ocotlán. A la vez conocer los procesos de producción y condiciones de almacenamiento en vida comercial y la efectividad que contengan estos microorganismos.

En este ámbito, es importante un diagnóstico de la variedad y calidad de los productos lácteos con microorganismos probióticos, así como, su beneficio comprobado a la salud e implantación en la flora intestinal. Con esto se coadyuvará, a desmitificar estos productos y dar información veraz al consumidor para que haga compras razonadas de este alimento. Ahora bien, la importancia de este estudio, tendrá repercusiones sociales sobre la población de una región, dado que es el producto que ha crecido en el mercado de los alimentos orgánicos.

## **2. Planteamiento Teórico.**

La Norma CODEX STAN 243-2003 del Codex Alimentarius para leches fermentadas, las define como aquellos productos lácteos obtenidos mediante fermentación de la leche, que pueden haber sido elaborados a partir de productos obtenidos de la leche con o sin modificaciones en la composición, con arreglo a las limitaciones que se estipulan en la sección 3.3 de dicha norma (ver Tabla no. 1), por medio de la acción de microorganismos adecuados y teniendo como resultado la reducción del pH con o sin coagulación (precipitación isoelectrica de las proteínas). Los microorganismos serán viables, activos y abundantes en el

producto hasta la fecha de duración mínima, salvo si el producto es tratado térmicamente tras la fermentación, en cuyo caso no se aplica el requisito de microorganismos viables.

Tabla no. 1. Composición de las leches fermentadas (sección 3.3 composición)

	Leche fermentada	Yogur, yogur en base a cultivos alternativos y leche acidofila	Kéfir	Kumys
Proteína láctea <sup>(a)</sup> (% w/w)	mín 2,7%	mín 2,7%	mín 2,7%	
Grasa láctea (% w/w)	menos del 10%	menos del 15%	menos del 10%	menos del 10%
Acidez valorable, expresada como % de ácido láctico	mín 0,3%	mín 0,6%	mín 0,6%	mín 0,7%
Etanol (% vol./w)				mín 0,5%
Suma de microorganismos que comprenden el cultivo determinado en la sección 2.1 (ufc/g en total)	mín 10 <sup>7</sup>	mín 10 <sup>7</sup>	mín 10 <sup>7</sup>	mín 10 <sup>7</sup>
Microorganismos etiquetados <sup>(b)</sup> (ufc/g en total)	mín 10 <sup>6</sup>	mín 10 <sup>6</sup>		
Levaduras (ufc/g)			mín 10 <sup>4</sup>	mín 10 <sup>4</sup>

(a) El contenido de proteínas es 6,38 multiplicado por el nitrógeno Kheldahl total determinado.

(b) Se aplica cuando en el etiquetado se realiza una declaración de contenido que se refiere a la presencia de un microorganismo específico (aparte de aquellos especificados en la sección 2.1 para el producto en cuestión) que ha sido agrado como complemento del cultivo específico.

Walstra et al. (2001), clasifica a las leches fermentadas en función de diferentes parámetros:

#### A) Según el tipo de fermentación:

1. Fermentación láctica pura: realizada por cultivos iniciadores mesófilos (*Lactococcus lactis cremoris* o *Lactococcus lactis lactis*, *Leuconostoc cremoris* o *lactis*, originando leche acidificada, mazada fermentada, nata acidificada, ymer, langfil y viilli) o por iniciadores termófilos (*Lactobacillus bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus* y/o *Bifidobacterium bifidum*).

2. Fermentación láctica y alcohólica: producida por *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Lactobacillus* y *Saccharomyces* o *Candida kluyveromyces* para producir kefir y kumiss, respectivamente.

#### B) Según el contenido graso:

Siendo entera, semi-descremada o descremada, con eliminación o adición de nata o grasa.

#### C) Según la concentración de la leche:

Existen diferentes variedades de yogur en función de la concentración de la leche que se utilice en su elaboración.

#### **D) Según el origen de la leche:**

La mayoría de las leches fermentadas se realizan con leche de vaca pero también se puede utilizar leche de oveja, cabra, yegua, búfala, etc. El resultado de combinar diferentes parámetros y procesos es la obtención de una gran variedad de leches fermentadas.

Rodríguez Jerez (2012) define al yogur como la leche fermentada que se obtiene de la transformación de la lactosa en ácido láctico, debido a la acción de dos microorganismos, *Lactobacillus bulgaricus* (responsable de la acidificación) y *Streptococcus thermophilus* (responsable de los sabores y aromas característicos), los cuales deben ser viables y estar en las cantidades determinadas por la legislación. Según Condony et al. (1988) e Hidalgo (2001) las leches fermentadas se consumen desde la antigüedad. Ya en los textos bíblicos se encuentran referencias sobre estos productos que al principio se producían de manera espontánea y que pronto empezaron a elaborarse de forma más sistemática, pues además de ser una forma de conservar la leche durante más tiempo, se les atribuían ciertas propiedades benéficas.

### **3. Definición**

Un microorganismo, también llamado microbio u organismo microscópico, es un ser vivo que sólo puede visualizarse con el microscopio. La ciencia que estudia a los microorganismos es la microbiología. Los grupos de microorganismos son las bacterias, las algas, los hongos, los protozoarios y los virus. La relación de los microorganismos con el hombre genera ventajas y desventajas. Los impactos benéficos de los microorganismos son:

1. Producción de alimentos;
2. Probióticos: Suplemento dietético para mejorar la calidad de vida;
3. Conservador natural de alimentos;
4. Producción de antibióticos, enzimas, vitaminas, etc.;
5. Tratamiento de aguas;
6. Conservación de edificios históricos; y
7. Limpieza de suelos.

Los efectos negativos de los microorganismos son:

1. Producción de enfermedades  $\Rightarrow$  Armas biológicas;
2. Deterioro de los alimentos; y
3. Agente contaminante.

Estas correlaciones se pueden estudiar a partir de tres perspectivas:

- I. Microorganismos y enfermedad;
- II: Microorganismos y salud; y
- III. Microorganismos y biotecnología.

El desarrollo o destrucción de los microorganismos en cualquier sustrato, depende de factores ambientales definidos, los parámetros intrínsecos son: el contenidos de humedad ( $A_w$ ), el Potencial de oxido reducción ( $E_h$ ), el contenidos de nutrientes, los constituyentes antimicrobianos y las estructuras biológicas. Además los parámetros extrínsecos son la temperatura de conservación, la humedad relativa del ambiente y la presencia y concentración de gases en el ambiente.

#### **4. Historia**

La historia de los alimentos fermentados se pierde en la antigüedad. Puede haber sido un mero accidente cuando la gente experimenta por primera vez el sabor de los alimentos fermentados. La primera fermentación debe haber comenzado con el almacenamiento de excedentes de leche, lo que resultó en un producto fermentado al día siguiente. Después del secado, la fermentación es el método más antiguo de conservación de los alimentos Farnworth (2008).

La fermentación como proceso, consiste en la transformación de simples materias primas en una gama de productos de valor añadido mediante la utilización de los fenómenos del crecimiento de microorganismos y sus actividades en diversos sustratos, Joshi y Pandey (1999). Esto significa que el conocimiento de microorganismos es esencial para entender el proceso de fermentación. Tal conocimiento sólo existe desde 1680, cuando Antonio Van Leeuwenhoek demostró por primera vez el uso de un microscopio y describe la existencia de microorganismos. Louis Pasteur, en la segunda mitad del siglo XIX, contribuyó significativamente a la comprensión del fenómeno de la fermentación, estableció el papel de los microbios de la fermentación y también demostró que hay diferentes tipos de fermentaciones. Desde el tiempo de Pasteur, se han producido

incrementos en el conocimiento de la microbiología, la bioquímica, la tecnología y aspectos de ingeniería de alimentos de la fermentación de alimentos. En la actualidad, tenemos una gama de alimentos y bebidas fermentadas como leches, cereales, frutas, verduras, pescado, carne y muchos otros productos mezclados, que surgieron en épocas muy tempranas. En el libro “Handbook of Fermented Functional Foods”, editado por Edward R. Farnworth, se da cuenta de la evolución histórica de los productos fermentados, que se presentan en la Tabla no. 2.

Tabla no. 2. Hitos en la historia de los alimentos fermentados

Hito	Desarrollo/localización
Ca. 10,000 A.C.-Era media	Evolución de la fermentación del rescate del excedente. Probablemente por pre-arianos.
Ca. 7,000 A.C.	Practica de la elaboración del queso y el pan
Ca. 6,000 A.C.	Elaboración del vino en Este cercano
Ca. 5,000 A.C.	Descripción del valor de la nutrición y la salud de las bebidas y leches fermentadas
Ca. 3,500 A.C.	Elaboración del pan en Egipto
Ca. 1,500 A.C.	Preparación de la salchicha de carne por los antiguos Babilónicos
2,000 A.C. - 1,200 D.C.	Diferentes tipos de leches fermentadas en diferentes regiones.
Ca. 300 D.C.	Preservación de vegetales por fermentación por los Chinos
500 -1,000 D.C.	Desarrollo de alimentos fermentados basados en cereales-legumbres
1881	Publicación de la literatura de preparación sobre Koji y Sake
1907 P	Publicación del libro Prolongación de la Vida por Eli Metchnikoff describiendo beneficios terapéuticos de leches fermentadas.
1900- 1930	Aplicación de la microbiología para la fermentación, uso de cultivos definidos
1970- presente	Desarrollo de productos conteniendo cultivo probióticos o flora intestinal benéfica

Source: Data compiled from Joshi, V.K. and Pandey, A., Biotechnology: Food Fermentations, Vol. 1, Educational Publishers and Distributors, New Delhi, 1999, 1–24; Pederson, C.S., Microbiology of Food Fermentations, AVI, Westport, CT, 1971, 1–274; IDF, Fermented Milks, IDF Bull., No. 179, 16–32, 1984; Metchnikoff, E., The Prolongation of Life, G.P. Putnam's Sons, New York, 1908; Steinkraus, K.H., Handbook of Indigenous Fermented Foods, Marcel Dekker, Inc., New York, 1983; Padmaja, G. and George, M., in Biotechnology: Food Fermentations, Vol. II, Joshi V.K. and Pandey, A., Eds., Educational Publishers and Distributors, New Delhi, 1999, 523–582.

En el mismo ámbito, los productos lácteos fermentados procedentes de diferentes países se enumeran en la Tabla no. 3.

En el libro Desarrollo y manufactura de yogurt y otros productos lácteos funcionales, editado por Yildiz (2010), expresa que los seres humanos han evolucionado en contacto con la naturaleza, y la primera comida que la naturaleza proveyó al hombre fue la leche. A lo largo de la mayor parte de la evolución de la historia de la humanidad, la única fuente de la leche para el bebé recién nacido era de la madre Campbell y Marshall (1975). Cuando el hombre domestica los animales, primero a la cabra y la oveja, unos 13.000 AC y después de vaca 9.000

AC, la leche de otros mamíferos, se puso a disposición para proporcionar nutrientes esenciales. Desde entonces, jóvenes, viejos, hombres, mujeres, es decir, todos los seres humanos han estado utilizando la leche como alimento Bogart (1977).

Tabla no. 3 Origen de algunos productos de leche fermentada Importante

Producto	País de origen	Periodo	características y el uso
Dahi	India	6000-4000 AC	La leche agria coagulada se come como un alimento, es un producto intermedio para la elaboración de mantequilla y mantequilla clarificada.
Chhash (leche de mantequilla)	India	6000-4000 AC	Diluido dahi o la leche de la mantequilla después batido de dahi en mantequilla que se emplea como bebidas o como comida
Labán zeer/Khad	Egipto	5000-3000 AC	La leche agria, que tradicionalmente se coagula en vasijas de barro.
Leben	Irak	ca. 3000 AC	Leche fermentada que contiene tradicional las bacterias del yogur, suero de leche parcialmente drenado en la horca, la cuajada
Zabady	Egipto y Sudán	2000 AC	Yogur natural tipo, consistencia firme y cocidas sabor
Crema Cultivadas	Mesopotamia	1300 AC	Naturalmente crema agria
Shrikhand	India	400 AC	Leche agria concentrada, dulces y especias; masa semisólida se come con las comidas como plato dulce
Kishk	Egipto y árabes mundo	-	Producto seco fermentado fabricado a partir Labán zeer y trigo hervido nominal; pequeños ronda de piezas irregulares, de color amarillento de color café con textura dura; de alto valor nutritivo con un alto aminoácidos y el contenido de vitamina
Kumys, Kumiss	Asia Central (mongol, Rusia)	400 AC (conocida 2000 AC)	Tradicionalmente de leche yeguas fermentada por lactobacilos y levaduras; espumosos bebidas que contienen ácido láctico, alcohol y dióxido de carbono
Mástil	Irán	-	Yogur natural de consistencia firme y sabor cocinado.
Villi	Finlandia	-	leche fermentada de Alta viscosidad con bacterias ácido lácticas y hongos
Taette	Noruega	-	Leche fermentada viscosos también conocido como cellarmilk
Langfil	Suecia	-	Leche fermentada con limo-producción con cultivos de lactococos
Tattemjolk			
Ymer	Dinamarca	-	leche fermentada fortificada con proteína con <i>Leuconostocs</i> y lactococos; el suero es separados
Skyr	Islandia	870 DC	hecho de leche de oveja con la adición de cuajo y cultivos, concentrada con tecnología de membranas
Prostokvasha	Unión Soviética	-	Leche fermentada hecha desde antigüedad fermentando leche cruda con bacterias lácticas mesófilas
Kéfir	Caucasian	-	Leche fermentada con gránulos de kefir, espumosa producto efervescente con ácidos y gusto alcohólicas
Yogur (Kisle mliako)	China Bulgaria	-	Leche de vaca u oveja fermentada por <i>S. thermophilus</i> y <i>L. bulgaricus</i>
Yogur	Turquía	800 DC	natillas como la leche agria fermentada
Leche búlgara	Bulgaria	500 DC	Leche fermentada muy agria por <i>L. bulgaricus</i> solo o con <i>S. thermophilus</i>
Trahana	Grecia	-	Leche fermentada tradicional de los Balcanes; leche de oveja fermentada mezclada con harina de trigo y desecada.
Churpi	Nepal	-	Leche fermentada, se agita y la mantequilla restante se calienta para formar una cuajada sólida, puede ser desecada.
Airan	Asia Central Bulgaria	1253-1255 DC	La leche de vaca es agriado por <i>Lb. bulgaricus</i> , utilizada como bebida refrescante
Yakult	Japón	1935 DC	Leche fermentada con tratamiento térmico alto, por <i>L. casei</i> cepa <i>Shirota</i> , bebidas y suplemento para la salud

Fuente: Datos de Pederson, CS, Microbiología de los Alimentos Fermentaciones, AVI, Westport, CT, 1971, 1-274; FDI, Leches Fermentadas, Bol. FDI, N ° 179, 16-32; Narayan Yegna AK Aiyar, lechero indio, 5, 77-83, 1953; Koroleva, NS, Bol. FDI, N ° 227, 96-100, 1988; Rasic, JLJ y Kurmann, J.A., Motivación de Yogur-Científico, Tecnología, Manufactura, y los preparativos de las Publicaciones Técnicas Lácteos Copenhague, 1978, pp 11-15.

La importancia de la leche como alimento para los seres humanos, se establece en los siguientes puntos:

a. La domesticación de los animales ha hecho posible que la humanidad tenga una fuente segura de la leche durante todo el año Bogart (1977).

b. La leche ha contribuido en la nutrición de los seres humanos de todas las edades, disminuyendo de mortalidad infantil y aumentando el bienestar de los bebés Campbell y Marshall (1975).

c. El consumo de leche fermentada ha incrementado la estatura de los humanos, la densidad de los huesos, la masa corporal, la longevidad, y el volumen del cerebro adulto (cm<sup>3</sup>) en los últimos 13.000 años De Beer (2004).

Metchnikoff (1908), a principios del siglo XX, cuando la ciencia fue más filosofía que una ciencia empírica, en su libro "The Prolongation of Life, Optimistic studies", observó y después reportó en la literatura científica que los búlgaros tenían una esperanza de vida mayor a 87 años y que cuatro de cada mil vivían más del siglo. El se obsesionó con el estudio de la longevidad y analizó cuidadosamente su ambiente y dieta. Cuando Metchnikoff descubrió que la dieta búlgara consistía principalmente de productos lácteos cultivados, investigó para encontrar las peculiaridades de la leche fermentada que podrían ser responsable de la longevidad observada. El aisló un bacilo de los productos lácteos fermentados. Este organismo producía ácido láctico y era responsable de un sabor agrio en la leche fermentada. Metchnikoff realizó todos sus esfuerzos para estudiar los atributos de este organismo llamado *Bacillus bulgarian*, mas tarde nombrado *Lactobacillus bulgaricus*. Metchnikoff inició las bases científicas del yogurt conocido hoy. Aunque algunas de sus teorías fueron incorrectas y más tarde modificadas, su filosofía de pensamiento estimuló considerablemente el interés en los productos lácteos fermentados.

En el 2001 en una consulta de expertos de la FAO/OMS sobre la evaluación de las propiedades saludables y nutricionales de los probióticos en los alimentos, se comentó: Fueron Metchnikoff y Tissier los primeros en proponer la utilización de bacterias como probióticos, pero este término no se acuñó hasta 1965, cuando Lilly y Stillwell lo utilizaron para designar a las sustancias producidas por microorganismos que promueven el crecimiento de otros microorganismos.

## 5. Taxonomía de las Bacterias Acido Lácticas

La clasificación de las bacterias acidolácticas de Orla-Jensen aún se acepta como método estándar de diferenciación de estos microorganismos. Los de forma esférica (cocoidea) se conocen como "*Streptococcus*" y los bacilos se clasifican como *Thermobacterium*, *Streptobacterium* y *Betabacterium*. Según la séptima edición del Manual Bergey's (1957), todas las bacterias acidolácticas se incluyen en la familia *Lactobacillaceae*, que a su vez se subdivide en *Streptococcaceae* (de forma esférica u ovoide) y *Lactobacillaceae* (de forma bacilar). Esta clasificación ha sido reorganizada en la octava edición del Manual Bergey's (1974), que las considera dos familias separadas: *Streptococcaceae* y *Lactobacillaceae*. En la edición del Manual Bergey's de 1986, los anteriores microorganismos están agrupados en diferentes secciones. Las bacterias acidolácticas (LAB) son un grupo de bacterias Gram-positivas agrupadas por una gran cantidad de características morfológicas, metabólicas y fisiológicas. La descripción general de este grupo de bacterias se incluye en el grupo de Gram-positivos, no esporulados, cocos o bacilos que producen ácido láctico como producto de la fermentación de carbohidratos.

Los límites de este grupo han sido objeto de controversia pero históricamente los géneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, y *Streptococcus* forman el corazón del grupo. Las revisiones taxonómicas de este género y la descripción de nuevos géneros sugieren que las bacterias acidolácticas comprendan los siguientes géneros: *Aerococcus*, *Alloiococcus*, *Carnobacterium*, *Dolosigranulum*, *Enterococcus*, *Globicatella*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Weissella*. El género *Bifidobacterium*, frecuentemente está considerado en el mismo contexto que las bacterias acidolácticas y posee algunas características comunes.

La clasificación de las bacterias acidolácticas en diferentes géneros está basada en la morfología, modo de fermentar la glucosa, el crecimiento a diferentes temperaturas, la configuración del ácido láctico producido, la habilidad para crecer a elevadas concentraciones de sales y la tolerancia ácido-base. Las bacterias

acidolácticas obtienen energía metabólica esencialmente mediante la fosforilación a nivel de sustrato, durante la oxidación de carbohidratos, formando ácido láctico como principal metabolito. Además, poseen actividad proteolítica, lo que les permite la obtención de aminoácidos a partir de proteínas, en medios ricos en dichos constituyentes; aunque ésta es reconocidamente inferior a otros grupos microbianos (*Bacillus*, *Proteus*, *Pseudomonas*...) (ver Tabla no. 4).

Tabla no. 4 Características diferenciales de las bacterias acidolácticas

	<i>Carnob.</i>	<i>Lactob.</i>	<i>Aeroc.</i>	<i>Enteroc.</i>	<i>Lactoc. Vagoc.</i>	<i>Leucon. Oenoc.</i>	<i>Pedioc.</i>	<i>Streptoc.</i>	<i>Tetragenoc.</i>	<i>Weissella</i> <sup>a</sup>
Formación de tétradas	-	-	+	-	-	-	+	-	+	
CO <sub>2</sub> a partir de glucosa <sup>b</sup>	- <sup>c</sup>	±	-	-	-	+	-	-	-	+
Crecimiento a 10°C	+	±	+	+	+	+	±	-	+	+
Crecimiento a 45°C	-	±	-	+	-	-	±	±	-	-
Crecimiento 6,5% NaCl	ND <sup>d</sup>	±	+	+	-	±	-	+	+	±
Crecimiento 18% NaCl	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Crecimiento a pH 4,4	ND	±	-	+	±	±	+	-	-	±
Crecimiento a pH 9,6	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-
Acido Láctico <sup>e</sup>	L	D,L,DL <sup>f</sup>	L	L	L	D	L,DL <sup>f</sup>	L	L	D,DL <sup>f</sup>

+ positivo; - negativo; +/- respuesta en varias especies; ND: no determinado.

a: algunos tipos de *Weissella* también poseen forma bacilar.

b: test para homo- o heterofermentadores de glucosa; negativo y positivo denota homofermentativo y heterofermentativo, respectivamente.

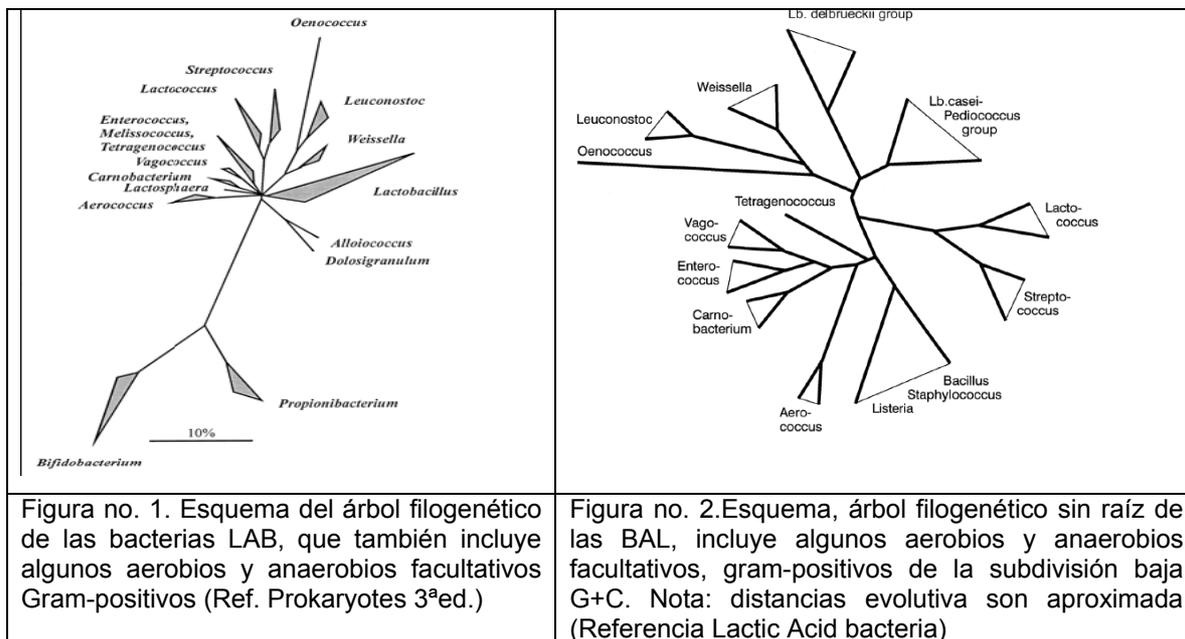
c: pequeñas cantidades de CO<sub>2</sub> pueden ser producidas, dependiendo del medio.

d: no crecimiento en 8% NaCl

e: Configuración de ácido láctico producido a partir de glucosa.

f: Producción de ácido láctico D-, L- o DL- entre varias especies.

Las comparaciones de la secuencia de rRNA son consideradas como una medida óptima para determinar las verdaderas relaciones filogenéticas entre las bacterias Woese (1987). Inicialmente, estas comparaciones fueron realizadas con hibridaciones de DNA-rRNA o por catalogación de oligonucleótidos. Los avances en las técnicas moleculares han encabezado los métodos de secuenciación de fragmentos largos de rRNA, primero mediante el uso de la transcriptasa inversa Lane et al. (1988) y por la secuenciación directa por PCR (reacción en cadena de la polimerasa) de los genes de rRNA. Los bancos de datos genéticos disponibles para agrupar las grandes cantidades de secuencias hacen posible construir amplios árboles filogenéticos Woese (1987). Los datos obtenidos demuestran que la pared celular Gram-positiva posee una fuerte relevancia filogenética. Todas las bacterias Gram-positivas se agrupan en uno de los 11 principales taxones Woese (1987).



La composición global del DNA, entendida como el porcentaje de cada una de las bases presentes en la secuencia y expresada normalmente en % de moles G+C, es uno de los parámetros que caracterizan el genoma. Sin embargo, su valor taxonómico es limitado ya que, aunque diferencias importantes en dicho porcentaje son indicativas de la existencia de divergencia filogenética, la determinación de valores similares no lleva implícita una relación de proximidad. Pese a ello, es una de las características requeridas para la delimitación de especies y géneros Stackebrandt et al. (1992).

**Género *Lactobacillus*.** Los lactobacilos se encuentran ampliamente distribuidos en los vegetales, carnes y pescados. Forman parte de la flora normal de la boca, tracto intestinal y aparato reproductor femenino humano y de muchos animales. No son considerados patógenos (excepto algunas especies que parecen intervenir en la caries dental). Tienen una gran importancia industrial, pues se utilizan en diversos procesos de fermentación láctica (yogur, quesos...). Intervienen también, en la fabricación de productos derivados de los vegetales (pepinillos, aceitunas...). Son bacilos largos con morfología cocobacilar y corineforme. Es frecuente la formación de cadenas. Son Gram-positivos, inmóviles, aunque existen unas pocas especies móviles por flagelos peritricos. No son esporulados. Son sacarolíticos

obligados. Su característica principal es la de fermentar azúcares con producción de ácido láctico, pudiendo ser homofermentadores u heterofermentadores. Su crecimiento se ve favorecido por la anaerobiosis o por tensiones de oxígeno reducidas. Crecen entre 2°C y 53°C, aunque su temperatura óptima es de 30-40°C. Son acidúricos, creciendo óptimamente a pH comprendidos entre 5,5-6,2. Se han descrito siete grupos serológicos (A-G) de lactobacilos, basándose en sus determinantes antigénicos específicos. Se han descrito más de 102 especies y la especie tipo es *Lactobacillus delbrueckii* que pertenece al grupo E. Tabla no. 5: Características del género *Lactobacillus.*, adaptado de Axelsson (2004).

Tabla no. 5: Características del género *Lactobacillus*

CARACTERÍSTICAS	GRUPO I Homofermentativos Obligados	GRUPO II Heterofermentativos Facultativos	GRUPO III Heterofermentativos Obligados
Fermentación de pentosas	-	+	+
CO <sub>2</sub> a partir de glucosa	-	-	+
CO <sub>2</sub> a partir de gluconato	-	+ <sup>a</sup>	+ <sup>a</sup>
Presencia de aldolasa	+	+	-
Presencia de fosfoacetolasa	-	+ <sup>b</sup>	+
	<i>Lb. acidophilus</i>	<i>Lb. casei</i>	<i>Lb. brevis</i>
	<i>Lb. delbrueckii</i>	<i>Lb. curvatus</i>	<i>Lb. buchneri</i>
	<i>Lb. helveticus</i>	<i>Lb. plantarum</i>	<i>Lb. fermentum</i>
	<i>Lb. salivarius</i>	<i>Lb. sake</i>	<i>Lb. reuteri</i>

a: cuando fermentan

b: inducible por pentosas

Fuente: Adaptado de Sharpe, Kandler y Weiss)

Requieren medios nutricionales complejos, con aminoácidos, péptidos, derivados de ácidos nucleicos, vitaminas, sales, ácidos grasos y carbohidratos fermentables. El medio de cultivo más empleado es el medio MRS descrito por Man, Rogosa y Sharpe en 1960. El medio MRS está especialmente recomendado para la enumeración y mantenimiento de bacilos lácticos, ya sea por la técnica del número más probable (NMP) en caldo o por siembra en masa.

**Género *Streptococcus*.** Existen más de 66 especies y la especie tipo es *Streptococcus pyogenes*, pero la única especie de estreptococos que está asociada a la tecnología alimentaria es *Streptococcus thermophilus*, que se emplea en la fabricación del yogur (junto con *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* y con otros microorganismos *Lb. casei*; *Lb. acidophilus*; *Bifidobacterium*). *Streptococcus thermophilus* fue descrito por primera vez por

Orla-Jensen en 1919. Su nombre procede del término griego “therme” que significa calor y del término “philus” que significa afinidad. Son células esféricas u ovoides de 0,7-0,9  $\mu\text{m}$  de diámetro, distribuidas en parejas o formando cadenas. Son anaerobios facultativos, quimioorganotrofos con metabolismo fermentativo. Son catalasa negativos. Crece con un 2,5% de cloruro sódico pero no con un 4%. No crece a pH superiores a 9,6 ni en leche que posea un 0,1% de azul de metileno. La temperatura mínima de crecimiento es de 19-21°C. La resistencia al calor, la habilidad para crecer a 52°C y el conjunto de carbohidratos que puede fermentar, distingue a *Streptococcus thermophilus* de otros muchos estreptococos. *S. thermophilus* está incluido dentro del grupo "otros estreptococos" por Schleifer y Kilpper-Bälz (1987), pero se encuentra actualmente dentro del grupo de los estreptococos orales Hardie y Whiley (1995). Farrow y Collins propusieron que *S. thermophilus* fuera considerado como una subespecie de *S. salivarius* porque su homología DNA-DNA era mayor del 70%, de esta forma fue aceptado el nombre de *S. salivarius subsp. thermophilus*.

El medio más empleado para el aislamiento, mantenimiento o cultivo e identificación de estreptococos relacionados con productos lácteos es el agar M-17 que fue desarrollado por Teragazhi y Sandine en 1975, pero posteriormente Shankary Davies (1977) demostraron su eficacia del medio para el aislamiento selectivo de *Streptococcus thermophilus* del yogur.

**Género *Bifidobacterium*.** Ishibashi y Shimamura (1993): Bifidobacteria fueron descubiertas en 1899 por Tissier en el Instituto Pasteur, París, Francia. Estas bacterias fueron encontradas por ser un componente predominante de la flora intestinal en infantes alimentados de pecho. Orla-Jensen (1924) fue el responsable de la dirección en la historia de la taxonomía de las bifidobacterias y reconoció la existencia del género *Bifidobacterium* como un taxón separado, pero con muchas similitudes al género *Lactobacillus*, al que las bifidobacterias fueron incluidas en la séptima edición del Manual Bergey's (1957). La clasificación e identificación de los microorganismos que se basaba en la morfología cambió su criterio; así la fisiología, los requerimientos nutricionales y las características metabólicas y enzimáticas pasaron a tomar una mayor relevancia.

Actualmente la familia Bifidobacteriaceae se encuentra formada por los géneros *Bifidobacterium*, *Gardnerella*, *Aeriscardovia*, *Parascardovia*, *Scardovia*.

Tabla no. 6: Principales características que permiten la diferenciación de los géneros *Aeriscardovia*, *Bifidobacterium*, *Parascardovia* y *Scardovia* pertenecientes a la familia Bifidobacteriaceae.

Adaptado de, Simpson et al., (2004).

	<i>Aeriscardovia</i>	<i>Bifidobacterium</i>	<i>Parascardovia</i>	<i>Scardovia</i>
Crecimiento en aerobiosis	+	(+)	-	-
Temperaturas de crecimiento (°C)	30-46	25-46	27-44	27-44
Alargamiento de las células después de exposición al oxígeno	+	d	+	+
Arabinosa	+	d	d	-
Celobiosa	-	d	+	-
Lactosa	-	d	+	D
Maltosa	+	d	+	+
Mannitol	-	d	-	-
Mannosa	(+)	d	-	-
Melézitosa	d	d	-	D
Rafinosa	+	d	d	D
Sacarosa	d	+	+	+
Salicina	+	d	+	D
Sorbitol	-	d		
Trehalosa	-	d	d	-
Xylosa	d	d	-	+

+ : Respuesta positiva; (+) : Respuesta débilmente positiva; - : Respuesta negativa; d : Respuesta variable

La morfología de la familia consiste en bacilos pleomórficos que se presentan individualmente, en cadenas o en grupos. Las células no tienen cápsula y no forman esporas, no son móviles ni presentan filamentos. Todas las especies son grampositivos a excepción de *G. vaginalis* que presenta un gram variable. Son anaerobios, algunas especies de *Bifidobacterium* pueden tolerar el oxígeno únicamente en presencia de CO<sub>2</sub>, y *Gardnerella* es anaerobia facultativa. No utilizan el indol, no hidrolizan la gelatina, catalasa y oxidasa negativas. El crecimiento óptimo se sitúa entre 35–39°C.

La clasificación de las bifidobacterias ha sido modificada a lo largo de la historia desde que se descubrió en 1899 el microorganismo denominado *Bacillus bifidus*; y que en la actualidad representa al género *Bifidobacterium* como especie tipo con el nombre de *Bifidobacterium bifidum*. En los últimos años han aparecido nuevas cepas y se han reclasificado, en la actualidad el género se encuentra formado por un total de 28 especies.

## 6. Flora Intestinal

Fernández-Escartín (2009a) comenta, que antiguamente se creía que la mayoría de las bacterias presentes en las heces se encontraban muertas. El mejoramiento de las técnicas de muestreo y análisis para microorganismos anaeróbicos permitió recuperar al menos el 90% de los microorganismos detectados en el examen microscópico directo. También es un hecho bien conocido en la actualidad, que la administración oral de antibióticos de amplio espectro altera la flora intestinal y puede inducir diarrea. Se estima que existen alrededor de 100 trillones (el autor probablemente se refiere a  $10^{14}$ ) de bacterias viables en el contenido intestinal de un adulto distribuidas entre 100 especies distintas Mitsuoka (1996); otros anotan más de 500 especies entre 190 géneros Wilson (2005). Pueden distribuirse en tres grupos:

1. Bacterias lácticas: *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* y *Streptococcus*.
2. Anaerobios estrictos: *Bacteroidaceae*, *Eubacterium*, *Peptococcaceae*, *Veillonella*, *Ruminococcus*, *Megasphaera*, *Gemmiger*, *Clostridium* y *Treponema*.
3. Anaerobios facultativos: *Enterobacteriaceae*, *Corynebacterium*, *Staphylococcus*, *Bacillus* y levaduras.

Salminen (2000), la microflora intestinal es variable en número y composición entre el estómago, intestino delgado y colon, En estómago es inferior a  $10^3/g$ , por el bajo pH, en intestino delgado en la región ileocecal están en un rango entre  $10^4/ml$  a  $10^6/10^7$ , Gorbach et al. (1967). El factor limitante de crecimiento en el intestino delgado es el tránsito rápido del contenido y ciertas secreción como la bilis. El intestino grueso está intensamente poblado con  $10^{11}$  a  $10^{12}$  por gramo Finegold et al. (1983). Escalante (2001) establece: El tubo digestivo del recién nacido es un medio estéril. Cuando el niño finaliza la alimentación materna, la microbiota cambia progresivamente hacia una composición parecida a la de los adultos, apareciendo microorganismos como *Bacteroides* spp. y otros anaerobios estrictos que se vuelven también predominantes en el intestino delgado. El desarrollo de la microflora intestinal en los bebés recién nacidos y los cambios ocurridos con la edad fueron estudiados por Mitsuoka y Hayakama (1973), Yuhara et al. (1983), Benno et al. (1984), Yoshioka et al. (1991) y otros.

También hay interés reciente en el uso de varias cepas de bacterias ácido lácticas como probióticos, ejemplo: alimentos con preparaciones viables o suplementos dietéticos para la salud de animales y humanos. Las bacterias ácido lácticas fueron originalmente definidas ciertas especies de *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus* y *Pediococcus*, citado en Hammes and Tichaczec (1994). Sin embargo recientemente estudios de taxonomía, generaron nuevos géneros. Vinculados con la flora intestinal encontramos a los microorganismos (probióticos), que ofrece una potencial aplicación en la prevención contra las infecciones intestinales, algunos productos fermentados son fuente importante de estos microorganismos Fernández-Escartín (2009a) y Vaughan et al. (2002). Las cepas utilizadas generalmente pertenecen a especies de los géneros *Lactobacillus*, *Enterococcus* y *Bifidobacterium* Álvarez-Olmos y Oberhelman (2001) y Macfarlane y Cummings (1999). La etiología de las diarreas infecciosas agudas es muy diversa incluye bacterias, virus y parásitos, una sola terapia no puede ser efectiva para todos los casos. Independientemente del origen, muchos de los episodios son agudos y autolimitantes. El síndrome diarreico es el principal daño que se asocia con el consumo de alimentos de deficiente calidad sanitaria. Las evidencias disponibles estimulan a numerosos investigadores, hacia el desarrollo de estudios que permitan aprovechar los beneficios potenciales que estos microorganismos ofrecen en ese y otros aspectos de la salud humana. Estos incluyen, los nutricionales (mayor digestibilidad de proteínas, disponibilidad de minerales, síntesis de vitaminas); terapéuticos (trastornos gastrointestinales, tolerancia a la lactosa, supresión de enzimas procarcinogénicas), y profilácticas (cuadros diarreicos por diversas causas; modulación de la respuesta inmune), Fernández-Escartín (2009a); Torres-Vitela (2002); Katelaris (1966).

Se clasifican de probióticos aquellos microorganismos que administrados al hombre o animales dan lugar a efectos benéficos a través de una modificación de la actividad de la microflora nativa. La actividad de estos microorganismos es permanente y establece una compleja, pero operativa relación con las funciones propias de los tejidos o vísceras involucradas. Típicamente un probiótico es un habitante normal del sitio en donde se pretende establecer; de ahí que manifieste

capacidad para sobrevivir y mantenerse activo. No solo no es patógeno, sino ejerce un efecto saludable en el huésped. El efecto puede ser logrado por más de una cepa de géneros distintos. El consumo de  $10^{11}$  bacterias probióticas/día pueden disminuir la incidencia, duración y severidad de algunas enfermedades intestinales. La mayoría de los productos comerciales que contienen bacterias probióticas consisten en *Lactobacillus* (*L. acidophilus*, *L. johnsonii*, *L. casei*, *L. rhamnosus*, *L. gasseri* y *L. reuteri*), y *Bifidobacterium* (*B. bifidum*, *B. longum* y *B. infantis*). Los probióticos más estudiados incluyen especies de Bacterias ácido lácticas (BAL) como *Lactobacillus* (*acidophilus*, *casei*, *bulgaricus*), y *Bifidobacterium* (*bifidum*, *longum*, *breve*, *infantis*, *animalis*), Fernández-Escartín (2009).

Salminen (2000): Dos de los principales géneros de bacterias involucrados en influenciar las funciones de la barrera intestinal son las bacterias ácido lácticas y bifidobacterias. Estas pueden ser dadas con alimentos tales como yogurt y otras leches fermentadas y ciertas cepas brevemente se establecen en el intestino. Los lactobacilos específicamente estimulan el crecimiento de bifidobacterias en el intestino y decrecen el número de clostridios y otras bacterias dañinas. Datos clínicos sólidos han aparecido rápidamente para soportar los beneficios a la salud de los probióticos específicos. Se ha mostrado que los probióticos pueden aliviar o prevenir desordenes intestinales y reducir el riesgo de algunas enfermedades intestinales, modificando microflora intestinal y sus metabolitos, incluyendo ácido grasos de cadena corta y componentes antimicrobianos.

## **7. Microorganismos Probióticos.**

La Organización para la Agricultura y la Alimentación de las Naciones Unidas (FAO) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) definen los probióticos como “microorganismos vivos que cuando son administrados en cantidades adecuadas confieren un beneficio a la salud del huésped”. Esta definición refleja el hecho de que los probióticos pueden ser enfocados no solamente al intestino, sino también la cavidad bucal, la nasofaringe, el estómago, la vagina, la vejiga y la piel. No obstante no hay mucha aceptación de la comunidad científica médica Reid (2005).

El término “probiótico” surge en el año 1965, cuando Lilly y Stilwell lo utilizaron para describir aquellas sustancias secretadas por un microorganismo que estimula el crecimiento de otro, en contraposición al término “antibiótico. Parker (1974) Fue el primero en usar “probióticos” de acuerdo con el sentido que hoy conocemos, es decir, organismos y sustancias que contribuyen al equilibrio intestinal. Fuller (1989) Intentó mejorar la definición hecha por Parker, y definió “probiótico” como cualquier suplemento alimenticio vivo que beneficia al huésped mediante la mejora de su equilibrio microbiano intestinal.

Havennaar y Huis In't Veld (1992), definen los probióticos como un cultivo mono o mixto de microorganismos vivos aplicados a animales o humanos, benefician al hospedero mejorando las propiedades de la microflora endógena. El grupo de trabajo europeo de la ILSI (International Life Sciences Institute) (1998), los define como un suplemento alimenticio de microorganismos viables, los cuales influyen benéficamente la salud del huésped. Diplock et al (1999), los probióticos son un alimento funcional si demuestran afectar benéficamente una o más funciones en el cuerpo, además de la nutrición, es una vía relevante para proveer estado de salud y bienestar y/o reducción de riesgo de enfermedad. Naidu et al. (1999) menciona que es un coadyuvante microbiano de la dieta que afecta benéficamente la fisiología del huésped por la modulación del sistema inmune y la mucosa, proveyendo un balance microbiano y nutricional en el tracto intestinal. Tannock et al. (2000), observó que el consumo de probióticos a largo plazo, no se asoció con cambios drásticos en la composición de la microbiota intestinal y así, propuso una definición alternativa, células microbianas las cuales transitan el tracto gastrointestinal y las cuales dan beneficio a la salud del consumidor. Schrezenmeir y de Vrese en (2001), define probióticos como una preparación de un producto conteniendo microorganismos definidos viables en suficiente número, los cuales alteran la microflora (por implantación o colonización) en un compartimento del huésped y que ejerce efectos benéficos en la salud de su huésped, Amores et al.(2004). Hoy se define como microorganismos vivos, principalmente bacterias, usados en forma de suplementos nutricionales que, tras ser ingeridos en cantidad suficiente, mejoran el equilibrio microbiano en el intestino de las personas o

animales que los ingieren, provocando efectos beneficiosos sobre su salud, más allá de los efectos nutricionales tradicionales.

Los Probióticos son un cultivo puro o mezcla de microorganismos vivos, que aplicados al hombre o animales aportan efectos benéficos al huésped mejorando las propiedades de la microflora nativa. Se usa en alimentos lácteos, alimentos para bebés, productos a base de jugos de frutas, productos a base de cereales, y farmacológicos. Las características es ser habitante normal del sitio de aplicación, una cepa capaz de ejercer un efecto benéfico en el huésped, no patógena, no toxigénica, contener números elevados de células viables, capaz de sobrevivir y metabolizar en el ambiente intestinal. Para la selección del microorganismo se contempla ser habitante normal del intestino, huésped específico, historia de uso como cultivo iniciador, tolerancia a la bilis, estable durante producción y almacenamiento, crecimiento en leche (para cultivar productos), beneficios a la salud y nutricionales. Las bacterias ácido lácticas probióticas, deben ser ácido tolerantes, tener resistencia (lisozima, jugos gástricos, fluidos duodenales, sales biliares), sobrevivir a la movilidad intestinal y adherencia a la mucosa gástrica. Los beneficios que aporta son: mantener la flora intestinal normal y la microflora urogenital, aligerar la intolerancia a la lactosa, reducción de colesterol sérico, actividad anticarcinogénica, estimulación del sistema inmune, mejoramiento en el valor nutricional de alimentos Lee et al. (1999), Salminen et al. (1998). Syers (1993). En la Tabla no. 7 se listan los microorganismos utilizados como probióticos.

Tabla no.7. Microorganismos usados como probióticos  
Alvarez-Olmos y Oberhelman, (2001) y Macfarlane y Cummings, (1999)

<i>Lactobacillus</i> spp.	<i>Bifidobacterium</i> spp.	<i>Lactococcus</i> spp.	<i>Streptococcus</i> spp.	<i>Enterococcus</i> spp.	<i>Bacillus</i> spp.	Otras especies
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>L. lactis</i>	<i>S. thermophilus</i>	<i>E. faecium</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>Saccharomyces</i>
<i>L. lactis</i>	<i>B. longum</i>	<i>L. cremoris</i>	<i>S. lactis</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>B. coagulans</i>	<i>Cerevisiae</i>
<i>L. bulgaricus</i>	<i>B. infantis</i>	<i>L. diacetylactis</i>				<i>Saccharomyces</i>
<i>L. rhamnosus</i> GG	<i>B. breve</i>					<i>Boulardi</i>
<i>L. casei</i>	<i>B. lactis</i>					
<i>L. kefir</i>	<i>B. adolescentis</i>					<i>Leconostoc</i> spp.
<i>L. brevis</i>						
<i>L. reuteri</i>						
<i>L. helveticus</i>						
<i>L. plantarum</i>						
<i>L. johnsonii</i>						
<i>L. salivarius</i>						

Refugio Torres Vitela (2000), comenta de las Bacterias Ácido Lácticas (BAL), que su uso tradicional ha sido proporcionar a los productos lácteos la textura, aroma,

sabor, calidad preservativa y valor nutricional; además algunos contribuyen a mejorar la salud del huésped. Esto hace que estén involucrados en la elaboración de alimentos funcionales. Las bacterias ácido lácticas (BAL) se han usado en el tratamiento del sistema inmunológico, digestivo y circulatorio, en la prevención del cáncer y enfermedades transmitidas por microorganismos como diarreas, vaginitis, etc. Ohigashi (1996).

Dentro de la aplicación de probióticos para el humano podemos englobar los efectos benéficos en tres grupos:

- 1) Antimicrobianos, se refiere a acciones sobre microorganismos;
- 2) Bioquímicos, incluyen; la reducción de enzimas fecales, disminución de intolerancia a la lactosa y reducción del colesterol sérico; y
- 3) Fisiológicos e Inmunológicos, se refiere a la influencia sobre la respuesta del huésped, estimulación del sistema inmune y reducción del riesgo de cáncer de colon Refugio Torres Vitela (2002).

## **8. Métodos de identificación y/o aislamiento de microorganismos probióticos.**

Kun Lee y Salminen (2009), proponen varios géneros de bacterias y hongos como cultivos probióticos, aunque los más comúnmente utilizados son las especies de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*. Sin embargo, la selección de una cepa que se utilizará como un probiótico efectivo es un proceso complejo. El trabajo comienza con la fuente de la detección de las cepas, el enfoque más adecuado sigue siendo el ambiente intestinal natural. Según la guía de la FAO/OMS es necesario identificar el microorganismo a nivel de especies/cepa, dado que la evidencia sugiere que los efectos probióticos son cepa específica. Se recomienda emplear una combinación de técnicas genética y fenotípica para llevar a cabo la identificación, clasificación y tipificación. Para la nomenclatura de las bacterias, deben ser empleados nombres científicamente reconocidos y se recomienda depositar las cepas en una colección de cultivos reconocida internacionalmente. La caracterización adicional de las cepas debe llevarse a cabo teniendo en cuenta los aspectos de probióticos o "Funcional" y la evaluación de la seguridad. Las

pruebas in vitro, son útiles para adquirir conocimientos de las cepas y mecanismos del efecto probiótico.

La selección de una cepa para ser utilizado como un probiótico eficaz para consumo humano, es ampliamente aceptado que un probiótico humano efectivo debe ser de origen humano, la fuente más adecuada es el tracto gastrointestinal (TGI) humano. Las técnicas moleculares han permitido la identificación rápida y precisa y la tipificación de nuevas cepas de probióticos, ofreciendo nuevas maneras para comprobar su presencia y seguimiento de su desarrollo. No obstante, para la caracterización microbiana, una combinación polifásica de ensayos fenotípicos y técnicas moleculares se prefiere, ya que estos métodos pueden proporcionar resultados complementarios. Por otro lado, varias pruebas in vitro e in vivo han sido encontrada que son útiles para la detección de nuevas cepas con propiedades probióticas putativo. En general, las características probióticos son cepa-dependiente y propiedades no están todas presentes simultáneamente en una sola cepa. Es de destacar que la realización de la eficacia y seguridad de un probiótico debe ser validado en ensayos clínicos, fase2, asignatura pendiente para la mayoría de las cepas probióticas actuales.

El empleo técnicas moleculares para la detección, identificación o seguimiento en el tracto gastrointestinal (GI) de una bacteria probiótica, representa un paso importante, no solo de la estructura microbiana de la flora intestinal del humano, sino que también sobre el impacto del consumo de cepas probióticas sobre la ecología microbiana del tracto GI y su relación con los efectos benéficos hacia la salud y nutrición humana asociada a una cepa en particular, Escalante (2000); Agarwal (2008); Brigidi, et al.(2002).

La selección de una cepa como probiótico requiere que sus efectos fisiológicos benéficos sean demostrados científicamente, que sea de origen humano y segura para uso humano, estable al ácido y la bilis, y se adhiera a las células de la mucosa intestinal, así como, excluya o reduzca la presencia de agentes patógenos y colabore en la formación de una flora normal equilibrada Salminen et al (1998).

Alimentos fermentados conteniendo cepas selectivas de probióticos son solicitados porque contienen varios beneficios terapéuticos. Varios medios podrían

ser usados para el recuento selectivo de los probióticos, sin embargo, es necesario desarrollar investigaciones para desarrollar un medio para aislamiento del espectro total de las especies presentes Shah (1997); Fasoli et al. (2003); Dave y Shah (1996); Tharmaraj y Shah (2003).

Fernández-Escartín (2009b), establece que en el alimento fermentado las condiciones para la supervivencia y desarrollo de los microorganismos patógenos suelen ser precarias. Los medios de cultivo y condiciones para el cultivo y recuento de algunas bacterias lácticas se muestran en la Tabla no.8.

En los microorganismos gastrointestinales, Guaimense y Reyes-Gavilán (2009), se debe de promover estudios para conocer la relación entre la microbiota intestinal y el bienestar. Desafortunadamente, nosotros aún estamos lejos de conocer la composición cualitativa y cuantitativa de la microbiota intestinal y los factores que gobiernan su composición en un individuo. Metodologías dependientes e independientes del cultivo, han sido usadas para evaluar la microbiota intestinal.

Tabla no. 8. Medios de cultivo y condiciones para el cultivo y recuento de algunas bacterias lácticas

Bacterias	Medios	Incubación °C	Tiempo
<i>S. cremoris</i> y <i>S. lactis</i>	Elliker y APT	32 21-22	48 h ó 5 días
<i>S. trhermophilus</i>	M17	37	48 h
<i>L. burgaricus</i> y <i>L. helveticus</i>	MRS	37	3 días
<i>L. acidophilus</i>	MRS, APT ó LBS	37	3 días
<i>L. citrovorum</i>	APT	32	2-3 días
<i>S. diacetilactis</i>	Elliker	32	2-3 días

Las técnicas actuales para la identificación, taxonomía, clasificación y Tipificación de bacterias, de cepas de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, así como, la caracterización in vitro de cepas probióticas sobre la base de aspectos funcionales se presentan en las tablas no. 9 y 10, Kun-Lee and Salminen, (2009).

Tabla no. 9 Métodos para la identificación y tipificación de especies de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*. Kun-Lee and Salminen, (2009).

Método	Objetivo	Resultados	Ventajas	Limitaciones
Fenotipificación	metabolismo celular	Identificación y biotipificación	No requiere equipo especiales	Estandarización de condiciones de lectura y de cultivo para Variabilidad fenotípica
Perfil proteico de la célula	Total proteínas de las células	Identificación	fácil de realizar, alta repetitividad	Laborioso, necesidad de cepas de referencia
Perfiles FAME	Ácidos grasos	Identificación	Baratos	equipos especiales y conocimientos técnicos necesarios, para tratamiento matemático de los resultados
PCR especie-específicos/PCR múltiple	Genes rRNA regiones terminal, intergenica, otros genes	La identificación de cepas individual/múltiples, la detección de especies y cepas microbiana	Muy reproducible, rápido y disponibilidad de primers de mayoría de las especies, la posibilidad de la secuenciación	Sólo pocas especies pueden ser detectados a la vez; miembros desconocidos no identificados, requiere datos de secuencia p/diseño de primers específicos
ARDRA	operones rRNA	identificación, tipificación	Simple, la digestión con muchas enzimas de restricción.	Disponibilidad de secuencias de genes de ARNr
Secuencias ARNr 16S	Genes ARNr	identificación, relaciones filogenético	Simple, secuencia de Fragmentos de PCR y comparación de secuencias, disponibilidad de muchos primers "universal" y específicos	Ausencia de una definición clara de especies genéticos.
Amplificación por PCR y secuenciación de genes	RecA, groESL, dnaK hsp60, tuf, etc.	Identificación y tipificación	Mejor resolución p/bacterias que secuencias 16S ARNr	disponibilidad de secuencias
Ribotipificación	genes rRNA	Identificación y tipificación	identificación automática (RiboPrinter, Qualicon, DuPont)	Laborioso, excepto automatizados, alta conservación de operones ARNr, equipo caro
DGGE, TGGE	gen 16S ARNr, otros genes	Identificación de bacterias, tipificación de comunidades microbianas	Gran número de muestras analizada al mismo tiempo; Considera información taxonómicas superiores sobre bandas desconocidas	Sesgos PCR, co-migración de diferentes especies; especies dominantes; copias heterogéneo de operones rDNA; eficiencia lisis y extracción
PFGE	Genoma entero	Tipificación	Alta resolución y reproducibilidad, uso de muchas enzimas de restricción	Laborioso, consumo de tiempo, análisis de pequeño número de muestras
AFLP	Genoma entero	Tipificación	alta reproducibilidad	laborioso, consumo de tiempo, habilidad técnica, estandarización necesaria, caro
AP-PCR, RAPD	Genoma entero	Identificación y tipificación	Simple, fácil de realizar, muchos primers, barata	Baja repetibilidad, pequeña número de bandas
ERIC-PCR	Genoma entero	Tipificación	sensibilidad y especificidad, simple, simultánea comparación de muchas muestras	Sesgos PCR prejuicios, cuidado con estandarización de la técnica
REP-PCR	Genoma entero	Tipificación	simple, basado en la técnica PCR	PCR sesgos
TAP-PCR	Genoma entero	Tipificación	variante RADP, 18 Mer oligonucleótido con posición degenerada 3'terminal, más reproducibilidad	PCR sesgos
RISA, ARISA	región espaciador intergénicas rRNA	Tipificación de bacterias, toma de huellas de estructura comunidad microbiana	Altamente reproducible; automatizado	Sesgos PCR, requiere grandes cantidades de ADN
Matrices de hibridación	genes 16S ARNr, toda genoma, genes específico	detección bacteriana y análisis de comunidad en ambientes complejos	Alto poder de identificación; miles de genes pueden analizar y análisis automatizado	Laborioso, costoso, y en primera etapa de desarrollo

FAME: Ester metal ácidos grasos (fatty acids methyl ester); ARDRA: Análisis de restricción de DNA ribosomal amplificado (amplified ribosomal DNA restriction analysis); DGGE, TGGE: Electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización, Electroforesis en gel con gradiente de temperatura (denaturing gradient gel electrophoresis, thermal gradient gel

electrophoresis); PFGE: Electroforesis en gel de campos pulsados (pulsed field gel electrophoresis); AFLP: Polimorfismos de fragmentos amplificados (amplified fragment length polymorphism); AP-PCR, RAPD: primers al azar de Reacción en cadena de polimerasa, también conocido como amplificación al azar de DNA polimórfico (arbitrarily primed PCR, also known as random amplification of polymorphic DNA); ERIC: Secuencias intergénica repetitiva de enterobacterias (enterobacterial repetitive intergenic consensus sequence); REP-PCR: PCR de elementos palindrómico extragénicos repetidos (repetitive extragenic palindromic elements-PCR); TAPPCR: PCR de triple primers al azar (triple arbitrary primed-PCR); RISA, ARISA: Análisis de espacio intergénico ribosomal, Análisis automatizado de espacio intergénico ribosomal (ribosomal intergenic spacer analysis, automated ribosomal intergenic spacer analysis).

Tabla no. 10 Medios de recuento de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* en leches fermentadas que contienen cultivos de Yogur *S. thermophilus* y *L. delbrueckii subsp bulgaricus* Kun-Lee and Salminen, (2009).

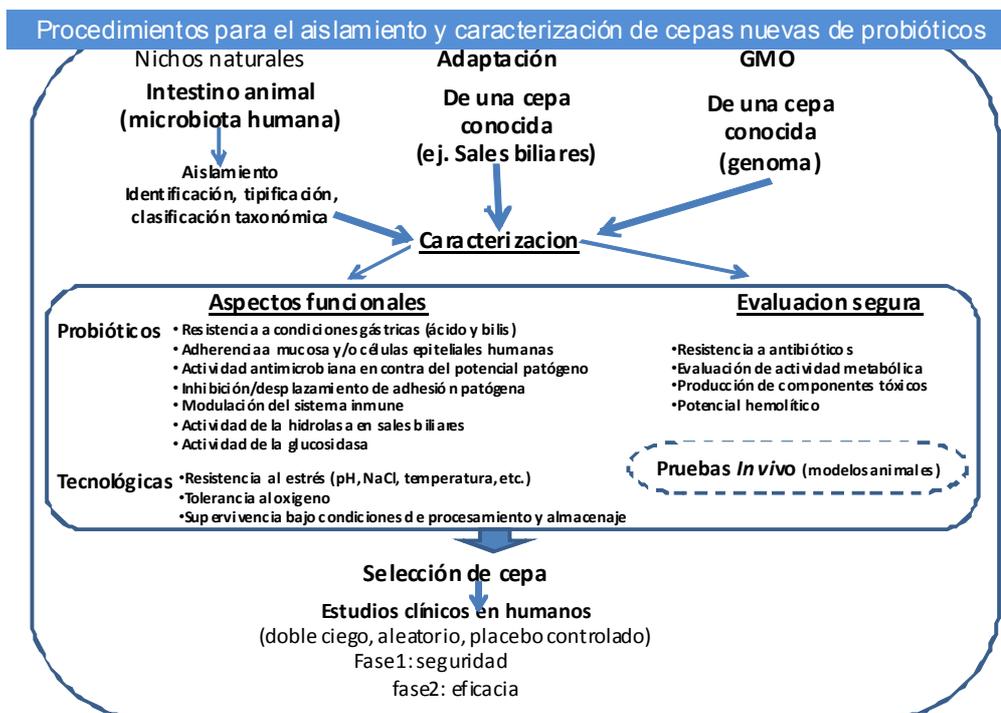
Agar/Medio	Medio Básico	Microorganismos Contado	Suplementos Añadido	Tipo de Medio	Recuento Diferencial basado en	Condiciones Oxígeno p/Incubación
G-MRS	MRS	<i>S.thermophilus</i> <i>L.bulgaricus</i> <i>L.acidophilus</i> <i>B.bifidum</i>	Galactosa (fuente C)	Modificado	apariciencia Colonia	Anaerobiosis
T-MRS	MRS	<i>L.acidophilus</i>	Trehalosa(fuente C)	Modificado	No crece otros LAB	Anaerobiosis
MRS- bilis	MRS	<i>L.acidophilus</i>	Bilis	Selectivo	Inhibición otros LAB	Aerobiosis
MRS-clindamicina medio LC	MRS	<i>L.acidophilus</i>	Clindamicina	Selectivo	Inhibición otros LAB	Anaerobiosis
	Básico medio	<i>L.casei</i> <i>L.paracasei</i> <i>L.rhamnosus</i>	HCl hasta pH5.1, verde bromocresol Ribosa	Selectivo y modificado	Inhibición/no crece otros LAB	Anaerobiosis
MRS-AC	MRS	<i>L.rhamnosus</i> <i>L.paracasei</i>	ácido acético hastapH5,2	Selectivo	Inhibición otros LAB	Anaerobiosis
NA-salicina	agar Nutritivo	<i>L.acidophilus</i>	Salicina	Selectivo/diferencial	Inhibición/apariciencia colonia	Anaerobiosis
LP-MRS	MRS	<i>B.bifidum</i>	cloruro litio propionato Sodio	Selectivo	Inhibición otros LAB	Anaerobiosis
MRS-NPLN	MRS	<i>Bifidobacterium</i> sp	sulfato de neomicina, sulfato de paromomicina, Ácido nalidíxico, cloruro de litio	selectiva	Inhibición otros LAB	Anaerobiosis
AMC	medio clostridial reforzado	<i>Bifidobacterium</i> sp	ácido Nalidíxico, PolimixinaB, cloruro de yodoacetato 2,3,5-trifeniltetrazolim, Propionato de litio	selectiva	Inhibición otros LAB	Anaerobiosis
DP	agar base Columbia	<i>Bifidobacterium</i> sp	Dicloxacilina, Ácido propiónico	selectiva	Inhibición otros LAB	anaerobiosis
BFM	-	<i>Bifidobacterium</i> sp	Lactulosa(fuente C), Ácido propiónico, Azul de metileno Cloruro de litio	selectiva	Inhibición otros LAB	anaerobiosis

Algunos géneros de bacterias y levaduras han sido propuestos como cultivos probióticos, los más comúnmente son especies de *Lactobacillus* y *Bifidebacterium*. No obstante, la selección de una cepa para ser usada como un probiótico efectivo es un proceso complejo (ver Figura no.3). El trabajo inicia con la vía de aislamiento de la cepa, el más propio es el ambiente intestinal natural.

La FAO/OMS, (2002) establece los criterios y evaluación que se deben de realizar a un microorganismo para ser llamado probiótico y están contemplado en la **Guía**

para Evaluación de Probióticos en Alimentos (ver Figura no. 4), la cual se definen en estos puntos:

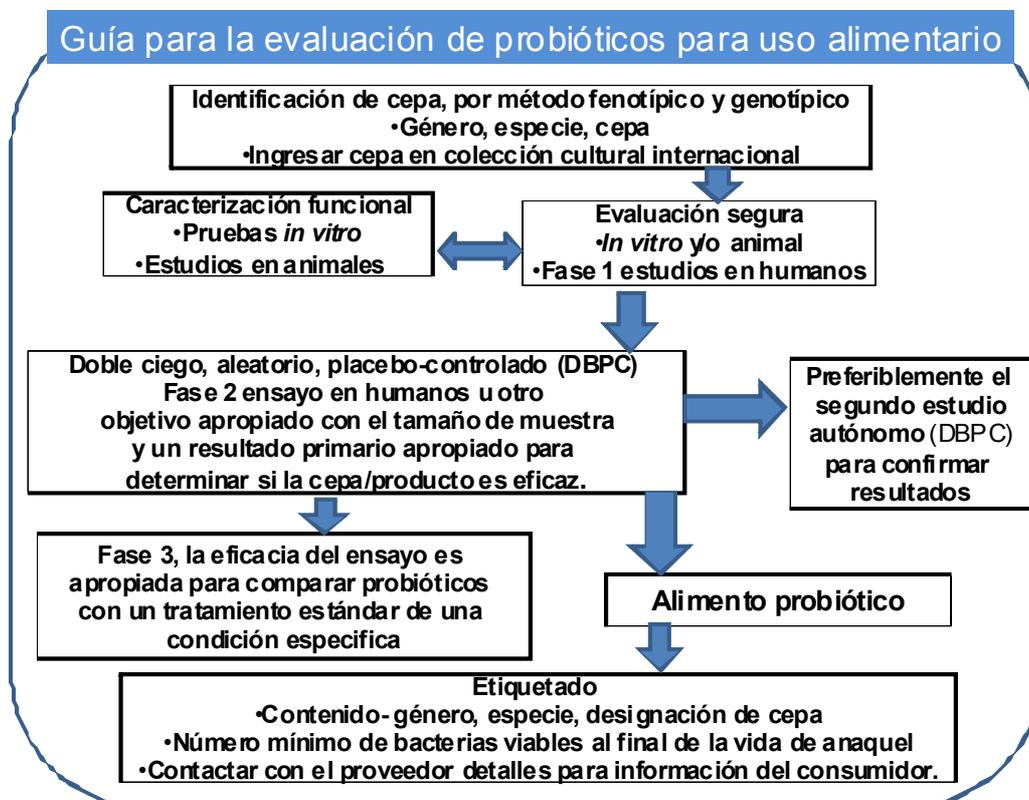
Figura no 3: Procedimientos para el aislamiento y caracterización de cepas nuevas de probióticos



1. El Método de identificación de cepas por genotipo y fenotipo, estableciendo el género, especie, cepa; y si la cepa está contenida en la colección de cultivos internacional.
2. Seguridad, realizando pruebas In Vitro y/o animales y estudio en humanos fase 1.
3. Caracterización funcional, con análisis de Pruebas in Vitro y Estudios en Animales.
4. Prueba en humanos Fase 2. DBPC (Double Blind Placebo Control, Control de Placebo, al azar y doble ciego). U otro diseño apropiado con tamaño de muestra y resultados primarios apropiados para determinar si la cepa/producto es eficaz.
5. Preferiblemente un segundo estudio de DBPC, independiente para confirmar resultados.

6. Efectividad, pruebas para comparar probióticos con tratamientos estándar de una condición específica Fase 3.
7. Alimento con probióticos
8. Etiquetado, con la siguiente información: Contenido: designación de género, especie y cepa; Número mínimo de bacterias viables al finalizar la vida de anaquel; Condiciones de almacenamiento y contacto con la empresa para información detallada al consumidor.

Figura no 4. Guía para la evaluación de probióticos para uso alimentario FAO/OMS



También la nomenclatura específica de las bacterias con dos criterios:

1. Nombre provistos de la lista de nombres bacterianos (Int. J. Syst. Bacteriol, 1980,30:225-420), también disponible en <http://www.bacterio.cict.fr/>, y
2. Lista de validación, publicada en el International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology (o International Journal of Systematic Bacteriology, prior to 2000).

Las pruebas in vitro usadas principalmente para el estudio de cepas probióticas son:

- I. Resistencia a la acidez gástrica;
- II. Resistencia al ácido biliar;
- III. Adherencia a la mucosa y/o células humanas epiteliales y líneas celulares;
- IV. Actividad antimicrobial contra bacterias potencialmente patógenas;
- V. Capacidad para reducir la adhesión de patógenos a las superficies;
- VI. Actividad de hidrolasa de sales biliares; y
- VII. Resistencia a espermaticidas (aplicación de probióticos de uso vaginal).

Debe ser generalmente clasificado como seguro (GRAS), el grupo de trabajo recomienda que las cepas probióticas se caractericen como mínimo con las siguientes pruebas:

1. Determinación de modelos de resistencia de antibióticos.
2. Evaluar la actividad de metabolitos (por ejemplo: producción de D-lactosa, desconjugación de sales biliares).
3. Evaluar los efectos en estudios con humanos.
4. Vigilancia epidemiológica de incidentes adversos en consumidores (post-mercado).
5. Si la cepa evaluada pertenece a una especie que es conocida por producir toxinas contra mamíferos, se debe probar si hay producción de toxina. Un posible esquema de prueba de producción de toxina ha sido recomendado por el Comité Científico de Nutrición Animal de Estados Unidos. (SCAN 2000).
6. Si la cepa probada pertenece a una especie que se conoce, produce actividad hemolítica potencial, la determinación de la actividad hemolítica es requerida. Además, aun si los géneros tienen mucha historia de consumo seguro en productos fermentados tradicionales y aun si las especies han sido aseguradas ser GRAS establecido por la Asociación Americana de Drogas y Alimentos (American Food and Drug Association FDA) o Califica presuntivamente de segura (qualified presumption of safety QPS)

considerada por la Autoridad Europea de Seguridad de Alimentos (European Food Safety Authority EFSA), deben ser estudiadas para garantizar la seguridad de una cepa nueva. Varios de los ensayos in vitro se pueden correlacionar con los estudios in vivo con modelos animales, pero para los probióticos de uso humano deben ser validados con estudios en humanos que abarque tanto los aspectos de la seguridad (fase 1) y eficacia (Fase 2).

Es importante la selección adecuada de medios de cultivo, baterías de pruebas bioquímicas y moleculares y las técnicas a utilizar para garantizar el éxito en la identificación de los microorganismos. Todo ello dentro de una guía de evaluación soportada por un marco regulatorio que de certeza y seguridad a los consumidores.

## **9. Prebióticos**

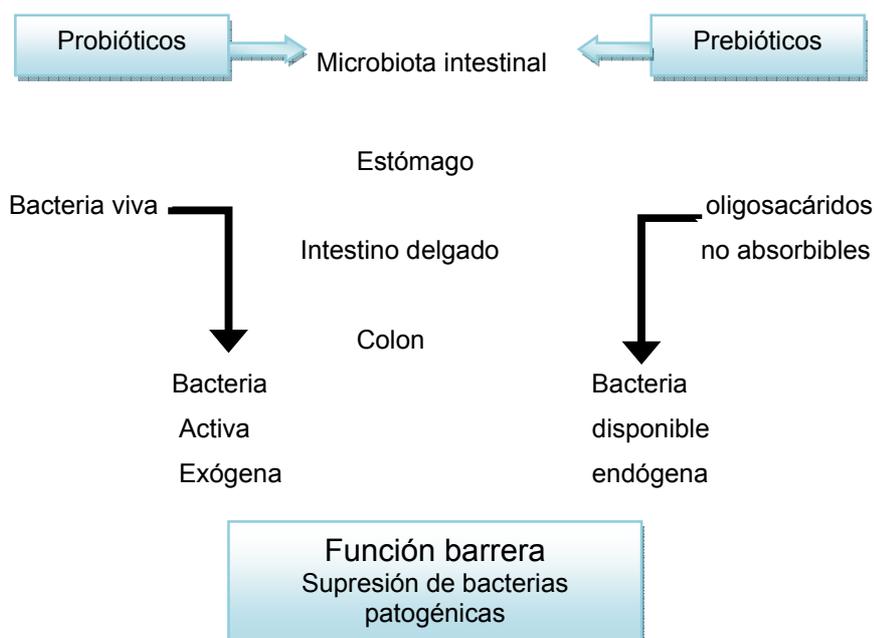
Gibson y Roberfroid (1995) Introdujeron el término “prebiótico” para referirse a los ingredientes no digeribles de los alimentos que afectan beneficiosamente al huésped por una estimulación selectiva del crecimiento y/o de la actividad de una, o un limitado grupo de bacterias en el colon, mejorando así la salud del huésped”. Los prebióticos son carbohidratos que resisten la digestión en la parte superior del tracto gastrointestinal, no se absorben en cantidades significativas, y son como consecuencia fermentados en el colon. Los ingredientes normalmente son oligosacáridos, y entre estos los de mayor interés son galactooligosacáridos y fructooligosacáridos, Crittenden y Playne (1996), Voragen (1998).

Sanz et al. (2003) y Silveira et al. (2003) define los Prebióticos en referencia a los ingredientes no digeribles por el hombre que forman parte de los alimentos y que son sustrato trófico de microorganismos. Entre ellos están la lactulosa que favorece el desarrollo de los Lactobacillus y la inulina, galacto y fructooligosacáridos que estimulan el crecimiento de las Bifidobacterias. Algunos autores consideran también dentro del término a la fibra dietética. El nombre de prebiótico también se emplea para designar al alimento que contiene estos ingredientes. Esta selectividad fue demostrada para Bifidobacterium, que puede

ser promovido por la ingestión de sustancias tales como fructooligosacáridos, Scherezzenmeir y De Vrese (2001).

García-Garibay (2000). Una parte fundamental de la funcionalidad de las bacterias probióticas, es estimular su sobrevivencia y permanencia prolongada en el tracto gastrointestinal; por esa razón, conjuntamente con el interés existente por los probióticos, también se ha desarrollado el interés por los prebióticos. Silveira et al. (2003) da el concepto de Simbióticos: Son aquellos alimentos que contienen un ingrediente probiótico y un prebiótico, aportando el efecto de ambos. Harish y Varghese (2006), establece la interacción entre probiótico, prebiótico y flora intestinal (Figura no 5):

Figura no 5. La interacción entre probiótico, prebiótico y flora intestinal



Los prebióticos, oligosacáridos indigeribles fermentables por la flora colónica con características probióticas, han generado un interés científico y comercial creciente en los últimos años. Tanto su obtención de fuentes naturales como su producción a través de tecnología enzimática no han sido exploradas aún con suficiente profundidad. Explorar fuentes de leguminosas o los agaves puede tener impacto importante a corto plazo en la comercialización de estos carbohidratos; y

por otro lado, la exploración de nuevas enzimas con mejores capacidades transglicosídicas, y el desarrollo de la ingeniería del medio enzimático, pueden resultar en tecnologías más eficientes para la síntesis de oligosacáridos. Al mismo tiempo, es indispensable intensificar los estudios del efecto de los prebióticos en la flora colónica y los resultados que esto genera en beneficio de la salud del huésped.

La incorporación de los alimentos funcionales en nuestra alimentación logra estimular el crecimiento determinados microorganismos beneficiosos para el huésped, mejorando la salud en estados carenciales, intolerancias a determinados alimentos y deficiencias crónicas; de esta manera participan en la prevención de algunas enfermedades y equilibran determinadas dietas deficitarias.

#### **10. Rol de los microorganismos probióticos en la salud y la enfermedad**

En septiembre del 2000, los Jefes de Estado y de Gobierno de 147 países y 42 ministros y jefes de delegación se reunieron en la Asamblea General de las Naciones Unidas para emprender la tarea de determinar cómo mancomunar sus voluntades y su compromiso de realizar un esfuerzo conjunto para revitalizar la cooperación internacional destinada a los países menos desarrollados y, en especial, a combatir decisivamente la pobreza extrema. En esa oportunidad, se identificaron objetivos que apuntan a la lucha contra la pobreza y el hambre, la reversión del deterioro ambiental, el mejoramiento de la educación y la salud, y la promoción de la igualdad entre los sexos, entre otros. Además, quedó de manifiesto que, dado que la falta de desarrollo es un problema que atañe y preocupa a todo el mundo y no solo a los países menos desarrollados, el establecimiento de una alianza que enriquezca y revitalice la cooperación internacional, haciéndola más adecuada y efectiva, debía ser uno, no el menos importante, de los ocho objetivos seleccionados. Así quedaron estructurados los objetivos de desarrollo del Milenio, ONU (2005).

Durante los últimos 150 años la humanidad ha logrado que muchas enfermedades transmisibles prácticamente hayan desaparecido. Los logros sanitarios y el desarrollo socioeconómico han permitido una considerable elevación del bienestar de la población. Gracias a esta evolución, en los países más desarrollados la

esperanza de vida al nacer es superior a los 75 años, por lo que las comunidades han ido envejeciendo y la proporción de personas de la llamada tercera edad ya jubiladas es cada vez mayor Hernández-Mejía, et al. (2001).

En el acta fundacional de la Organización Mundial de la Salud (OMS) se define la salud como: “La salud es un estado de completo bienestar físico, mental y social, y no solamente la ausencia de afecciones o enfermedades”. Ruy Pérez Tamayo, (2000) Diccionario de la Real Academia Española define enfermedad como ausencia de salud, y salud como ausencia de enfermedad, con lo que se cae en un círculo vicioso.

La Calidad de Vida podría definirse como la capacidad de la persona de desempeñar un papel en la sociedad y de disfrutar plenamente de ese papel como ciudadano, sea cual fuere su situación social. El concepto de la calidad de vida (CDV), va más lejos de la mera condición física e incluye, en un sentido amplio, todos los aspectos de la vida humana. El término ha aparecido como etiqueta para la medición de funciones físicas, emocionales y sociales, además de las bioquímicas y fisiológicas Fernández-López, et al. (1996).

Los factores implicados en el aumento de determinadas enfermedades, el estilo de vida es sin duda uno de los que más impacto produce por cambios en los hábitos alimenticios. Si la ingesta no es adecuada, la nutrición será incompleta y la flora intestinal se verá alterada. Otros factores que intervienen, disminuyendo nuestra resistencia a las enfermedades y predisponiéndonos a procesos morbosos, son el uso de antibióticos y la terapia inmunosupresora utilizados como tratamiento, por la alteración de nuestra microbiota intestinal Álvarez-Olmos (2001).

La estabilidad de la flora microbiana intestinal normal es imprescindible para que se lleven a cabo todas las funciones metabólicas del individuo. La demostración de que la microbiota intestinal es un importante componente de barrera en la mucosa ha introducido el concepto de “terapia probiótica” con la administración de microorganismos potencialmente beneficiosos. Salminen (1998) el huésped y su microflora autóctona, forman conjuntamente un sistema ecológico complejo cuyo modelo de desarrollo y son difíciles de entender. La colonización microbiana selectiva es una característica de huésped y microorganismo. El proceso de la

formación de lactoflora individual, deberían ser muy cuidadosos en sus intentos y no olvidar la individualidad de la lactoflora. La aplicación práctica para la prevención y tratamiento de infecciones neonatales es incipiente.

Los nutrientes están presentes en cantidad limitada en el intestino; Los microorganismos probióticos compiten con los patógenos no sólo por los nutrientes sino también por el espacio físico, algunos pueden inhibir la adherencia de los agentes patógenos a los sitios receptores, con lo que se produce una prevención de la colonización de microorganismos, Famuralo et al. (1999); Chauviere et al. (1992); Brook (1999) y Fons et al. (2000). Se suponía que el consumo de grandes cantidades de alimentos ricos en bacterias lácticas eliminaba las bacterias formadoras de toxinas, mientras que elevaba la proporción de bacterias lácticas y la flora intestinal mejoraba la salud, incrementando expectativas de vida. Desde entonces, y a lo largo de casi cien años de estudio, diversos autores se han esforzado en conocer las distintas funciones de los microorganismos benéficos para la salud que habitan el tracto digestivo, y más concretamente de los productos lácteos fermentados Trapp et al. (1993). No obstante, entre los mecanismos más significativos (Tabla no.11) que se han propuesto destacada la privación a los agentes patógenos de los nutrientes específicos.

Tabla no. 11 Principales mecanismos de acción propuestos de los Probióticos

Acción	Mecanismo	Ejemplo
Prevención de la colonización por microorganismos patógenos	Bloqueo de receptores específicos(adherencia) y competencia por nutrientes	<i>L. rhamnosus GG, L. plantarum, S. boulardii</i>
Actividad antimicrobiana	Producción de sustancias con acción antimicrobiana (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , bacteriocinas, ácidos orgánicos...)	<i>L. rhamnosus GG, S. boulardii</i>
Inmunomoduladora	Regulación de la respuesta inmunitaria humoral y celular	<i>L. rhamnosus GG, L. acidophilus, Bifidobacterium spp, L. reuteri</i>
Actividad enzimática	Disminución de la actividad de enzimas asociadas con la síntesis de lactosas, procarcinógenos	<i>S. thermophilus, Lactobacillus spp, Bifidobacterium spp</i>

En el mismo sentido Chandan (1999), Saarela, et al. (2000) dan cuenta de microorganismos probióticos y sus beneficios (Tabla no. 12).

Tabla no.12 Principales microorganismos probióticos y algunos de sus efectos beneficiosos para la salud

Microorganismo	Efecto benefico
<i>L. acidophilus</i> LC1	Equilibrio flora intestinal, efecto en sistema inmunitario
<i>L. acidophilus</i> NCFCO1748	Reducción actividad enzimas cancerígenas, diarrea y constipación
<i>L. acidophilus</i> NCFM	Reducción actividad enzimas cancerígenas
<i>L. jonsonii</i> LA1	Inmunoestimulador, tratamiento de gastritis y úlceras
<i>L. rhamnosus</i> GG	Inmunoestimulador, diarrea, inflamación del intestino
<i>L. bulgaricus</i>	Inmunoestimulador, absorción de lactose
<i>L. casei</i>	Promotor de crecimiento y del viabilidad de probióticos
<i>B. bifidum</i>	Diarrea por rotavirus, equilibrio de la microbiota
<i>S. thermophilus</i>	Inmunoestimulador, absorción de lactose
<i>S. boulardii</i>	Prevención de diarrea y tratamiento de colitis

Tabla no. 13. Requerimientos para estudios clínicos de alimentos probióticos para uso clínico y funcional.

- Cada cepa documentada y probada independientemente.
- La extrapolación de datos de cepas relacionadas cercanamente no aceptables
- Cepas probióticas bien definidas, estudios de productos y poblaciones.
- Estudios humanos con doble ciego, control con placebo y al azar.
- Confirmación de resultados por varios grupos de investigación independientes.
- Publicación en Revistas de investigación afines.

Las bacterias ácido lácticas parecen tener algún efecto benéfico sobre disturbios gastrointestinales, incluyendo algunas formas de diarreas y disfunción intestinal. Los probióticos ofrecen alternativas dietéticas para el manejo de esas condiciones. Sin embargo, se requiere trabajo para que las bacterias probióticas ganen una gran aceptación en el manejo de esas enfermedades gastrointestinales documentado (ver Tabla no.13). Es necesario más cuidado en los estudios clínicos para confirmar y extender los datos experimentales. Los probióticos deben ser investigados para su introducción dentro del campo clínico y alimentos dietéticos especiales, definiendo las cepas antes de su uso en estudios humanos y animales (ver Tabla no. 14).

Los efectos más destacables se pueden resumir en: a) la mejora de la respuesta inmunitaria; b) el mantenimiento de la microbiota del colon, reduciendo la cantidad de diversas enzimas procarcinógenas en las heces; c) el tratamiento de la diarrea del viajero y la secundaria a la terapia antibiótica; d) el control de los rotavirus y de la colitis inducida por *Clostridium difficile*; y e) la prevención de las úlceras

relacionadas con *Helicobacter pylori*. Otros aspectos más controvertidos incluyen la reducción de la absorción del colesterol, la prevención de las caries, y la prevención y el tratamiento de las infecciones del tracto urinario (ver Tablas no. 14 y 15)

Tabla no.14 Rol de los probióticos en la salud y la enfermedad

(Kun-Lee y Salminen 2009).

- 
- 1.- Efecto Nutricional:
    - a) Maldigestión de la lactosa;
    - b)  $\beta$  galactosidasa en productos lácteos fermentados
  - 2.- Prevención y tratamiento de infecciones orales y caries dentales
  - 3.- Prevención y tratamiento de diarreas:
    - a) Diarrea aguda en niños por rotavirus;
    - b) Diarrea asociada a antibióticos;
    - c) Diarrea asociada a *Clostridium difficile*;
    - d) Diarrea inducida por radiación;
    - e) Diarrea del viajero;
    - f) Diarrea en pacientes alimentados por tubo.
  - 4.- Tratamiento del síndrome del intestino irritable
  - 5.- Prevención y tratamiento de enfermedades del intestino inflamado.
  - 6.- Tratamiento de infecciones del *Helicobacter pylori*.
  - 7.- Prevención de enfermedades post-operatorias.
  - 8.- Prevención y tratamiento de infecciones del tracto respiratorio.
  - 9.- Prevención y tratamiento de enfermedades alérgicas
  - 10.- Efecto anti-tumor
  - 11.- Reducción del colesterol sérico
  - 12.- Fortalecimiento de respuestas a vacunas
  - 13.- Efectos en animales de granja:
    - a) aves de corral;
    - b) Borregos;
    - c) Rumiantes;
    - d) Conejos;
    - e) Mascotas
- 

Salminen (1998) en los últimos años ha sido interesante cambiar en la prevención de enfermedades y promover la salud usando bacterias probióticas contra las bacterias nocivas en el tracto intestinal Saavedra (1995). Nuevas y más específicas cepas de bacterias probióticas son encontradas. Hay un riesgo potencial asociado con la introducción de microorganismos probióticos nuevos en alimentos de consumo humano.

Tabla no. 15 Mecanismos de acción de los Probióticos (Kun-Lee y Salminen 2009).

- 1.- Adhesión a la mucosa intestinal y epitelios:
  - a) Adhesión a la línea celular del epitelio gastrointestinal;
  - b) Adhesión a la mucosa intestinal;
  - c) Colonización de los probióticos en el intestino humano como prueba de biopsias;
  - d) Comparación de resultados in vivo e in vitro;
  - e) Adhesinas;
  - f) Factores que afectan las propiedades de adhesión de los probióticos;
  - g) Propiedades adhesivas e inhibitorias de probióticos no viables;
  - h) Rol de la edad y enfermedades en la adhesión
- 2.- Adhesión y agregación combinada de probióticos y patógenos:
  - a) Agregación; b) Adhesión;
  - c) Pruebas de adhesión;
  - d) Pruebas de Agregación,
  - e) Factores que determinan la adhesión;
  - f) Modelos in vitro;
  - g) Probióticos en combinación
- 3.- Producción de sustancias antimicrobianas:
  - a) Ácidos orgánicos;
  - b) Peróxido de hidrogeno;
  - c) Dióxido de carbono,
  - d) Bacteriocinas,
  - e) Componentes antimicrobianos de bajo peso molecular;
  - f) Otros agentes antimicrobianos
- 4.- Efectos Inmune de las bacterias probióticas:
  - a) Microbiota intestinal del neonato;
  - b) La importancia de la microbiota intestinal en el desarrollo inmune;
  - c) Interacción de bacterias patógenas y comensales con el sistema inmune intestinal;
  - d) Efectos de los probióticos sobre la respuesta inmune;
  - e) Efecto probiótico sobre las células epiteliales;
  - f) Efecto de los probióticos sobre DCs;
  - g) Efecto de los probióticos sobre la respuesta inmune adaptativa: Células T reguladoras y Células T ayudadoras;
  - h) Entrega de bacterias probióticas
- 5.- Alteración de la microecología en el intestino humano.

Antes de incorporar en productos, nuevas cepas se debe probar y asegurar la seguridad y eficacia del uso propuesto Huis In't Veld, et al. (1994). Es necesario contar con un modelo apropiado y métodos de prueba de seguridad de bacterias probióticas Donohue y Salminen (1996a); Adams and Marteau (1995); Jonas, et al. (1996):

- 1.- Determinar las propiedades intrínsecas de bacterias y cepas seleccionadas para uso probiótico.
- 2.- Evaluar el efecto de los productos metabólicos de las bacterias.
- 3.- Evaluar la toxicidad aguda o subaguda de la ingestión extrema.
- 4.- Estimar las propiedades in vitro. Evaluar inefectividad en modelos de animales.

- 5.- Determinar la eficacia de ingestión con medida de dosis-respuesta sobre la composición de la microflora intestinal humana.
- 6.- Evaluar efectos en estudios con humanos voluntarios y estudios clínicos en estadios de enfermedad.
- 7.- Vigilancia epidemiológica. 8.- Empezar pruebas de seguridad más rigurosas.

## **11. Los probióticos y la Nutrición**

David B. Hughes y Dallas G. Hoover (1991), dicen que la fuente de la juventud ha sido un sueño durante mucho tiempo, a la vez, los alimentos pueden ser tus medicinas y las medicinas pueden ser tus alimentos, Consejo Lácteo de California, (2000). Al inicio del siglo XX Metchnikoff, hizo la sugerencia de salud y longevidad mediante la ingestión de bacterias presentes en el yogurt, kéfir y leche agria, desarrollo una teoría que no solamente controlando la microflora intestinal, prevenía las infecciones por patógenos entéricos, sino también regulaba la toxemia crónica natural, la cual jugaba un papel importante en la mortalidad, Bibel (1988). La bacterioterapia prescrita y estudios sobre el uso de cultivos lácticos en regímenes dietéticos continuaron a través del siglo. Muchos de los trabajos considerando terapia de nutrición (o relación benéfica huésped-bacteria).

La nutrición: es el proceso biológico por el cual los organismos asimilan los alimentos y los líquidos necesarios para su funcionamiento, crecimiento y mantenimiento de sus funciones vitales. La nutrición también es el estudio de la relación entre los alimentos con la salud, especialmente en la determinación de una dieta.

El interés creciente en el cuidado de sí mismo, la medicina integral y nuestra salud, dan un boom poblacional, reorganizando nuestras relaciones entre salud y dieta. Como resultado, el mercado de los alimentos funcionales o alimentos que promueven la salud, además de proveer nutrición básica, es próspero. Dentro del mercado de los alimentos funcionales, los probióticos es un segmento pequeño pero se expande.

El término “alimentos funcionales” comprende cepas de algunas bacterias y productos de origen animal o plantas conteniendo componentes fisiológicamente

activos que benefician la salud humana y reducen el riesgo de enfermedades crónicas. Entre los componentes funcionales mejor conocidos los probióticos, prebióticos y antioxidantes naturales podrían ser como ejemplo. Estas sustancias pueden ser obtenidas por métodos biotecnológicos y por extracción de tejidos animales o vegetales, grajek et al. (2005).

Japón fue el primer país del mundo en donde se empezó a hablar de los alimentos funcionales Fesnad (2007) hace 20 años. 10 años más tarde estos productos alimenticios aparecieron en Europa. En ese momento un grupo de expertos, coordinados por el ILSI (International Life Science Institute) creó un proyecto para definir y obtener un mejor conocimiento acerca de estos alimentos, sus efectos, áreas de aplicación y todo lo relativo a estos productos. Marcos (2002) define un alimento funcional: como un alimento natural o modificado, que se ha añadido o eliminado un componente, de su naturaleza o biodisponibilidad por medios tecnológicos o biotecnológicos. Stanton et al. (2001) los alimentos funcionales como un término de marketing fue iniciado en Japón en los 80's y este uso describe alimentos fortificados con ingredientes capaces de producir beneficios a la salud. Este concepto ha incrementado su popularidad con el aumento de conciencia de la relación salud, nutrición y dieta. López-Brea y Domingo (2007) comentan que el consumo de probióticos es una práctica habitual mantenida por largo del tiempo en diferentes grupos poblacionales, que ha aumentado considerablemente. Las evidencias científicas sobre su uso en determinados cuadros clínicos, especialmente aquellos relacionados con enfermedad gastrointestinal, son lo suficientemente importantes para considerarlos en el tratamiento de estos cuadros; no obstante, son necesarios ensayos clínicos futuros que corroboren los resultados positivos obtenidos y que confirmen o desmientan la utilidad de los probióticos en otras enfermedades. Los resultados aprobarían el uso de los probióticos en otros campos y les otorgarían un lugar dentro de la quimioterapia como alternativa al tratamiento convencional de las infecciones.

Los probióticos han demostrado tener efectos benéficos sobre la salud humana. Existe buena evidencia del uso terapéutico de los probióticos en infecciones

diarreica en niños, causadas por el *Clostridium difficile*. El posible beneficio en otras infecciones gastrointestinales, prevención de translocación bacteriana postoperatoria, síndrome de intestino irritable y enfermedad del intestino inflamado continúa emergiendo, Harish y Varghese (2006). Se realizó un estudio para validar un modelo dinámico del estómago y el intestino delgado para cuantificar la supervivencia de bacterias ácido lácticas y evaluar la influencia de las secreciones gastrointestinales. Los resultados demostraron reducciones significativas de la viabilidad después de 40 minutos, Marteau, et al. (1997).

Oyetayo y Oyetayo (2005), los probióticos han sido de interés en la promoción de la salud en el hombre y animales. Algunos de los efectos positivos son: promoción del crecimiento de animales de granjas, protección del huésped contra infecciones intestinales, aliviar la intolerancia a la lactosa, la constipación, efecto anticarcinogénico, efecto anticolesterolemico, síntesis de nutrientes, bioviabilidad, prevención de enfermedades del tracto genital urinario, y efectos inmunoestimuladorio. Existe un potencial como agentes inmunofortalecedores y la perspectiva futura en desarrollo de potentes probióticos con moléculas inmunoestimuladoras que pueden servir como coadyuvante de vacunas.

Fooks and Gibson (2002), la ingestión de probióticos puede ser recomendada como un preventivo seguro para mantenimiento del balance de la microflora intestinal y en consecuencia “sentirse bien”. En teoría, incrementando el nivel de probióticos puede inducir una barrera que influya contra patógenos comunes. En situaciones crónica, ha sido sugerido que algunos probióticos pueden ayudar a mantener disminuidas las condiciones inflamatorias, colitis ulcerativa y gastritis. Ellos también han sido sugeridos para reprimir enzimas responsables de formación de genotoxinas, son efectivos como drogas antiespasmódicas en el alivio del síndrome de intestino irritable. El enfoque de modulación de la flora intestinal para proveer salud tiene mucha relevancia para el manejo de esos desordenes agudos y crónicos. Otro grupo objetivo podría incluir esas infecciones nosocomiales. Como bien es conocido en los ancianos la microflora está alterada, con una disminución del número de especies microbianas benéficas. Para el futuro, es imperativo que los mecanismos de interacción involucren en

suplementos bien identificados con probióticos. Además, la supervivencia asociada con su establecimiento en el ecosistemas competitivo intestinal podría ser direccionado. Aquí el uso de prebióticos en asociación con probióticos útiles puede ser el enfoque global. La combinación de probióticos y prebióticos es conocida como simbiosis.

Los Probióticos son ampliamente usados para preparar productos lácteos fermentados, tales como yogurt o cultivos desecados-congelados, Bouvier et al. (2001). En el futuro, ellos pueden también ser encontrados en vegetales y carnes fermentadas. Algunas evidencias sugieren un rol de los probióticos en la reducción del riesgo de diarrea inducida por rotavirus y cáncer de colon. La combinación de probióticos y prebióticos es una simbiosis puede proveer la sobrevivencia de las bacterias al cruzar la parte alta del tracto intestinal, en consecuencia engrandecer sus efectos en el intestino grueso. Adicionalmente su efecto podría ser aditivo o aún sinérgico, Roberfroid (2000).

## 12. Los probióticos y la Biotecnología

La alimentación comprende un conjunto de actos voluntarios y conscientes que van dirigidos a la elección, preparación e ingestión de los alimentos, fenómenos muy relacionados con el medio sociocultural y económico (medio ambiente) y determinan al menos en gran parte, los hábitos dietéticos y estilos de vida. La biotecnología se define como las técnicas o métodos para elaborar productos (alimenticios, farmacéuticos, químicos) utilizando entidades biológicas.

La mayoría de los alimentos por su propia constitución poseen sustancias tóxicas en pequeñas cantidades (por ejemplo la papa, frijol, apio, etc.). No obstante, el equilibrio en la dieta determina que el beneficio sea mayor que el riesgo. Existen criterios para clasificar las sustancias potencialmente tóxicas que suelen estar presentes en los alimentos, Plaut (1984) y Ramírez (1997):

- **Naturales:** micotoxinas, glucósidos, furocumarinas, inhibidores enzimáticos, gosispol, alcaloides, safrol, biotoxinas marinas, toxinas vegetales, etc.;
- **Intencionales** (aditivos): colorantes, conservadores, antioxidantes, edulcorantes, acidulantes, saborizantes, emulsificantes, antiespumantes, etc.;

- **Accidentales:** plaguicidas, metales, antibióticos, sulfas, hormonas, radionucleótidos, etc.;
- **Generados en el proceso tecnológico:** nitrosaminas, benzopirenos, isopéptidos, melanoidinas, etc....

Todos los elementos ajenos e indeseables en los alimentos son considerados indiscriminadamente como tóxicos o nocivos, que en determinadas condiciones pueden poner en peligro la salud del hombre. El uso de sustancias químicas en los alimentos durante su procesamiento, confieren durabilidad o influyen en ellos, garantizan y estabilizan el color o el sabor, conduce a que los productos así manejados estén sustancias estén presentes al momento del consumo. Dichas sustancias son utilizadas de acuerdo a los reglamentos y normatividad de la región donde se comercializan. Todos estos aditivos requieren permiso oficial Hans-Jürgern (1997).

En países como Estados Unidos constantemente se incrementa la lista de aditivos alimentarios denominados GRAS (generalmente reconocidos como seguros). La seguridad de estas sustancias químicas es relativa, dado que los avances en la investigación históricamente nos han demostrado que aquello que en algún momento se considero seguro, posteriormente se demuestra que no lo es, implicando diferentes tipos de riesgos a corto y mediano plazo. Por último el riesgo por la susceptibilidad individual como las alergias no tiene nada que ver con la calidad sanitaria de un alimento y sin embargo constituye un factor de riesgo asociado al consumo del alimento para un individuo sensible, Zottola y Lorraine (1990).

El uso de microorganismos con base científicas es reciente e inicia en el siglo XX, no obstante, haberse utilizado en la antigüedad al elaborar vino y pan. Actualmente se consumen los probióticos, sin tener las bases científicas que sustenten el beneficio externado.

Los productos lácteos fermentados, los cuales incluyen queso, crema agria, mantequilla y yogurt, juegan un papel si no dominante, importante en cualquier discusión de alimentos fermentados. Los productos fermentados son de las más importantes contribuciones naturales a la civilización, históricamente, estos

alimentos son viables en periodos de sobrevivencia, hambre, nutricionalmente, ellos proveen elementos vitales para la buena salud, por lo cual son deseables en la dieta del hombre; y geográficamente, ellos dan una producción real en cualquier país desarrollado. Los quesos y alimentos relacionados son hechos rápidamente de materia cruda. Los procesos básicos son fácilmente asimilables y el producto obtenido tiene gran vida y son usualmente seguros. En el mundo se consumen 9 billones de libras de queso, Kosikowski y Mistry (1997).

Respecto de los alimentos funcionales Farjas (2003) y Silveira et al. 2003, refieren que Metchnikoff observó que el yogur poseía unas propiedades benéficas para el organismo. Esto tuvo una repercusión no solo científico–médica sino también comercial. Aún así, como se ha comentado anteriormente, el yogur y otras leches fermentadas se han introducido con fuerza en el mercado de la alimentación hasta hace unos 15 años. A lo largo de los años, los hábitos de consumo y las preocupaciones de la sociedad han cambiado, priorizando la seguridad alimentaria. Hoy en día el consumidor se preocupa por lo que come, por lo que contienen los alimentos y por los beneficios que puedan conllevar para su salud, Mistry y Kosikowski (1985); Vinderola, et al. (2000); y Torres-Vitela (2000).

Spanhaak, et al. (1998) documentan una relación de productos tradicionales y modernos con probióticos (Tabla no. 16). La Tabla no. 17 enlista microorganismos probióticos utilizado en la elaboración de leches fermentadas.

Tabla no. 16. Productos tradicionales y otros más modernos con cepas probióticas

Nombre	Descripción	Cultivo
Kefir	Leche fermentada efervescente ácida y ligeramente alcohólica	<i>L. lactis</i> , <i>L. kéfir</i> , <i>L. casei</i> . <i>L. acidophilus</i> , <i>L. bulgaricus</i> , <i>L. brevis</i> , <i>L. cremoris</i> , hongos
Kishk	Mezcla desecada de leche fermentada con cereal, algunas veces sazonada o condimentada, que se reconstituye con agua, en sopa	<i>S. thermophilus</i> , <i>L. bulgaricus</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. Brevis</i>
M'Bannick	Bebida como el kéfir, con un agradable aroma y refrescante sabor	<i>L. lactis</i> , <i>L. cremoris</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. casei</i> , hongos
Actimel®	Bebida fermentada condimentada, consistencia líquida, agradable sabor	<i>S. thermophilus</i> , <i>L. bulgaricus</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. Casei</i>
Yakult®	Bebida fermentada condimentada, consistencia líquida, agradable sabor	<i>L. casei</i>

Tabla no. 17. Algunos microorganismos probióticos utilizados en la elaboración de leches fermentadas.

Género	Especie
<i>Lactobacillus</i>	<i>L. acidophilus</i> (cepas LC1, La5, La1, la6) <i>L. casei</i> (cepas Shirota, GG, LGG, inmunitas) <i>L. rhamnosus</i> CC <i>L. johnsonii</i> <i>L. helveticus</i> <i>L. delbrueckii bulgaricus</i> <i>L. gasei</i> <i>L. plantarum</i> <i>L. paracasei paracasei</i>
<i>Pediococcus</i>	<i>P. acidilactici</i>
<i>Bifidobacterium</i>	<i>B. bifidus</i> <i>B. breve</i> <i>B. longum</i> <i>B. adolescentis</i> <i>B. infantis</i> <i>B. lactis</i> <i>B. animalis</i>
<i>Lactococcus</i>	<i>L. lactis lactis</i>
<i>Enterococcus</i>	<i>E. faecium</i>
<i>Saccharomyces</i>	<i>S. boulardii</i>

Sanz et al. (2003) define a los probióticos como alimentos que contienen microorganismos definidos y viables en grado suficiente para modificar la flora intestinal del huésped, ejerciendo así un efecto benéfico sobre su salud (ver Tabla no. 15). Shah (2000) describe que un número de beneficios a la salud se han encontrado en bacterias probióticas tales como *Lactobacillus acidophilus*, *bifidobacterium* spp., y *Lactobacillus casei*. Por el potencial de beneficios a la salud, de estos microorganismos, se ha incrementado su adición en productos lácteos. No obstante, estudios de los probióticos demuestran que tienen una baja viabilidad en productos comerciales. La viabilidad de las bacterias probióticas puede ser provista por la selección de cepas resistentes al ácido, la bilis, el uso de contenedores impermeables al oxígeno, fermentación de dos etapas, microencapsulación, adaptación al estrés, incorporación de micronutrientes (péptidos y aminoácidos) y por zonificación de bacterias de yogurt.

Chut J Héller (2001), describe que las bacterias probióticas son vendidas principalmente en alimentos fermentados, y los productos lácteos, juegan un rol predominante como transportadores de probióticos. Estos alimentos son bien

apropiados para promover una imagen positiva de salud de probióticos por varias razones:

1) Alimentos fermentados y productos lácteos en particular, ya tienen una imagen positiva a la salud;

2) Los consumidores están familiarizados con el hecho que los alimentos fermentados contienen microorganismos vivos (Bacterias); y

3) Los probióticos son usados como organismos iniciadores combinando las imágenes positiva de cultivos probióticos y la fermentación. Cuando los probióticos son añadidos a alimentos fermentados, varios factores deben ser considerados que pueden influir la capacidad de los probióticos para sobrevivir en el producto y mantenerse activo cuando entra en el tracto gastrointestinal del consumidor. Estos factores incluyen:

1) El estado fisiológico de los organismos probióticos añadidos (si las células están en la etapa de crecimiento logarítmica o estacionaria),

2) Las condiciones físicas de almacenamiento del producto (ejemplo, temperatura),

3) La composición química del producto al cual son adicionados los probióticos (ejemplo, acidez, contenido de carbohidratos disponibles, vías de nitrógeno, contenido mineral, actividad de agua y contenido de oxígeno), y

4) Interacción posible de los probióticos con los cultivos iniciadores (ejemplo, producción de bacteriocinas, antagonismo, y sinergismo. Las interacciones de probióticos con la matriz del alimento o los cultivos iniciadores pueden ser aún más intensas cuando los probióticos son usados como un componente de los cultivos iniciadores.

Stanley E. Gilliland (2000). Para resumir, la inclusión afortunada de un cultivo probiótico en un producto lácteo tal como, el yogurt se requiere que:

1) Tenga características necesarias para producir el efecto deseable al consumidor,

2) Crecer bien en leche, al menos añadir en suficiente cantidad en el producto final,

3) Ser estable ejemplo, mantener viabilidad en el producto lácteo hasta que se consuma.

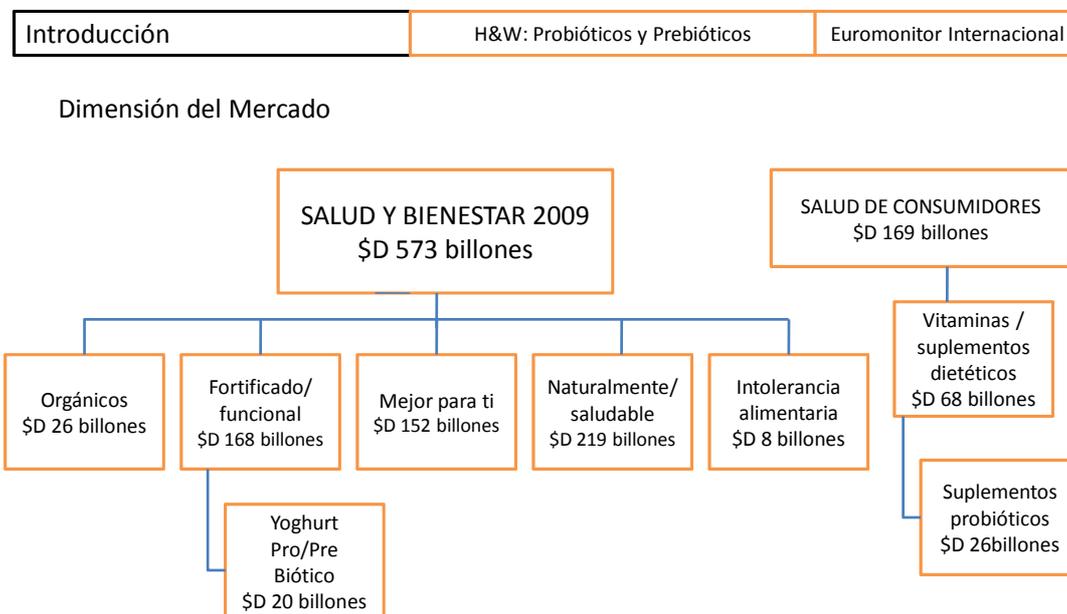
### **13. El marketing de los probióticos**

La mayoría de los estudios de probióticos están relacionados con los productos lácteos fermentados enriquecidos con BAL, como, yogur, leche agria, queso cottage, etc. donde estos alimentos, están regulados por miles de años de tradición. Los microorganismos benéficos que contienen estos alimentos fueron identificados y desarrollados en productos específicos con el propósito de mejorar la salud. El mercado ha crecido rápidamente desde el 7% en los Estados Unidos, al 15% en China (BBC, 2005). El valor total puede llegar en EUA a \$ 1,1 billones de dólares americanos en 2010. Esto no incluye los alimentos que ya tienen microorganismos vivos, como parte de su proceso de producción original, tales como, el yogur, kéfir, queso, chucrut, kimchi, etc.

El mercado de los productos probióticos (entre ellos lácteos fermentados) está en crecimiento en virtud de generar beneficios a la salud de los consumidores. La magnitud económico del mercado está en la tabla no. 19 y representa 573 billones de dólares en el sector de Salud y Bienestar, y 169 billones de dólares en el sector de Salud de los consumidores (ver Figura no.6).

Estudio de mercado de los productos relacionados con probióticos varía en función del alcance de la definición. Productos lácteos que contienen BAL se estima en un valor de más de \$D 30 billones de dólares americanos en 2005, con Japón solo \$D 5 billones de dólares americanos, Ta Kung, (2004). El tamaño del mercado de los probióticos puros es más pequeño. Los probióticos se vende como suplemento alimenticio en USA fue un poco más de \$D 240 millones de dólares, Rubin (2003). Sin embargo, la tasa de crecimiento anual fue del 14%, que es muy notable para cualquier alimento. La venta de los probióticos en Europa fue de 12 millones. El crecimiento anual fue de un 15%, lo que indica una tendencia optimista para el futuro cercano.

Figura no. 6 Mercado de Probióticos y Prebióticos en Estados Unidos de América  
Euromonitor (2012).



Renuncia. Gran parte de la información contenida en este boletín es de naturaleza estadística y al mismo tiempo se han hecho todos los intentos para asegurar la exactitud y confiabilidad, Euromonitor Internacional no se hace responsable por omisiones o errores. Las cifras en las tablas y los análisis se calculan a partir de datos no redondeados y pueden no coincidir. Los análisis que se encuentran en el boletín de información no reflejan la opinión las empresas totalmente, se recomienda discreción al lector

Consultado en las bases datos de Euromonitor referente al mercado del Yogurt y leches fermentadas en México, encontramos la siguiente Categoría informativa 16 junio 2012

La importancia en 2011 del yogur y leches fermentadas en México, radica en la expectativa de un incremento del 10% y un valor alcanzado de \$21.0 miles de millones de pesos, con el yogur funcional para beber y el yogur cuchareable(set) (↑ 9% 46.000 ton.). Existe un entorno altamente competitivo entre las seis marcas principales, donde Danone y Yakult, son líderes con 24% del mercado cada uno. Además se pronostican un crecimiento de 6% anual, para llegar a \$ 27,7 mil millones de pesos en 2016, Euromonitor (2012)

Las tendencias de acuerdo a Euromonitor establecen que el yogur es uno de los rubros más dinámicos dentro de los productos lácteos en México, debido al consumo de yogur de beber, con expectativa de crecimiento del 11% para el 2011. Los consumidores mexicanos de zonas urbanas han desarrollando nuevos estilos

de vida agitados, son de clase media, con dificultad para mantener una nutrición saludable, especialmente en el desayuno o almuerzo de alta calidad. El yogur funcional para beber es una alternativa real. Otro segmento socioeconómico importante los estudiantes de secundaria y universidad han sido influenciado por la publicidad y contribuye al crecimiento del yogur para beber funcional.

En 2011 el crecimiento fue bajo, debido a satisfacer las necesidades nutricionales sin comprometer su presupuesto. El yogur natural cuchareable, con un 9% de crecimiento, causado por el aumento de sustitutos (yogures pro/pre bióticos y funcionales), ha bajado el precio en un 6%. No obstante, el yogur tiene un 65% de las ventas totales.

El sabor fresa, en 2011 es el sabor más popular de yogur cuchareable, seguido de durazno, ciruela y arándano. La ciruela se ha vuelto más popular, ya que ayuda al sistema digestivo. Hay sabores inusuales, yogur para beber Activia ofrece Cactus con piña y pera, y manzana con linaza. Existe yogurt funcional con combinaciones de atributos y propiedades, donde la funcionalidad clave es ayudar con problemas digestivos, mediante, diversos probióticos. Además, se enriquecen con antioxidantes, vitaminas, minerales y bajos o sin grasa.

- Danone tiene una presencia efectiva en el mercado, mediante la segmentación de envejecimiento y género (Dan'Up, Vitalínea y Activia). Yakult es pionero en bebidas funcionales. Por su parte, Alpura, Lala y Sigma Alimentos han intensificado la competencia aprovechando las capacidades de fabricación y de distribución, así como, productos de alta calidad. Alpura, desarrollo una línea completa de yogur funcional para beber marca Vivendi, con una mezcla de verduras, fruta y yogur, incluyendo propiedades como bajo en calorías, adición de vitaminas, antioxidantes y probióticos. Cuenta con sabores de naranja con Piña y Zanahoria (Defensa), apio con piña y Cactus (purificante), guayaba, toronja y el Aloe Vera (regenerador) y, ciruela pasa con nueces (digestión).

Las novedades en 2011 en el mercado son: Alpura, con extensión de la marca B-biblia 0%, yogur p/beber natural y fresa, libre de azúcar y grasa, con vitamina A, B y D. Yakult presento Yakult 40 LT, con más de 40 mil millones *Lactobacillus casei Shirota*, para mejorar la flora intestinal; sin azúcar y bajo en calorías, dirigido a

adultos con estilo de vida estresante, interesados en la salud y bienestar (diabetes, obesidad, etc.). Danone presentó Dan'Up sabor cappuccino y yogur aromatizado cuchareable Danone sin fruta.

Las Perspectivas del mercado mexicano del yogur se espera que mantenga un comportamiento dinámico en los próximos años. Una creciente clase media y estilos de vida cambiantes en las zonas urbanas, actuarán como factores clave para el crecimiento futuro. Las organizaciones nacionales de salud es probable que sigan promoviendo en la población conciencia sobre la obesidad, y como resultado de esto, más mexicanos puedan continuar desarrollando hábitos de salud y bienestar, donde el consumo de yogures para beber funcional y cuchareable probablemente juegan un papel importante en esta tendencia.

Los supermercados/hipermercados y las tiendas de descuento siguen representando más del 70% del valor de las ventas totales, mientras que abarrotes pequeños independientes tienen un crecimiento limitado, por la falta de espacio para productos refrigerados. Los fabricantes de todos los productos, pero sobre los de yogures para beber, se beneficiarán de la expansión de las tiendas de descuento. Se espera que aumenten las tendencias de la salud y el bienestar y la investigación y desarrollo constante. Las principales marcas han demostrado ser flexible para introducir y cambiar sabores en la línea, por lo tanto combinaciones de sabores exóticos, adicionadas de solo componentes naturales es probable que aumente.

#### **14. La legislación de los probióticos.**

Con el fin de proteger la salud pública, los gobiernos tienden a ver los probióticos como alimentos más que un medicamento, a menos que se reclame un efecto terapéutico específico manifestado. Las actitudes regulatorias cambian gradualmente a medida que existe más información científica disponible y pública. En resumen las características comunes de las definiciones de los probióticos se refieren a productos con organismos vivos; requerimientos de dosis para ser eficaz; y conferir beneficios para la salud.

Los probióticos han crecido significativamente en los últimos 10 años, son un producto importante, sustentado en numerosas publicaciones científicas de los

últimos 20 años. Con más información sobre el beneficio y la seguridad los profesionales occidentales de la salud han cambiado su actitud de sospechoso a bienvenida de los suplementos alimenticios que podrían ayudar en atención convencional de la salud. Productos con etiquetas claras y propiedades funcionales probadas, así como las especificaciones, son estables y con más probabilidades de éxito.

Las compañías de seguros y defensores de consumidores exigen más directrices respecto al uso de probióticos en la salud. Algunos insisten cuando probióticos sean utilizados con fines terapéuticos, deben ser regulados como cualquier otro medicamento convencional. Otros sostienen, dado el historial de seguridad de un probiótico como alimento, el requisito de pruebas de seguridad deben ser reducido, haciendo hincapié en la demostración de la eficacia. El resultado de las pruebas, y el estatus reglamentado de "Terapéutico" debe ser público. Estas diferencias en la actitud ha sido objeto de debate en muchos foros, y dio lugar a una acción legal en algunos casos.

Las empresas tratan de establecer un consenso general sobre conceptos de producto basada en bases científicas que fomenten el crecimiento saludable del mercado. La tecnología de estabilización de los microorganismos, productos con fines funcionales ha sido desarrollada con resultado, incluyen fórmula para bebés, jugos de frutas yogures incluso chocolates, con más de un año de vida útil. Se consideró que sólo con datos científicos podría ser una pauta positiva establecida para el desarrollo saludable de probióticos.

Los perfiles de importancia en la formulación de los alimentos funcionales probióticos son un agradable aroma y sabor. Más importante aún, las cepas probióticas deben ser resistentes y suficiente estables para soportarlos procesos convencionales de producción industrial. Estos criterios pueden ser los siguientes:

- a) La facilidad en el mantenimiento de almacenamiento sin pérdida de viabilidad;
- b) La capacidad de revitalizar y crecer rápidamente a la máxima concentración, en medio de fermentación simple y barato;

c) La capacidad para crecer y sobrevivir en condiciones microaerofílica o aeróbico;

d) La capacidad para resistir la manipulación física, sin una pérdida significativa de viabilidad;

e) La capacidad para sobrevivir en las matrices de alimentos y durante el procesamiento.

Es necesario estudios clínicos verificables, estandarizados para demostrar la seguridad, eficacia y limitaciones de un probiótico potencial, se necesitan reglamentos, normas y control de calidad rigurosos, Bernardeau, et al. (2006); Sanders, et al. (2005); Henriksson, et al. (2005); Gueimonde, et al. (2006); Kun Lee y Salminen (2009).

Hay institutos y agencias nacionales e internacionales que ofrecen información sobre legislación en salud en la Unión Europea, a través de páginas Web. En estos sitios hay datos de probióticos, prebióticos y alimentos funcionales (ver Tabla no. 18)

Tabla no. 18 Institutos para información sobre legislación en salud en la Unión Europea

Instituto	País	Acrónimo	PáginaWeb
Autoridad Europea de seguridad alimentaria	Unión Europea	EFSA	<a href="http://www.efsa.europa.eu/en.html">http://www.efsa.europa.eu/en.html</a>
Ministerio de Salud	Bélgica		<a href="http://www.health.fgov.be/">www.health.fgov.be/</a>
Agencia Nacional de Finlandia	Finlandia	EVIRA	<a href="http://www.evira.fi/">http://www.evira.fi/</a>
Agencia Francesa de seguridad sanitaria de alimentos	Francia	AFSSA	<a href="http://www.afssa.fr/">http://www.afssa.fr/</a>
Dirección General de competencia, consumidores y fraude	Francia	DGCCRF	<a href="http://www.finances.gouv.fr/DGCCRF/">http://www.finances.gouv.fr/DGCCRF/</a>
Autoridad de Seguridad Alimentaria de Irlanda	Irlanda	FSAI	<a href="http://www.fsai.ie/">http://www.fsai.ie/</a>
Ministerio de Salud	Holanda		<a href="http://www.minvws.nl">www.minvws.nl</a>
Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición	España	AESA	<a href="http://www.aesa.msc.es">www.aesa.msc.es</a>
Fundación de Nutrición de	Suecia	SNF	<a href="http://www.snf.ideon.se/">http://www.snf.ideon.se/</a>
Agencia de Normas Alimentarias		UK	<a href="http://www.food.gov.uk/foodlabelling/ull/claims/">http://www.food.gov.uk/foodlabelling/ull/claims/</a>

## 15. El Futuro de los probióticos

Hay un potencial de beneficios del consumo de probióticos, sobre un amplio rango de condiciones clínicas. Se debe de continuar identificando y caracterizando cepas probióticas, determinar su dosis optima para garantizar resultados, además de dar a conocer los beneficios actuales y futuros de los probióticos, Consejo Lácteo de California (2000).

Las investigaciones deben de incrementar el conocimiento del rol que juegan los microorganismos en la nutrición humana, la función inmune y aumento de la

resistencia a las enfermedades; en algunos productos, será necesario asegurar que los microorganismos que se consumen están vivos y en otros, puede ser el ingrediente activo los metabolitos y/o productos de fermentación; disponibilidad de los alimentos fermentados en nichos específicos. Los alimentos fermentados han sido parte de la dieta humana durante mucho tiempo y es posible que sean parte de la dieta de los viajeros espaciales del futuro, Farnworth (2008).

Los consumidores han incrementando el manejo de su salud, generando nuevas oportunidades de mercado para la industria alimentaria y farmacéutica. Los fabricantes de alimentos y bebidas están adoptando tecnologías genómica y proteómica previamente al dominio de la industria farmacéutica para diseñar productos más sofisticados y novedosos. Debido a la explotación del concepto de probióticos, los productos confiables y probados necesitan ser fácilmente distinguibles. El 45% de los estadounidenses dicen creer en gran parte o totalmente la información de los alimentos y etiquetas de salud de los fabricantes de alimentos y bebidas, una cifra similar a Francia y mayor que en los países bajos, Datamonitor (2005). La evolución de los productos probióticos, por lo tanto, requiere cambios en las regulaciones relacionadas con las declaraciones del etiquetado, la seguridad y la salud, Kun Lee y Salminen (2009).

La posibilidad de probióticos genéticamente modificados para condiciones clínicas demanda una estrategia de seguridad para prevenir la propagación en el medio ambiente y la diseminación de modificación genética Kun Lee y Salminen (2009).

La autorización para etiquetar un producto probiótico debe permanecer dependiente de la conformidad con la definición de probiótico de la FAO/OMS. Las etiquetas deben incluir información para los consumidores o profesionales sobre la identidad del organismo(s), su estatus organismos genéticamente modificados; cuenta viable, vida de anaquel, la dosis, la duración, las condiciones para su utilización y las no apropiadas; beneficios probados, efectos secundarios, especialmente los síntomas que requieren una evaluación clínica, y una recomendación para asesorar a los profesionales de la salud en el uso de probióticos, Reid (2006). Cuando se sospeche una reacción adversa, para facilitar el reporte con detalles del producto debería estar disponible en una base nacional,

así como, efectos adversos de otras terapias. Guías han sido propuestos para evaluar la eficacia y seguridad de los probióticos, pero no ha realizado un acuerdo internacional. Un consenso de normas uniformes es deseable para garantizarla identidad inequívoca, los procesos de manufactura de calidad, el etiquetado preciso, seguridad y eficacia de un producto, para que tenga los meritos en la etiqueta de ser "probióticos", Kun-Lee y Salminen (2009).

También establece las recomendaciones de: a) La adopción de la definición de probióticos como "microorganismos vivos los cuales cuando son administrados en cantidades adecuadas confieren beneficios a la salud del consumidor. b) La adopción y el uso de la guía FAO/OMS como prerrequisito para denominar una cepa probiótico. c) El marco regulatorio para autorizar en la etiqueta de un alimento probiótico, un beneficio específico a la salud, en caso donde existir evidencia científica, deberá ser requerida esta guía en adelante. d) Promover internacionalmente la guía. e) Aplicación de buenas prácticas de manufactura en la elaboración del alimento probiótico con calidad y condiciones de vida de anaquel. Y f) Desarrollar métodos (in vitro e in vivo) para evaluar la funcionalidad y seguridad de los probióticos. Adicionalmente Reid (2005) da una lista de pasos clínicos para que los probióticos sean r aceptados por la comunidad médica, que incluye además de las anteriores: 1. datos de pruebas clínicas Fase I y II sobre las cepas y los productos finales que demuestren los beneficios de salud; 2. El desarrollo de organismos probióticos portadores de vacuna u otras sustancias beneficiosas para el huésped; 3. El desarrollo de probióticos anti-virales; y 4. El incremento de cepas probadas de beneficio en la cavidad oral, nasofaringe, tracto respiratorio, estómago, vagina, vejiga y piel, así como para el cáncer, las alergias y la recuperación de la cirugía y lesiones.

La capacidad para evaluar la microbiota intestinal se ha extendido dramáticamente con el advenimiento de las técnicas moleculares. Tales avances conduce al desarrollo de una nueva generación de probióticos, que podrían ser seleccionados para enfermedades asociadas a la flora intestinal, para facilitar el uso potencial de las bacterias probióticas genéticamente modificados para usos farmacéuticos, como vehículo para liberar vacunas en el tracto gastro-intestinal, vectores de

expresión-secreción, portadores de moléculas inmunomoduladoras, vectores para la liberación de ingrediente activo en objetivos específicos en el tracto gastrointestinal, Reid (2005).

No hay campo del desenvolvimiento humano, ya sea en la industria, en la agricultura, en la preparación de alimentos o relacionando con los problemas de la vivienda o del vestido, la conservación de la salud humana y animal, o la lucha contra la enfermedad, donde el microbio no desempeñe un papel importante y con frecuencia fundamental, Waksman (1942).

## **Hipótesis**

Si son productos lácteos fermentados entonces contienen microorganismos viables y en gran cantidad.

Si los microorganismos utilizados en la fermentación son bacterias ácido lácticas entonces deben poseer las características típicas.

Si los productos lácteos fermentados se elaboraron con calidad deben de cumplir con estándares sanitarios, fisicoquímicos y organolépticos.

## Objetivos

### Objetivo general

Evaluar la calidad microbiológica, fisicoquímica y los microorganismos probióticos en productos lácteos fermentados comerciales en la ciudad de Ocotlán, Jalisco.

### Objetivos particulares

- 1.- Censo de los Productos Lácteos con microorganismos probióticos en la ciudad de Ocotlán
- 2.-Evaluar la calidad Microbiológica, fisicoquímica y organoléptica de los productos lácteos fermentados seleccionados
  - 2.1 Yogurt
  - 2.2 Leches fermentadas
- 2.- Aislar, identificar y cuantificar los microorganismos probióticos en las leches fermentadas.
  - 2.1.- Aislar los microorganismos probióticos de las leches fermentadas comercializadas en la ciudad de Ocotlán
- 3.- Identificar y cuantificar los microorganismos de Probióticos aislados de las leches fermentadas
  - 3.1.- Técnica de Siembra por superficie.
  - 3.2.- Técnica de PCR (RADP)
  - 3.3.- Perfil bioquímico de microorganismos probióticos
- 4.- Realizar un estudio piloto en la comunidad universitaria de la ciudad de Ocotlán sobre la percepción de los productos lácteo...

## **Material y Métodos**

Los métodos aplicados en el Estudio, se plantearon de acuerdo a seis etapas realizadas para dar respuesta al objetivo general y los particulares se desarrollo de la siguiente manera.

1. Una investigación de mercado.
2. Una revisión bibliográfica de guías y técnicas de evaluación de las bacterias ácido láctica.
3. Evaluación del Yogurt.
4. Evaluación de Leches fermentadas.
5. Variabilidad genética de las bacterias ácidos lácticas aisladas de leches fermentadas.
6. Un estudio de percepción de los productos lácteos fermentados y microorganismos probióticos.

**Una investigación de mercado.** Se utilizo como método un censo en los supermercados de la ciudad, para conocer los tipos y variedades de leches fermentadas en Ocotlán, Jalisco, México.

**Una revisión bibliográfica de guías y técnicas de evaluación de las bacterias ácido láctica.** El método utilizado, consistió en realizar una revisión bibliográfica en bases o bancos de información de universidades y organismos nacionales e internacionales, así como en la literatura científica (artículos, libros, folletos, etc.) generada por expertos en el área con la finalidad de conocer el estado, sobre los parámetros a evaluar y los métodos de análisis a realizar a los alimentos y microorganismos probióticos, para garantizar su seguridad, y el o los, beneficios señalados al ser consumidos. El universo de estudio fue la bibliografía existente en bases de datos o revistas para conocer la existencia de guías o estándares, así como, técnicas para la evaluación de microorganismos probióticos en alimentos.

**Evaluación del Yogurt.** Productos: 3 marcas, 6 variedades y 60 muestras. Las muestras analizadas corresponden a tres marcas comerciales de yogurt, Danone,

Yoplait y Lala, en sus dos variantes batido y para beber, siendo todas de sabor fresa.

Muestreos y manejo de muestras. El universo de estudio comprende la ciudad de Ocotlán, Jalisco, los expendios de venta del producto al público son supermercados. El muestreo fue estratificado y al azar, en la mañana al inicio de semana, transportándose en una hielera portátil, realizando el análisis dentro del transcurso de las dos horas siguientes.

Los parámetros evaluados fueron:

Las características fisicoquímicas: temperatura (parámetro tomado en el punto de venta durante el muestreo), pH, acidez, viscosidad.

Las características microbiológicas: coliformes totales (NOM-112-SSA1-1994), *Staphylococcus aureus* (NOM-115-SSA1-1994), y *Salmonella* (NOM-114-SSA1-1994).

Las características organolépticas: color, olor, sabor y textura. De acuerdo a la prueba de perfil del sabor (flavor profile test) (Pedrero et al, 1997), utilizando un panel de jueces del tipo Afectivo o consumidor, para evaluar aceptación, preferencia o nivel de agrado.

Todos los análisis se efectuaron de acuerdo a las técnicas y procedimientos autorizados y reglamentados por la Secretaria de Salud.

**Evaluación de Leches fermentadas.** Productos: 4 marcas, 4 variedades y 60 muestras. El universo de estudio fue la ciudad de Ocotlán, Jalisco, los expendios de venta del producto fueron los supermercados.

Muestreos y manejo de muestras. El muestreo fue estratificado y al azar, en la mañana al inicio de semana, transportándose en una hielera portátil, realizando el análisis dentro del transcurso de las dos horas siguientes. Las muestras analizadas que corresponden a cuatro marcas comerciales de leches fermentadas, Lalacult, Chamito, Yakult y Activia, siendo todas de sabor natural, identificadas como marcas 1, 2, 3 y 4.

Los parámetros evaluados fueron:

Las características fisicoquímicas: (Richardson, 1985): temperatura (parámetro tomado en el punto de venta durante el muestreo), pH, acidez.

Las características microbiológicas: Bacterias ácido lácticas, recuento en MRS 37°C/72h. (Shah, 2000) y APT37°C/72h. (Fernández-Escartín, 2009), Coliformes totales (NOM-112-SSA1-1994), *Staphylococcus aureus* (NOM-115-SSA1-1994), y *Salmonella* (NOM-114-SSA1-1994).

Las características organolépticas: color, olor, sabor y textura. De acuerdo a la prueba de perfil del sabor (flavor profile test) (Pedrero et al, 1997), utilizando un panel de jueces del tipo Afectivo o consumidor, para evaluar aceptación, preferencia o nivel de agrado.

Perfil Bioquímico: Tinción de Gram, movilidad, catalasa, resistencia a sales biliares, resistencia al ácido, fermentación de lactosa, glucosa y fructosa.

Todos los análisis se efectuaron de acuerdo a las técnicas y procedimientos autorizados y reglamentados por la Secretaría de Salud.

**Variabilidad genética de las bacterias ácidos lácticas aisladas de leches fermentadas.** Productos: 4 marcas, 4 variedades, 60 muestras y 40 cepas. El universo de estudio fue la ciudad de Ocotlán, Jalisco, los expendios de venta del producto fueron los supermercados. El muestreo fue estratificado y al azar, en la mañana al inicio de semana, transportándose en una hielera portátil, realizando el análisis dentro del transcurso de las dos horas siguientes. Se recolectaron 60 muestras que corresponden a cuatro marcas comerciales de leches fermentadas, siendo todas de sabor natural, identificadas como marcas 1, 2, 3 y 4, de las cuales se aislaron 40 cepas, a las cuales se les determinó la diversidad genética. Los productos lácteos fermentados analizados, con sus microorganismos probióticos denominados en la etiqueta son Yakult (*Lactobacillus casei shirota*), Lalacult (*Lactobacillus casei*), Chamito (*Lactobacillus johnsonii*) y Activia (Bifidobacterias)

**Un estudio de percepción de los productos lácteos fermentados y microorganismos probióticos.** El universo de estudio fue la ciudad de Ocotlán, Jalisco, se aplicó una encuesta a la población de estudiantes de bachillerato, través de un muestreo estratificado y al azar. Aplicándose 112 encuestas, mayoritariamente a la población de 15-19 años. El instrumento consistió en preguntas abiertas, para conocer los motivos y la frecuencia del consumo de los productos lácteos fermentados, teniendo cuatro categorías 1.- Consumo de

lácteos fermentados. 2. Microorganismos Probióticos. 3. Dieta alimentaria y 4. Funcionamiento digestivo.

**Técnicas fisicoquímicas:** (Richardson, 1985)

**Método para determinación de temperatura.** En el punto de muestreo se verifico la temperatura del termómetro del refrigerador donde estaba la muestra recolectada.

- 1.-Crear un área estéril, agitar la muestra y flamear el cuello
- 2.-Introducir un termómetro al interior del recipiente.
- 3.-Tomar la lectura.
- 4.-Reportar en °C.

**Método para determinación de Acidez.** Por titulación con una solución 0.1 N de álcali multiplicado por 0.009 dará el número de gramos de ácido láctico.

El resultado es dividido por el número total de gramos de muestra y multiplicado por 100 se obtiene el % de ácido láctico.

$$\% \text{ de acidez titulable} = \frac{\text{ml. de 0.1 N NaOH} \times 0.009}{\text{gramos de muestra}} \times 100$$

Técnica: Medir 20 ml de muestra. Añadir 2 ml de fenolftaleína y titular con hidróxido de sodio 0.1 N hasta la aparición de un color rosado persistente cuando menos un minuto.

**Método para determinación de pH.** La escala de pH es una serie de números que expresan el grado de acidez (o alcalinidad) de una solución, en comparación con la cantidad total de ácido o base de algún material.

Técnica: Se utilizo un potenciómetro calibrado inicialmente con solución buffer a pH 7 y conforme el valor se aproximaba a 4 se calibraba nuevamente a pH 4.

Para la toma de la lectura de la muestra se tomo una alícuota de 50 ml (gr) previamente homogeneizada, introduciéndose los electrodos correspondientes a pH y Temperatura dando el valor automáticamente.

**Método para determinación de Viscosidad.** Los métodos están basados en la medición de la resistencia que ofrece un fluido, cuando se le aplica una fuerza interna que lo induce al movimiento, bajo condiciones establecidas. El aparato empleado, debe ser el adecuado al grado de fluidez de la muestra. El método consiste en medir la resistencia que ofrece un fluido al movimiento rotatorio y es aplicable a fluidos no newtonianos.

Técnica Viscosímetro tipo "Broockfield"

Calibración: La calibración se lleva a cabo calculando la constante  $K$  individualmente para cada recipiente, para cada aguja y a cada velocidad con un fluido de referencia como lo indica el manual de manejo del modelo del aparato correspondiente.

Si se requiere vaciar la muestra al recipiente adecuado, introducir ambos en el baño y equilibrar la temperatura de la muestra, a la temperatura requerida para la prueba; una vez estabilizada la temperatura, proceder a seleccionar las r.p.m. y el número de aguja adecuados.

Introducir la aguja en la muestra en forma inclinada para evitar que queden burbujas en la parte inferior, una vez adentro, atornillarla en el macho del tornillo, centrarla de tal modo, que el oleaje que produzca al girar sea el mismo en todos los puntos alrededor de la aguja, ajustar el cabezal de tal forma que el menisco de la muestra quede en la marca del aguja. En estas condiciones proceder a nivelar el cabezal, guiándose por la burbuja para nivelación, encender el aparato y dejar que funcione libremente de un mínimo de 30 segundos a un máximo de un minuto.

Al cabo de este tiempo, oprimir el embrague para detener la escala y anotar la lectura señalada en ésta, repetir la operación 3 veces y promediar las lecturas.

Cálculos: Para obtener la viscosidad absoluta de la muestra en centipoises, multiplicar la lectura promedio obtenida por el factor correspondiente de la tabla no. 10.

Tabla no. 10 Calculo de la Viscosidad para Modelo "RV"

AGUJA	1	2	3	4	5	6	7
0.5 r.p.m.	200	800	2000	4000	8000	20000	80000
1.0 r.p.m.	100	400	1000	2000	4000	10000	40000
2.0 r.p.m.	50	200	500	1000	2000	5000	20000
2.5 r.p.m.	40	160	400	500	1600	4000	16000
4.0 r.p.m.	25	100	250	400	1000	2500	10000
5.0 r.p.m.	20	80	200	250	800	2000	8000
10 r.p.m.	10	40	100	200	400	1000	4000
20 r.p.m.	5	16	40	100	160	400	1600
50 r.p.m.	2	8	20	40	80	200	800
100 r.p.m.	1	4	10	20	40	100	400

### Técnicas Microbiológicas

**Método para la Preparación y Dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico.** Norma Oficial Mexicana NOM-110-SSA1-1994.

- a) Para muestras líquidas no viscosas (agua, leche, refrescos, etc.) en las cuales la distribución de microorganismos es homogénea o fácilmente homogeneizable por medios mecánicos (agitación. etc.)
- b) Agitar la muestra manualmente con 25 movimientos de arriba a abajo en un arco de 30 cm. efectuados en un tiempo de 7 segundos. Tomar 1 ml de la muestra y diluir con 9 ml del diluyente el cual debe encontrarse a una temperatura similar a ésta, evitando el contacto entre la pipeta y el diluyente, posteriormente tomar 1.0 ml de la primera dilución a agregarla a 9 ml de diluyente.

**Método para la cuenta de microorganismos coliformes totales en placa.** NOM-113-SSA1-1994. El método permite determinar el número de microorganismos coliformes, utilizando agar rojo violeta bilis en el que se desarrollan bacterias a 35°C en aproximadamente 24 hrs. dando como resultado la producción de gas y ácidos orgánicos, los cuales viran el indicador de pH y precipitan las sales biliares.

#### Procedimiento

1. Preparación de la Muestra.

2. Prepara la muestra. Método de "preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico. NOM-110-SSA1-1994.
3. Colocar en cajas petri 1 ml de la muestra o de dilución deseada.
4. Verter de 15 a 20 ml del Agar bilis rojo violeta ABRV fundido y mantenido a  $45 \pm 1.0^{\circ}\text{C}$  en BM, no debe exceder de 20 minutos.
5. Mezclar mediante 6 movimientos de derecha a izquierda, 6 en el sentido de las manecillas del reloj, 6 en sentido contrario y 6 de atrás a adelante, sobre una superficie lisa y horizontal hasta lograr una completa incorporación del inóculo en el medio; cuidar que el medio no moje la cubierta de las cajas. Dejar solidificar. Preparar una caja control con 15 ml de medio para verificar esterilidad.
6. Después de que está solidificado, verter aprox. 4 ml del medio ABRV.
7. Incluir una caja sin inóculo por cada lote de medio y diluyente preparado como testigo de esterilidad
8. Invertir las placas incubación a  $35^{\circ}\text{C}$  durante  $24 \pm 2$  horas.
9. Recuento. Seleccionar las placas entre 15 y 150 colonias.

Las colonias típicas son de color rojo oscuro, generalmente se encuentran rodeadas de un halo de precipitación debido a las sales biliares, el cual es de color rojo claro o rosa, la morfología colonial es semejante a lentes biconvexas con un diámetro de 0.5 a 2.0 mm.

**Método para la determinación de *Staphylococcus aureus* en alimentos. NOM-115-SSA1-1994**

- 1.- Preparación de la muestra. NOM-110-SSA1-1994
- 2.- Depositar 0,1 ml sobre la superficie de las placas de agar Baird-Parker. Distribuir el inóculo sobre la superficie del agar con varillas estériles de vidrio en ángulo recto.
- 3.- Invertir las placas e incubar de 45 a 48 h a  $35^{\circ}\text{C}$ .
- 4.- Seleccionar las placas que tengan las colonias típicas son negras, circulares, brillantes, convexas, lisas, de diámetro de 1 a 2 mm y muestran una zona opaca y un halo claro alrededor de la colonia.  
Numero de colonias sospechosas en placa número de colonias por probar

Menos de 50	3
51 a 100	5
101 a 150 o más	7

5.- Sembrar cada una en tubos con 0,5 ml de caldo de infusión cerebro-corazón.

6.- Incubar a 35°C durante 24 h.

7.- Pasar con una pipeta de 1 ml, 0,3 ml de cada cultivo a otro tubo y conservarlo para prueba de termonucleasa. El resto para la prueba de coagulasa.

8.- Prueba de coagulasa. Agregar a los 0,2 ml del cultivo anterior, 0,2 ml de plasma de conejo diluido volumen a volumen con solución salina estéril.

9.- Incubar en BM 35 a 37°C y observar durante 6 h a intervalos de 1 h; si no hay formación de coágulo, observar a las 24 h. Positiva si hay coágulo.

Para comprobar la coagulabilidad del plasma de conejo se añade una gota de cloruro de calcio al 5% a 0,5 ml de plasma reconstituido empleado, formándose un coágulo en 10-15 seg.

10.- Prueba de termonucleasa. Calentar durante 15 min., 0,3 ml de cultivo en caldo de infusión cerebro-corazón en baño de agua hirviendo. Pasar una gota de c/cultivo con pipeta Pasteur a un orificio del medio.

11.- Incubar a 35°C en cámara húmeda de 4 a 24 h. La aparición de un halo color rosa extendido de por lo menos 1 mm se califica como positiva.

**Método para la determinación de Salmonella en alimentos. NOM-114-SSA1-1994**

1.- Procedimiento general para la preparación de muestras. Pesar asépticamente 25 g de la muestra. Adicionar 225 ml de solución verde brillante al 0,1%

2.- Incubar 24 hr.  $\pm 2$  h a 35°C.

3.- Aislamiento de Salmonella. Transferir respectivamente 1 ml de la mezcla a 10ml de caldo tetrionato (CT) y a 10 ml de caldo selenito cistina (CSC).

4.- Incubar de 18 a 24 h a 35°C

5.- Mezclar el tubo con CT y CSC y estriar en agar xilosa lisina desoxicolato (XLD), agar verde brillante (VB) y Sulfito de Bismuto.

6.- Incubar las placas 24 hr.  $\pm 2$  h a 35°C. Colonias típicas de Salmonella:

Agar XLD: colonias rosas o rojas que pueden ser transparentes con o sin centro negro. En algunos casos las colonias pueden aparecer completamente negras.

Agar VB: colonias rojas o rosas que pueden ser transparentes rodeadas por medio enrojecido; las bacterias fermentadoras de la lactosa dan colonias amarillas.

Agar Sulfito de Bismuto: las colonias típicas de Salmonella pueden ser cafés, grises o negras; con o sin brillo metálico. Generalmente el medio circundante (halo) es café, tornándose posteriormente negro. Algunas cepas producen colonias verdes sin la formación del halo oscuro. Si las placas no muestran colonias típicas o no se observa crecimiento, incubar 24 h adicionales.

7.- Identificación bioquímica. Seleccionar al menos dos colonias típicas de cada medio selectivo y sembrar por estría en la superficie inclinada y por punción en el fondo, dos tubos, uno con agar triple azúcar hierro (TSI) y otro con agar hierro lisina (LIA).

8.- Incubar por 18 a 24 h a 35°C

Agar TSI: en fondo del tubo vire del indicador; en la superficie del medio se observa un color rojo más intenso. En la mayoría de los casos coloración negra a lo largo de la punción producción H<sub>2</sub>S.

Agar LIA: se observa intensificación del color púrpura en todo el tubo. Mayoría de Salmonella producen ácido sulfhídrico.

### **Técnicas para análisis Organolépticos**

**Análisis organolépticos.** Las muestras deben ser representativas del material, lote o proceso de estudio. Durante la preparación de la muestra no se deberán introducir sabores, olores, cambios en la apariencia o colores ajenos al producto. Se debe mantener uniformidad en la presentación de las muestras que se ofrecen al juez. Esto incluye cantidad servida, forma o apariencia de la porción entregada, temperatura, recipientes y utensilios para la toma de muestras. Es importante considerar el orden de presentación de las muestras, ya que los individuos responden de una forma diferente sólo por la posición que guarda una muestra con respecto a otra. Los utensilios (platos, cucharas, recipientes, etc.) deberán

uniformarse. Es importante tener presente que el enjuague bucal es el proceso por medio del cual el juez elimina materiales residuales luego de una degustación. Para esta eliminación generalmente se emplea agua destilada, la cual se expectora, no se traga. El material de enjuague depende del tipo de muestra que se analiza; por ejemplo para aceite y grasas se emplea agua caliente; para carnes y especias, pan y agua. Pueden elegirse varios materiales de enjuague. Lo que se recomienda es que sean los más sencillos y que a su vez no introduzcan otras variables al estudio o influyan en futuras evaluaciones. Por eso el agua destilada es lo más efectivo y conveniente. Los instrumentos principales para efectuar la evaluación sensorial son los órganos sensores y la capacidad integradora de los jueces. Se llama juez al individuo que está dispuesto a participar en una prueba para evaluar un producto valiéndose de la capacidad perceptiva de uno o varios de sus sentidos.

Se distinguen dos tipos de jueces:

- Analítico u objetivo, para evaluar diferencias, intensidades y calidades de muestras
- Afectivo o consumidor, para evaluar aceptación, preferencia o nivel de agrado.

Técnica: Prueba de perfil del sabor ("Flavor Profile Teste") (Pedrero y Pangborn, 1997)

La prueba se genera de tal manera que se genera el mayor contenido de información posible acerca del producto. Esta prueba de análisis del sabor incluye varias dimensiones:

- Aroma perceptible, gusto, sabor y atributos táctiles (también llamados "notas de carácter")
- Grado de intensidad de cada factor, calificado según la siguiente escala:  
X= Suave  
XX= Ligeramente ácido  
XXX= Ácido  
XXXX= Muy ácido
- Orden de aparición de estos factores
- Resabio

- Amplitud o impresión global del sabor.

El desarrollo de esta técnica requiere, en primer lugar, sesiones de orientación en las cuales el coordinador del grupo desglose los objetivos del proyecto y presente muestras del producto. Se establecen los lineamientos del análisis (manejo de muestra, requerimientos de referencias), así como el vocabulario de términos descriptivos. Se efectúan varias sesiones con el producto problema, hasta llegar a un consenso grupal, definiendo el perfil del sabor de dicho producto. Se realizan sesiones individuales para calificar al producto con base en la terminología o el perfil acordado. Dependiendo del producto en estudio, se proveerán muestras referencia para identificar a éstas en la muestras problema. La presentación de las muestras se hará de tal manera que se puedan apreciar todos sus atributos (bajo luz blanca, a la temperatura propicia y en un recipiente adecuado, etc.). Se seleccionan entre 6 y 10 individuos que deben entrenarse exclusivamente en la técnica, tienen que mostrar interés en participar, así como una habilidad para identificar sabores básicos, reconocer e identificar olores y discriminar intensidades de sabores.

**Textura:** Es el análisis sensorial de la complejidad de la textura en un alimento en términos de sus características mecánicas, geométricas y de la intensidad de su presencia, así como el orden en el cual éstos se presentan desde la primera mordida y a través de la masticación hasta consumir el producto. La prueba de perfil de textura, basada en la prueba de perfil de sabor, comprende los siguientes parámetros:

- Características mecánicas: relativo a la reacción del alimento ante el esfuerzo. Se subdivide en los siguientes parámetros:
  - Primarios: dureza, cohesión, viscosidad, reconstrucción y adhesividad.
  - Secundarios: quebradizo, correoso, gomoso
- Características geométricas: Relativo a la percepción de la forma del alimento. Se subdivide en dos parámetros:
  - Aquellas relacionadas con el tamaño y la forma de las partículas, como arenoso y granuloso.

- Aquellas relacionadas con la forma y la orientación, tal como fibrosos y hojueloso.
- Otras características: Relativo a la sensación que provoca la presencia de la humedad y de lípidos.

La prueba de perfil de textura requiere que primero se defina la terminología y se estructuren las escalas que han de utilizarse, y más tarde se evalué, de acuerdo con dicha terminología y escalas, al producto problema.

### **Método de recuento de Bacterias Ácido Lácticas.**

Procedimiento.

- 1.- Preparar un banco de diluciones a partir de la muestra.
- 2.- Inocular mediante la técnica de siembra por superficie 0.1 ml. de cada dilución deseada, sobre una placa de MRS y APN, previamente marcada y adicionadas de 15 a 20 ml. del medio de cultivo solidificado.
  - a. Incubar a 37°C durante 48-72 hrs, en anaerobiosis.
  - b. Realizar el recuento de las bacterias ácidos lácticos.
  - c. Identificación de las bacterias lácticas.
    - Caracterización de la morfológica colonial.
    - Caracterización del gran y la morfología microscópica
    - Siembra a caldo y agar MRS.
    - A partir del caldo hacer movilidad; colocando una asada de cultivo sobre un porta-objetos y haciendo observación microscópica.
    - A partir del agar MRS realizar:

### **Prueba de Catalasa.**

- 1.- Se coloca una gota de peróxido de hidrógeno en un porta-objeto.
- 2.- Con una asa de nicromo se toma una colonia de un caja de cultivo.
- 3.- Se agrega la colonia seleccionada de la caja de cultivo en la gota de peróxido de hidrógeno.

Resultado positivo presencia de burbujas

Resultado negativo no hay presencia de burbujas.

Tinción de Gram.

- 1.- Con un asa de nicromo se toma una colonia de una caja de cultivo de MRS.
- 2.- Con la colonia seleccionada de la caja de cultivo se elabora un frotis.
- 3.- Se cubre el frotis con el colorante violeta cristal de Gram dejando reaccionar 1 minuto, evitando el exceso de colorante y lavar con la piceta.
- 4.- Se aplica el reactivo de yodo de Gram y dejar reaccionar durante 1 minuto y se lava con piceta nuevamente.
- 5.- Se agrega el reactivo alcohol-acido y se deja reacción de 20 a 30 segundos, y se lava con piceta nuevamente.
- 6.- Finalmente se añade la solución de safranina de Gram y dejar reaccionar 1 minuto. Lavar el exceso de colorante y secar al aire.
- 7.- Observar la muestra con el objetivo de inmersión e indicar los colores de los organismos. Realice un dibujo.

#### **Resistencia a sales biliares.**

- 1.- Se realiza la misma técnica de recuento de las Bacterias Ácido Lácticas, utilizando medio de cultivo MRS pH 5.5 + sales biliares.

Resultado positivo presencia de crecimiento.

Resultado negativo no hay crecimiento.

#### **Resistencia al ácido**

- 1.- Se toma muestra del producto y se coloca en buffer de citrato a pH 3, 37°C por 5 horas
- 2.- Después se realiza la misma técnica de recuento de las Bacterias Ácido Lácticas.

Resultado positivo presencia de crecimiento.

Resultado negativo no hay crecimiento.

#### **Fermentación de carbohidratos.**

- 1.- Se realiza la misma técnica de recuento de las Bacterias Ácido Lácticas, utilizando medio de cultivo Leche en polvo rehidratada al 15%.

Resultado positivo presencia de crecimiento.

Resultado negativo no hay crecimiento.

## **Técnicas para el análisis genético**

Crecimiento y desarrollo bacteriano. Se prepararon tubos con 5 mL de caldo MRS, se inocularon con las bacterias lácticas aisladas de los recuentos previos. Se incubaron en agitación constante de 150 rpm a 37 °C (los tubos inoculados con bacterias que se tenía el conocimiento que eran aeróbicas), y sin agitación las anaeróbicas. La incubación perduro hasta que se podía apreciar un desarrollo celular muy visible.

**Extracción de DNA bacteriano.** La extracción de DNA genómico de las cepas aisladas se llevó a cabo de acuerdo con el método CTAB/NaCl (Wilson, 1987). Las células procedentes de los cultivos fueron centrifugadas en tubos Eppendorf, originando una pastilla celular, la cual se suspendió en 500 µL buffer TE 10:1 (10 mM tris [pH 8], 1 mM EDTA [pH8]). Se agregaron 300 mg de perlas de vidrio y 300 µL de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1), ésta mezcla se agitó en vórtex durante 6 min alternando 2 min en hielo por cada 2 min de agitación. Al terminar la agitación se centrifugaron los tubos 10 min a 13.300 rpm, la fase acuosa se pasó a un nuevo tubo, al cual se le agregó un volumen igual de buffer de extracción (bromuro de cetiltrimetilamonio [CTAB], 2 % [p/v]; tris-HCl [pH 8], 100 mM; NaCl 1,4 M; EDTA [pH 8], 20 mM; polivinilpirrolidona [PVP] 2 % [p/v]). Se incubó durante 5 min a 65 °C en un termoblock. Después del tratamiento térmico, se le agregó un volumen igual de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1), esta mezcla se centrifugó durante 15 min a 13.300 rpm. Nuevamente se pasó la fase acuosa a un tubo nuevo y se agregó acetato de amonio 0.2 M 1/10 parte del volumen total y 2 volúmenes de etanol absoluto, se mezclaron y se dejó reposar la mezcla durante 30 min a -20 °C. Posteriormente, se centrifugó la mezcla, se realizaron 2 lavados con etanol al 70 % y DNA se resuspendió en buffer TE.

Análisis de la variabilidad genética con RAPDs. Se obtuvieron 10 muestras de DNA de diferentes cepas aisladas de cada uno de los productos a analizar.

### **Calidad y cantidad del DNA**

Calidad del DNA. La calidad del DNA fue determinada espectrofotométricamente calculando la ratio de absorbancias entre 260 y 280 nm, agregando 1 mL de agua bidestilada y 5 µL de DNA de la muestra a analizar en una celda de cuarzo y a

continuación sellando la celda utilizando papel parafilm, posteriormente, se invirtió la celda de 5 a 10 veces con el objetivo de homogeneizar la muestra. Una vez homogeneizada la solución se dejó reposar durante 10 s, y posteriormente se calculó el ratio de absorbancias a las longitudes de onda ya mencionadas anteriormente. Comprobando los resultados obtenidos electroforéticamente en geles de agarosa al 1 % [p/v] teñidos con una solución con bromuro de etidio (0,8 µg/mL) durante 20 min para observarlo en la cámara de luz UV, siguiendo los procedimientos establecidos por Sambrook y Rusell (2001). Donde una relación de absorbancia  $A_{260/280}$  entre 1,7 a 2, se considera de buena calidad.

Cantidad del DNA. La cantidad fue determinada tomando en cuenta la lectura a 260 nm siguiendo los procedimientos establecidos por Sambrook y Rusell (2001), calculando con la fórmula siguiente:

$$\text{Cantidad } (\mu\text{g/mL}) = A * 50 * D$$

Donde: A = Absorbancia a 260 nm y D = Factor de dilución

Condiciones de PCR para realizar los RAPDs. Una vez obtenida la concentración del DNA de las muestras y habiendo determinado la calidad de las mismas, se procedió a realizar los RAPDs. Las amplificaciones RAPD se realizaron utilizando un termociclador Techne modelo TC-412. Se trabajó con un volumen final de reacción de 10 µL conteniendo: 10 ng de DNA bacteriano, 0.2 mM de dNTPs, 3 mM de MgCl<sub>2</sub> 1 U de Taq polimerasa, 0.4 µM de oligo (6 oligos pertenecientes a la colección de decámeros "Operon technologies Inc, USA") (Tabla 3). Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 1 ciclo de 5 min a 94 °C, seguido de 43 ciclos (1 min a 94 °C, 1 min a 40 °C, 2 min a 72 °C), y un último ciclo de 10 min a 72 °C

Tabla 3.Oligos utilizados en el presente trabajo.

Número de oligo	Nombre del oligo	Secuencia (5' → 3')
1	OPA-04	AATCGGGCTG
2	OPL-14	GTGACAGGCT
3	OPN-10	ACAACCTGGGG
4	OPO-19	GGTGCACGTT
5	OPQ-15	GGGTAACGTG
6	OPR-08	CCCGTTGCCT

Los productos de la amplificación fueron separados en un gel de agarosa 2% (p/v) en buffer TAE 1X, aplicando un voltaje constante de 100 V durante 3 h. después se realizó una tinción con una solución de bromuro de etidio (0,8 µg/mL) durante 20 min, para posteriormente observarlo en la cámara de luz UV, evaluando la cantidad y calidad de bandas amplificadas. El patrón de bandeo fue analizado asignando un "1" a la presencia o "0" a la ausencia de banda. Con el patrón de bandeo generado, se construyó una matriz binaria de datos, la cual fue utilizada para calcular los valores de similitud genética entre cada genotipo, usando el coeficiente de similaridad de Jaccard (Jaccard, 1908; Winzer y col., 2004). El dendograma fue elaborado aplicando el algoritmo UPGMA (por sus siglas en inglés: Unweighted Pair-Group Method with Arithmetical Averages) (Rohlf, 1997). Análisis estadísticos. Se llevó a cabo un análisis de similaridad utilizando el coeficiente de Jaccard (Sneath y Sokal, 1976), obteniendo un análisis de agrupamiento de las cepas (dendograma) basado en el algoritmo UPGMA (Método de grupo par no ponderado con media aritmética). Para el análisis de datos se utilizó el programa computacional NTSYS-PC (Rohlf, 1987).

Test aplicado en el estudio de percepción de los productos lácteos fermentados y microorganismos probióticos, es el siguiente:

**ENCUESTA SOBRE PREFERENCIAS EN CONSUMO DE PRODUCTOS LACTEOS  
FERMENTADOS CON MICROORGANISMOS PROBIOTICOS**

ENCUESTADOR \_\_\_\_\_  
NUMERO \_\_\_\_\_  
LUGAR \_\_\_\_\_  
FECHA Y HORA \_\_\_\_\_

SEXO FEMENINO \_\_\_\_\_ MASCULINO \_\_\_\_\_ ESTADO CIVIL \_\_\_\_\_  
FECHA DE NACIMIENTO \_\_\_\_\_ EDAD \_\_\_\_\_  
A QUE SE DEDICA \_\_\_\_\_ NIVEL DE ESTUDIOS \_\_\_\_\_

**PRIMERA PARTE**

SI LA RESPUESTA ES NO PASE A LA SEGUNDA PARTE

1.-USTED CONSUME PRODUCTOS LACTEOS SI \_\_\_\_\_ NO \_\_\_\_\_ A VECES \_\_\_\_\_  
CUAL \_\_\_\_\_

2.-CONSUME USTED PRODUCTOS LACTEOS FERMENTADOS? SI \_\_\_\_\_ NO \_\_\_\_\_  
QUE MARCA \_\_\_\_\_ QUE TIPO \_\_\_\_\_  
QUE CANTIDAD QUE CONSUME (APROXIMADAMENTE) \_\_\_\_\_  
POR QUE LO CONSUME \_\_\_\_\_  
CADA CUANDO LO CONSUME \_\_\_\_\_

**SEGUNDA PARTE**

3.- HA OIDO HABLAR DE MICROORGANISMOS PROBIOTICOS SI \_\_\_\_\_ NO \_\_\_\_\_  
QUE SON? \_\_\_\_\_  
PARA QUE LE SIRVEN? \_\_\_\_\_

**TERCERA PARTE**

4.- REGULARMENTE CUANTAS VECES COME AL DIA \_\_\_\_\_  
QUE ES LO QUE COME NORMALMENTE? \_\_\_\_\_

5.- CUANTAS HORAS DUERME AL DIA? \_\_\_\_\_

**CUARTA PARTE**

6.- A TENIDO ALGUN MALESTAR INTESTINAL SI \_\_\_\_\_ NO \_\_\_\_\_  
CUAL? \_\_\_\_\_

7.- ¿CUANTAS VECES VA AL BAÑO AL DIA? \_\_\_\_\_  
¿CUANTAS VECES ORINA? \_\_\_\_\_ ¿CUANTAS VECES DEFECA? \_\_\_\_\_

## Resultados

La Estudio realizado para dar respuesta al objetivo general y los particulares se desarrolló de la siguiente manera.

1. Se realizó una investigación de mercado, a través de un censo en los supermercados de la ciudad, para conocer los tipos y variedades de leches fermentadas en Ocotlán, Jalisco, México.
2. A continuación se llevó a cabo una revisión bibliográfica, para encontrar guías y técnicas de evaluación de las bacterias ácido láctica, a partir de las cuales, se seleccionarían los métodos y técnicas a desarrollar para evaluar los productos lácteos fermentado de la región.
3. Posteriormente se evaluaron las características microbiológicas (perfil de inocuidad alimentaria), Físicoquímicas y organolépticas de tres marcas de yogurt, en sus variedades cuchareable y de beber.
4. En la siguiente fase se valoraron las características microbiológicas (perfil sanitario y tecnológico), físicoquímicas y organolépticas de cuatro marcas de leches fermentadas.
5. A continuación se determinó la variabilidad genética de las bacterias ácidos lácticas aisladas de leches fermentadas.
6. Por último, se elabora un estudio de percepción de los productos lácteos fermentados y microorganismos probióticos.

Para efectos de este estudio, se consideró como productos lácteos fermentados, al obtenido de la fermentación de la leche mediante la acción de microorganismos específicos cuyo resultado sea la reducción del pH, adicionado o no de aditivos para alimentos e ingredientes opcionales, de acuerdo a la norma NOM-185-SSA1 2002. Esta norma tiene correspondencia con la norma del Codex Alimentarius, CODEX STAN 243-2003, para las leches fermentadas, definida como un producto lácteo obtenido por medio de la fermentación de la leche, que puede haber sido elaborado a partir de productos obtenidos de la leche con o sin modificaciones en la composición, por medio de la acción de microorganismos adecuados y teniendo como resultado la reducción del pH con o sin coagulación (precipitación

isoeléctrica). Estos cultivos de microorganismos serán viables, activos y abundantes en el producto hasta la fecha de duración mínima. Si el producto es tratado térmicamente luego de la fermentación, no se aplica el requisito de microorganismos viables. Ciertas Leches Fermentadas se caracterizan por un cultivo específico (o cultivos específicos) utilizado. Estas incluyen: Yogur, Yogur en Base a Cultivos Alternativos, Leche Acidófila, Kefir y Kumys.

**Censo de Leches Fermentadas.** En la investigación de mercado desarrollada en la ciudad de Ocotlán, primeramente se ubicaron la cantidad de supermercados existentes, siendo dos. Enseguida se realizó el censo de los productos lácteos fermentados. Para efectos del censo se consideraron como los Lácteos fermentados, los yogurts y las leches fermentadas. Los datos obtenidos del Censo son enlistados en la Tabla no. 19.

Tabla no. 19 Leches fermentadas expendidas en los supermercados de la ciudad de Ocotlán

Número	Producto	Número	Producto
1	Yogurt Danone	23	Yoghurt LALA Light
2	Activia	24	Yoplait
3	Danonino	25	Yoplait frutas
4	Danup	26	Yoplait frutas bebible
5	Vitalinea	27	Yoplait natural
6	Flora	28	Yoplait Pro digestión
7	Svelty	29	Yoplait Yop
8	Chamyto	30	Yoplait light
9	Svelty Gastro Protect	31	Yoplait cereales
10	Acticol	32	Yoplait licuado
11	Yakult	33	Yopli
12	Sofúl	34	Alpura Natural
13	Sofúl para beber	35	Alpura Cremoso
14	Yakult 40 LT	36	Alpura Deslactosado
15	licuado de yogurt Lala	37	Alpura bebible
16	Yoghurt Batido LALA Clásico	38	Alpura bebible deslactosado
17	Yoghurt Bebible LALA Clásico	39	Alpura Vivendi
18	Yoghurt Funcional Batido LALA BioBalance	40	Alpura Cero
19	Yoghurt Funcional Bebible LALA BioBalance	41	Yogurt Sello Rojo
20	LALA Bio 4	42	Yogurt Tapatia
21	Lala Lacult	43	Yogurt 19 hermanos
22	Yoghurt Lala Siluette	44	Yogurt Lactigurt

De los productos censados, se hallaron yogurt, yogurt a base de cultivos alternativos y leches fermentadas sin denominación específica de cultivo. Cabe mencionar que en los ingredientes de las leches fermentadas, en el rubro de los microorganismos añadidos, solo se especifica adición de cultivos lácticos, en

la mayoría de los casos. Además se evaluó la demanda de los mismos, por los consumidores, encontrando que los yogurts más vendidos son las marcas Danone, Yoplait y Lala; y respecto de las leches fermentadas las marcas Yakult, Activia, Chamito y Lalacult.

**Guía y Técnicas de evaluación de las bacterias ácido lácticas (BAL).** La revisión bibliográfica, se realizó ante la necesidad de conocer el estatus actual sobre los sistemas de evaluación de los alimentos fermentados que contienen microorganismos que benefician al ser humano, además de las ventajas nutricionales. Todo ello debido al incremento del consumo de alimentos funcionales con probióticos, prebióticos y simbióticos, a los cuales les confieren ventajas para la salud del consumidor.

De la exploración bibliográfica, se detectó, La FAO/OMS, (2002) establece los criterios y evaluación que se deben de realizar a un microorganismo para ser llamado probiótico y están contemplado en la Guía para Evaluación de Probióticos en Alimentos, la cual esta citada con detalle a partir de pagina 31, en el apartado de introducción.

A la vez, el gobierno mexicano no tiene tipificado, ni legislado los alimentos fermentados con microorganismos probióticos. No obstante se identificaron la Norma Oficial Mexicana NOM-185-SSA1-2002, Productos y servicios. Mantequilla, cremas, producto lácteo condensado azucarado, productos lácteos fermentados y acidificados, dulces a base de leche. Especificaciones sanitarias, la cual establece entre otros criterios, los fisicoquímicos de temperatura de almacenamiento, la acidez y el pH. Además puntualiza los grupos microbianos que se deben de analizar y sus límites, para garantizar inocuidad. A la vez la Norma Oficial Mexicana NOM-181-SCFI-2010, Yogurt-Denominación, especificaciones fisicoquímicas y microbiológicas, información comercial y métodos de prueba. Ya determina la cantidad y tipo de microorganismos que deben de contener el yogurt y tiene cierta correspondencia con la norma del Codex para Leches Fermentadas CODEX STAN 243-2003.

**Evaluación del Yogurt.** En este primer análisis experimental se evaluaron los parámetros fisicoquímicos y microbiológicos establecidos en la norma NOM-185-

SSA1-2002. Los datos obtenidos de las 60 muestras analizadas, correspondientes a las 3 marcas de yogurt comercial sabor fresa, tipo de beber y cuchareable, se presentan por el tipo de análisis realizados, los fisicoquímicos de temperatura en grados centígrados (°C), pH y acidez en por ciento (%), los microbiológicos de Coliformes y *Staphylococcus aureus* en unidades formadoras de colonia por gramo (UFC/g), y *Salmonella* en ausencia o presencia en 25 gramos y los organolépticos de color, sabor, olor y textura.

La tabla no. 20 muestran los resultados de los análisis fisicoquímicos de todas las marcas de yogurt, en ellos la marca 1, están dentro de las condiciones normales del yogurt, habiendo valores de temperatura de almacenamiento igual o menores de 6°C, con acidez mayor de 1.25%, pH igual o menores de 4.4, por último la viscosidad oscila entre 280 y 840 cps para el yogurt e beber y de 3400 a 5500 cps en el yogurt cuchareable.

Los datos obtenidos en la marca no. 2, expresa los valores de Temperatura de 13°C a 20°C, demostrando malas condiciones de almacenamiento, a pesar de que los productos fueron muestreado del mismo comercio, pero puede por tener refrigerados abiertos o mal mantenimiento de los mismos. La acidez de 1.51% al 1.87% denotando un yogurt acido, aunque no se exprese en el perfil de sabor. El pH dos muestras de la versión de beber fueron mayores de 4.4, el resto 4.3 a 3.6, la viscosidad de 420 a 700 cps para el producto bebible y de 3100 a 6600 cps para el fermentado cuchareable.

Los valores obtenidos de la marca no. 3, son una temperatura de 4°C a 6°C, la acidez de 1.32% a 1.8%, el pH de 3.4 a 4.5, teniendo dos muestras del yogurt cuchareable con el valor máximo obtenido y una viscosidad de 300-970 cps y 3400-5300 en los dos variedades.

Los recuentos microbiano de los yogurts, de Coliformes Totales, *Staphylococcus aureus* y *Salmonella* correspondientes al perfil sanitario obligatorio de acuerdo a la norma 185, expedida por Secretaria de Salubridad y Asistencia del Gobierno Federal de la República Mexicana resultaron todos negativos.

Tabla no. 20 Análisis fisicoquímico del yogurt en sus versiones cuchareable y de beber

Yogurt de beber		Parámetros				Yogurt cuchareable		Parámetros			
Marca	No. muestra	pH	T°	Ac%	Visc	No. de muestra	pH	T°	Ac%	Visc	
1	1	4.1	5	1.65	400	1	4.4	5	1.71	3800	
	2	4.2	5	1.54	420	2	4.3	6	1.6	4560	
	3	3.5	5	1.37	300	3	3.9	5	1.6	4100	
	4	3.7	5	1.58	840	4	3.9	5	1.54	4980	
	5	3.8	6	1.72	280	5	4	6	1.66	5500	
	6	3.6	6	1.99	400	6	3.65	5	1.73	4020	
	7	3.6	6	1.6	320	7	3.7	5	1.57	4900	
	8	3.7	5	1.71	480	8	3.7	5	1.54	3400	
	9	3.9	6	1.62	300	9	4.1	5	1.91	5000	
	10	3.9	5	1.25	620	10	3.8	6	1.62	4800	
	Máx.	4.2	6	1.99	840	Máx.	4.4	6	1.91	5500	
	Min.	3.5	5	1.25	280	Min.	3.7	5	1.54	3400	
	Promedio	3.8	5.4	1.6	436	Promedio	3.95	5.3	1.65	4506	
	Des estándar	0.23	0.52	0.2	175.32	Des estándar	0.26	0.48	0.11	651.84	
2	1	4.5	20	1.65	500	1	4.4	20	1.71	3800	
	2	4.5	14	1.54	420	2	4.3	13	1.7	4560	
	3	3.6	18	1.68	500	3	3.9	14	1.6	4100	
	4	3.7	15	1.58	700	4	3.9	15	1.59	4980	
	5	3.8	16	1.72	700	5	4	16	1.66	6600	
	6	3.6	15	1.77	450	6	3.5	16	1.73	4020	
	7	3.6	16	1.6	420	7	3.7	15	1.59	4900	
	8	3.7	18	1.71	480	8	3.7	20	1.59	3100	
	9	3.9	19	1.62	420	9	4.1	13	1.87	5000	
	10	3.9	20	1.51	620	10	3.8	14	1.62	4800	
	Máx.	4.5	20	1.77	700	Máx.	4.4	20	1.87	6600	
	Min.	3.6	14	1.51	420	Min.	3.5	13	1.59	3100	
	Promedio	3.88	17.1	1.64	521	Promedio	3.93	15.6	1.67	4586	
	Des estándar	0.35	2.18	0.08	111.6	Des estándar	0.28	2.55	0.09	937.52	
3	1	4.1	5	1.65	400	1	4.5	5	1.71	3800	
	2	4.1	6	1.54	420	2	4.5	6	1.48	4560	
	3	3.4	6	1.68	300	3	3.9	5	1.44	4100	
	4	3.7	6	1.58	970	4	3.9	5	1.32	4980	
	5	3.8	6	1.72	880	5	4	6	1.66	5300	
	6	3.6	6	1.77	400	6	3.6	5	1.73	4020	
	7	3.6	4	1.6	320	7	3.7	4	1.57	4900	
	8	3.7	5	1.71	480	8	3.7	5	1.36	3400	
	9	3.9	5	1.62	300	9	4.1	5	1.78	5000	
	10	3.9	5	1.45	620	10	3.8	6	1.62	4800	
	Máx.	4.1	6	1.77	970	Máx.	4.5	6	1.78	5300	
	Min.	3.4	4	1.45	300	Min.	3.6	4	1.32	3400	
	Promedio	3.78	5.4	1.63	509	Promedio	3.97	5.2	1.57	4486	
	Des estándar	0.23	0.7	0.09	239.93	Des estándar	0.32	0.63	0.16	620.25	

La Tabla no. 21 engloba las características organolépticas. La marca no.1 expreso un perfil de sabor y olor de ligeramente acido a acido, además de una textura de

aceptable a ligeramente grumoso de tipos de yogurt de beber y cuchareables respectivamente. La marca no. 2 el perfil de olor y sabor fue ligeramente ácido y textura suave ambos productos. La marca no. 3 define un producto ligeramente ácido y aceptable para la versión de beber; y de suave a ligeramente grumoso para el cuchareable.

Tabla no. 21 Análisis organoléptico de los yogurts en sus versiones cuchareable y de beber

Yogurt de beber		Parámetros				Yogurt cuchareable		Parámetros		
Marca	No. de muestra	Color	Sabor	Olor	Textura	No. de muestra	Color	Sabor	Olor	Textura
1	1	rosa	XX	X	1	1	Rosa	X	X	2
	2	rosa	XX	XX	1	2	Rosa	X	X	2
	3	rosa	XX	XX	1	3	Rosa	X	X	2
	4	rosa	XX	XX	1	4	Rosa	X	X	2
	5	rosa	XX	X	1	5	Rosa	X	X	2
	6	rosa	X	XX	1	6	Rosa	X	X	2
	7	rosa	XX	XX	1	7	Rosa	X	X	3
	8	rosa	XX	XX	1	8	Rosa	X	X	2
	9	rosa	XX	XX	1	9	Rosa	X	X	2
	10	rosa	X	XX	1	10	Rosa	X	X	2
2	1	rosa	XXX	XXX	1	1	rosa	XX	XX	2
	2	rosa	XXX	XXX	1	2	rosa	XX	XX	2
	3	rosa	XXX	XXX	1	3	rosa	XX	X	2
	4	rosa	XX	XX	1	4	rosa	XX	XX	2
	5	rosa	XXX	XXX	1	5	rosa	XX	XX	2
	6	rosa	XXX	XXX	1	6	rosa	XX	XX	2
	7	rosa	XXX	XXX	1	7	rosa	X	XX	2
	8	rosa	XX	XX	1	8	rosa	XX	XX	2
	9	rosa	XXX	XXX	1	9	rosa	XX	XX	2
	10	rosa	XXX	XXX	1	10	rosa	XX	XX	2
3	1	rosa	XX	X	1	1	rosa	XX	XX	1
	2	rosa	XX	XX	1	2	rosa	XX	XX	1
	3	rosa	XX	XX	1	3	rosa	XX	X	1
	4	rosa	XX	XX	1	4	rosa	XX	XX	1
	5	rosa	XX	X	1	5	rosa	XX	XX	1
	6	rosa	X	XX	1	6	rosa	XX	XX	1
	7	rosa	XX	XX	1	7	rosa	X	XX	1
	8	rosa	XX	XX	1	8	rosa	XX	XX	1
	9	rosa	XX	XX	1	9	rosa	XX	XX	1
	10	rosa	X	XX	1	10	rosa	XX	XX	1

Olor /sabor: X- suave; XX- ligeramente ácido; XXX- ácido; XXX- muy ácido.  
 Textura: 1- aceptable; 2- ligeramente grumoso; 3- grumosa; 4- muy grumosa

Es importante mencionar que el perfil organoléptico es subjetivo, además de no existir una normatividad específica, pero se encuentra dentro de los parámetros aceptables.

Las Tablas No. 22 y 23, presentan la información obtenida de manera global, comparando los datos obtenidos con los valores permitidos por la norma 185, en los casos que la misma estipula.

Tabla no. 22 Características Físicoquímicas, Microbiológicas y Organolépticas del yogurt de beber expendido en la ciudad Ocotlán.

Parámetro	1	2	3	NOM-185-SSA1-2000
Temperatura (°C)	5.0° - 6.0°	°14 -20°	4.0° - 6.0°	max 7°C
pH	3.50 -4.20	3.60 - 4.50	3.40 - 4.10	max 4.4
Acidez (%)	1.25 - 1.99	1.51 - 1.77	1.45 - 1.77	>0.5%
Viscosidad (cps)	280 - 840	420 - 700	300 - 970	NE*
Organismos Coliformes	0 UFC/g (directa)	0 UFC/g (directa)	0 UFC/g (directa)	10 UFC/g
<i>Salmonella</i>	Ausente/25 g	Ausente/25 g	Ausente/25 g	Ausente/25 g
<i>Staphylococcus aureus</i>	0 UFC/ml (directa)	0 UFC/ml (directa)	0 UFC/ml (directa)	<100 UFC/g
Color	Rosa	Rosa	Rosa	NE
Olor	XX	XXX	XX	NE
Sabor	XX	XXX	XX	NE
Textura	1	1	1	NE

NE\*: no especificado

Olor /sabor: X- suave; XX- ligeramente ácido; XXX- ácido; XXX- muy ácido

Textura: 1- aceptable; 2- ligeramente grumoso; 3- grumosa; 4- muy grumosa

Tabla no. 23 Características Físicoquímicas, Microbiológicas y Organolépticas del yogurt batido expendido en la ciudad Ocotlán.

Parámetro	1	2	3	NOM-185-SSA1-2000
Temperatura	5.0° - 6.0°	13° - 20°	4.0° - 6.0°	max 7°C
pH	3.7 - 4.4	3.5 - 4.4	3.6 - 4.5	max. 4.4
Acidez (%)	1.54 - 1.91	1.59 - 1.87	1.32 - 1.78	>0.5%
Viscosidad (cps)	3400 - 5500	3100 - 6060	3400 - 5300	NE
Organismos Coliformes	0 UFC/g (directa)	0 UFC/g (directa)	0 UFC/g (directa)	10 UFC/g
<i>Salmonella</i>	Ausente/25 g	Ausente/25 g	Ausente/25 g	Ausente /25 g
<i>Staphylococcus aureus</i>	0 UFC/ml (directa)	0 UFC/ml (directa)	0 UFC/ml (directa)	<100 UFC/g
Color	Rosa	Rosa	Rosa	NE
Olor	X	XX	XX	NE
Sabor	X	XX	XX	NE
Textura	2	2	1	NE

**Valoración de las Leches fermentadas.** En este segundo estudio experimental, se examinaron los parámetros de la NOM-185-SSA1-2002 y los microorganismos fermentadores presentes de conformidad con el CODEX STAN 243-2003 y NOM-181-SCFI-2010. Los resultados de las 60 muestras analizadas, correspondientes a las 4 marcas de leche fermentada más vendidas, se presentan en tablas por el

tipo de análisis realizados, los fisicoquímicos de temperatura en grados centígrados (°C), pH y acidez en por ciento (%); los microbiológicos de bacterias ácido lácticas, coliformes y Staphylococcus aureus en unidades formadoras de colonia por gramo (UFC/g), y Salmonella en ausencia o presencia en 25 gramos; y los organolépticos de color, sabor, olor y textura

Los resultados fisicoquímicos obtenidos de las leches fermentadas se muestran en la Tabla no. 24. La marca no. 1, tuvo valores de temperatura de 2°C a 14°C, siendo la marca no. 2 la de los datos más altos, los promedios fueron 6.4°C, 9.53°C, 6.20°C y 9.23°C respectivamente, demostrando mal manejo de conservación del producto. En la acidez el rango fue de 0.58% al 1.0%, con promedios de 0.75%, 0.965%, 0.673 y 0.62, siendo valores que definen un perfil de baja a mediana acidez. Los resultados de pH fueron de 3.67 a 4.42, con promedios de 4.17, 3.75, 3.95 y 4.10 expresando números altos comparados con la acidez. Las cuentas de bacterias ácido lácticas fueron de  $4.18 \times 10^7$  a  $2.94 \times 10^4$ , teniendo una recuperación similar en el medio MRS y en el medio APT.

Tabla no. 24 Parámetros fisicoquímicos y bacterias ácido lácticas evaluados de las leches fermentadas expandida en la ciudad de Ocotlán, Jalisco

no.	T°	pH	Marca 1			Marca 2					
			acidez g/l	APT	MRS	no.	T°	pH	acidez g/l	APT	MRS
1	2	4.14	0.79	1.31E+07	1.74E+07	1	10	3.69	0.94	3.00E+06	9.00E+04
2	4	4.12	0.82	1.25E+07	1.38E+07	2	9.5	3.7	0.95	2.31E+06	2.35E+06
3	6	4.16	0.79	1.20E+07	1.90E+07	3	7	3.69	0.97	4.60E+05	1.02E+06
4	6	4.3	0.65	5.60E+05	1.00E+07	4	14	3.8	0.95	1.00E+06	1.00E+07
5	8	4.1	0.85	2.44E+07	2.60E+06	5	8.5	3.7	0.96	1.00E+05	2.00E+05
6	8	4.03	0.6	2.82E+07	3.68E+07	6	9	4.02	1.0	2.99E+04	4.50E+06
7	9	4.29	0.77	8.40E+06	1.38E+07	7	9	3.73	0.98	1.40E+06	1.19E+07
8	10	4.25	0.78	1.56E+07	1.69E+07	8	9	3.67	0.97	2.10E+05	5.90E+05
9	2	4.1	0.79	1.21E+07	1.84E+07	9	10	3.7	0.94	3.00E+06	1.00E+05
10	4	4.3	0.77	1.25E+07	2.73E+06	10	9.5	3.7	0.95	2.31E+06	2.75E+06
11	8	4.16	0.79	1.80E+07	2.30E+07	11	8.5	3.71	0.99	1.46E+06	1.02E+06
12	6	4.12	0.65	1.57E+07	1.20E+07	12	9	3.8	0.94	1.00E+06	1.00E+07
13	9	4.14	0.6	2.49E+07	2.85E+06	13	9	3.71	0.96	9.00E+05	2.10E+05
14	6	4.03	0.85	2.82E+07	4.18E+07	14	7	3.9	1.0	9.30E+05	4.90E+06
15	8	4.29	0.82	1.84E+07	1.48E+07	15	14	3.7	0.98	3.00E+06	1.19E+07

Marca 3						Marca 4					
no.	T°	pH	acidez g/l	APT	MRS	no.	T°	pH	acidez g/l	APT	MRS
1	3.5	3.69	0.66	3.60E+06	4.50E+06	1	11	3.64	0.66	7.80E+07	1.64E+08
2	4	3.9	0.64	1.00E+07	1.00E+07	2	6.5	5.73	0.62	2.89E+07	3.07E+07
3	9	3.8	0.65	6.50E+06	3.25E+06	3	8	3.75	0.62	4.20E+06	5.00E+07
4	4	4.42	0.913	3.60E+07	1.00E+07	4	11	3.79	0.63	1.00E+07	1.00E+07
5	4	3.8	0.64	1.00E+07	1.00E+07	5	10	3.7	0.64	1.56E+07	2.42E+07
6	9	4.22	0.6	7.90E+06	1.87E+06	6	4	4.52	0.64	1.31E+07	1.31E+07
7	9	3.85	0.63	6.10E+06	1.62E+06	7	10	3.75	0.58	2.41E+08	2.10E+08
8	8	3.93	0.63	2.74E+07	2.26E+06	8	10	3.65	0.61	2.90E+07	1.90E+07
9	3.5	3.69	0.66	4.20E+06	4.50E+06	9	11	3.64	0.61	7.80E+07	1.60E+08
10	4	3.7	0.65	1.00E+07	7.00E+06	10	8	5.73	0.63	3.89E+07	3.07E+07
11	8	4.1	0.64	7.00E+06	3.25E+06	11	9	3.74	0.6	4.20E+06	1.00E+07
12	6	4.42	0.913	3.00E+07	8.20E+06	12	10	3.8	0.63	1.10E+07	1.12E+07
13	5	3.7	0.61	1.00E+07	9.00E+06	13	11	3.77	0.63	1.56E+07	2.42E+07
14	9	4.32	0.6	8.30E+06	4.87E+06	14	8	4.5	0.64	2.81E+07	1.93E+07
15	7	3.75	0.66	6.00E+06	1.62E+06	15	11	3.8	0.62	2.26E+08	2.05E+08

UFC/g: unidades formadoras de colonias por gramo

Los datos obtenidos en los recuento microbiano respecto del perfil sanitario, denotan productos de calidad ya que todos los resultados fueron negativo (ver Tabla no. 25)

Tabla no. 25 Parámetros microbiológicos evaluados de las leches fermentadas expandida en la ciudad de Ocotlán, Jalisco

Marca 1				Marca 2			
no.	Coliformes	<i>S. aureus</i>	<i>Salmonella</i>	no.	Coliformes	<i>S. aureus</i>	<i>Salmonella</i>
1	0 UFC/g*	0 UFC/g*	Ausente/25g	1	0 UFC/g*	0 UFC/g*	Ausente/25g
2	0 UFC/g*	0 UFC/g*	Ausente/25g	2	0 UFC/g*	0 UFC/g*	Ausente/25g
3	0 UFC/g*	0 UFC/g*	Ausente/25g	3	0 UFC/g*	0 UFC/g*	Ausente/25g
4	0 UFC/g*	0 UFC/g*	Ausente/25g	4	0 UFC/g*	0 UFC/g*	Ausente/25g
5	0 UFC/g*	0 UFC/g*	Ausente/25g	5	0 UFC/g*	0 UFC/g*	Ausente/25g
6	0 UFC/g*	0 UFC/g*	Ausente/25g	6	0 UFC/g*	0 UFC/g*	Ausente/25g
7	0 UFC/g*	0 UFC/g*	Ausente/25g	7	0 UFC/g*	0 UFC/g*	Ausente/25g
8	0 UFC/g*	0 UFC/g*	Ausente/25g	8	0 UFC/g*	0 UFC/g*	Ausente/25g
9	0 UFC/g*	0 UFC/g*	Ausente/25g	9	0 UFC/g*	0 UFC/g*	Ausente/25g
10	0 UFC/g*	0 UFC/g*	Ausente/25g	10	0 UFC/g*	0 UFC/g*	Ausente/25g
11	0 UFC/g*	0 UFC/g*	Ausente/25g	11	0 UFC/g*	0 UFC/g*	Ausente/25g
12	0 UFC/g*	0 UFC/g*	Ausente/25g	12	0 UFC/g*	0 UFC/g*	Ausente/25g
13	0 UFC/g*	0 UFC/g*	Ausente/25g	13	0 UFC/g*	0 UFC/g*	Ausente/25g
14	0 UFC/g*	0 UFC/g*	Ausente/25g	14	0 UFC/g*	0 UFC/g*	Ausente/25g
15	0 UFC/g*	0 UFC/g*	Ausente/25g	15	0 UFC/g*	0 UFC/g*	Ausente/25g

Marca 3				Marca 4			
no.	Coliformes	<i>S. aureus</i>	<i>Salmonella</i>	no.	Coliformes	<i>S. aureus</i>	<i>Salmonella</i>
1	0 UFC/g*	0 UFC/g*	Ausente/25g	1	0 UFC/g*	0 UFC/g*	Ausente/25g
2	0 UFC/g*	0 UFC/g*	Ausente/25g	2	0 UFC/g*	0 UFC/g*	Ausente/25g
3	0 UFC/g*	0 UFC/g*	Ausente/25g	3	0 UFC/g*	0 UFC/g*	Ausente/25g
4	0 UFC/g*	0 UFC/g*	Ausente/25g	4	0 UFC/g*	0 UFC/g*	Ausente/25g
5	0 UFC/g*	0 UFC/g*	Ausente/25g	5	0 UFC/g*	0 UFC/g*	Ausente/25g
6	0 UFC/g*	0 UFC/g*	Ausente/25g	6	0 UFC/g*	0 UFC/g*	Ausente/25g
7	0 UFC/g*	0 UFC/g*	Ausente/25g	7	0 UFC/g*	0 UFC/g*	Ausente/25g
8	0 UFC/g*	0 UFC/g*	Ausente/25g	8	0 UFC/g*	0 UFC/g*	Ausente/25g
9	0 UFC/g*	0 UFC/g*	Ausente/25g	9	0 UFC/g*	0 UFC/g*	Ausente/25g
10	0 UFC/g*	0 UFC/g*	Ausente/25g	10	0 UFC/g*	0 UFC/g*	Ausente/25g
11	0 UFC/g*	0 UFC/g*	Ausente/25g	11	0 UFC/g*	0 UFC/g*	Ausente/25g
12	0 UFC/g*	0 UFC/g*	Ausente/25g	12	0 UFC/g*	0 UFC/g*	Ausente/25g
13	0 UFC/g*	0 UFC/g*	Ausente/25g	13	0 UFC/g*	0 UFC/g*	Ausente/25g
14	0 UFC/g*	0 UFC/g*	Ausente/25g	14	0 UFC/g*	0 UFC/g*	Ausente/25g
15	0 UFC/g*	0 UFC/g*	Ausente/25g	15	0 UFC/g*	0 UFC/g*	Ausente/25g

\*UFC/g: unidades formadoras de colonias por gramo

Los rasgos organolépticos se presentan en la Tabla no. 26, teniendo como características un sabor y olor de suave a ligeramente ácido y una textura aceptable.

Tabla no. 26 Parámetros organolépticos evaluados de las leches fermentadas expandida en la ciudad de Ocotlán, Jalisco

Marca 1					Marca 2				
no.	Color	sabor	sabor	textura	no.	Color	sabor	sabor	textura
1	b**	X	X	1	1	b**	X	X	1
2	b**	X	X	1	2	b**	X	X	1
3	b**	X	X	1	3	b**	XX	XX	1
4	b**	X	X	1	4	b**	X	X	1
5	b**	X	X	1	5	b**	X	X	1
6	b**	X	X	1	6	b**	X	X	1
7	b**	XX	XX	1	7	b**	X	X	1
8	b**	X	X	1	8	b**	X	X	1
9	b**	X	X	1	9	b**	X	X	1
10	b**	X	X	1	10	b**	X	X	1
11	b**	XX	XX	1	11	b**	X	X	1
12	b**	X	X	1	12	b**	X	X	1
13	b**	X	X	1	13	b**	X	X	1
14	b**	X	X	1	14	b**	XX	XX	1
15	b**	X	X	1	15	b**	XX	XX	1

Marca 3					Marca 4				
no.	Color	Sabor	sabor	textura	no.	Color	Sabor	sabor	textura
1	b**	XX	XX	1	1	b**	X	X	1
2	b**	X	X	1	2	b**	X	X	1
3	b**	X	X	1	3	b**	X	X	1
4	b**	X	X	1	4	b**	X	X	1
5	b**	X	X	1	5	b**	X	X	1
6	b**	X	X	1	6	b**	X	X	1
7	b**	XX	XX	1	7	b**	XX	XX	1
8	b**	X	X	1	8	b**	X	X	1
9	b**	X	X	1	9	b**	X	X	1
10	b**	X	X	1	10	b**	X	X	1
11	b**	X	X	1	11	b**	X	X	1
12	b**	X	X	1	12	b**	X	X	1
13	b**	X	X	1	13	b**	X	X	1
14	b**	X	X	1	14	b**	X	X	1
15	b**	X	X	1	15	b**	X	X	1

b\*\*: blanquesino. Olor /sabor: X- suave; XX- ligeramente ácido; XXX- ácido; XXX- muy ácido.

Textura: 1- aceptable; 2- ligeramente grumoso; 3- grumosa; 4- muy grumosa

Los datos procesados e integrados de las leches fermentadas se presentan en las tablas no. 27, 28 y 29 anexando a la tabla los valores establecidos por la norma 185 para el perfil fisicoquímico y sanitario. En el caso de las bacterias ácido láctica los valores mínimos que define la norma 243 del Codex.

Tabla no. 27 Parámetros fisicoquímicos y microbianos evaluados de los productos lácteos fermentados expendidos en la ciudad de Ocotlán, Jalisco.

Marca	Parámetro	°T °C	Acidez %	pH	BAL(APT)	BAL(MRS)
1	Promedio	6.40	0.755	4.17	1.63E+07	1.64E+07
	Desv. Est.	2.50	0.086	0.09	7.64E+06	1.12E+06
	Máximo	10	0.85	4.1	2.82E+07	4.18E+07
	Mínimo	2	0.60	4.29	5.60E+05	2.60E+06
2	Promedio	9.53	0.965	3.75	1.41E+06	4.10E+06
	Desv. Est.	2.01	0.021	0.10	1.07E+06	4.56E+06
	Máximo	14	1.0	4.02	3.00E+06	1.19E+07
	Mínimo	7	0.94	3.67	2.99E+04	9.00E+04
3	Promedio	6.20	0.673	3.95	1.22E+07	5.46E+06
	Desv. Est.	2.30	0.099	0.24	1.17E+07	3.26E+06
	Máximo	9	0.913	4.4	3.60E+07	1.00E+07
	Mínimo	3.5	0.60	3.7	3.60E+06	1.62E+06
4	Promedio	9.23	0.620	4.10	5.48E+07	6.54E+07
	Desv. Est.	2.03	0.017	0.72	7.62E+07	7.61E+07
	Máximo	11	0.64	5.73	2.41E+08	2.10E+08
	Mínimo	4	0.58	3.64	4.20E+06	1.00E+07
NOM-185-SSA1-2000		max7°C	>0.5%	max4.4	NE	NE
CODEX STAN 243-2003			>0.6%		>10 <sup>7</sup> ufc/g	

NE\*: no especificado

Tabla no. 28 Parámetros sanitarios evaluados de los productos lácteos fermentados expendidos en la ciudad de Ocotlán, Jalisco.

Marca	Parámetro	Coliformes	S. aureus	Salmonella
1	Promedio	0 ufc/g*	0 ufc/g*	Ausente/25g
	Desv. Est.	0 ufc/g	0 ufc/g	Ausente/25g
	Máximo	0 ufc/g	0 ufc/g	Ausente/25g
	Mínimo	0 ufc/g	0 ufc/g	Ausente/25g
2	Promedio	0 ufc/g	0 ufc/g	Ausente/25g
	Desv. Est.	0 ufc/g	0 ufc/g	Ausente/25g
	Máximo	0 ufc/g	0 ufc/g	Ausente/25g
	Mínimo	0 ufc/g	0 ufc/g	Ausente/25g
3	Promedio	0 ufc/g	0 ufc/g	Ausente/25g
	Desv. Est.	0 ufc/g	0 ufc/g	Ausente/25g
	Máximo	0 ufc/g	0 ufc/g	Ausente/25g
	Mínimo	0 ufc/g	0 ufc/g	Ausente/25g
4	Promedio	0 ufc/g	0 ufc/g	Ausente/25g
	Desv. Est.	0 ufc/g	0 ufc/g	Ausente/25g
	Máximo	0 ufc/g	0 ufc/g	Ausente/25g
	Mínimo	0 ufc/g	0 ufc/g	Ausente/25g
NOM-185-SSA1-2000		10 ufc/g	<100 ufc/g	Ausente/25g

\*0 ufc/g: 0 unidades formadoras de colonias /g (directa)

Tabla no. 29 Parámetros organolépticos evaluados de los productos lácteos fermentados expendidos en la ciudad de Ocotlán, Jalisco.

Marca	Parámetro	Color	sabor	sabor	Textura
1	Promedio	Blanquecino	x	x	1
	Desv. Est.	Blanquecino	x	x	1
	Máximo	Blanquecino	xx	xx	1
	Mínimo	Blanquecino	x	x	1
2	Promedio	Blanquecino	x	x	1
	Desv. Est.	Blanquecino	x	x	1
	Máximo	Blanquecino	xx	xx	1
	Mínimo	Blanquecino	x	x	1
3	Promedio	Blanquecino	x	x	1
	Desv. Est.	Blanquecino	x	x	1
	Máximo	Blanquecino	xx	xx	1
	Mínimo	Blanquecino	x	x	1
4	Promedio	Blanquecino	x	x	1
	Desv. Est.	Blanquecino	x	x	1
	Máximo	Blanquecino	xx	xx	1
	Mínimo	Blanquecino	x	x	1
NOM-185-SSA1-2000		NE	NE	NE	NE

NE\*: no especificado; Olor /sabor: X- suave; XX- ligeramente ácido; XXX- ácido; XXX- muy ácido.  
Textura: 1- aceptable; 2- ligeramente grumoso; 3- grumosa; 4- muy grumosa

**Variabilidad Genética de las BAL.** En este tercer examen experimental, se examinaron la variabilidad genética y el perfil bioquímico de los microorganismos probióticos contenidos en 4 marcas de Leches Fermentadas.

La variabilidad genética se refiere a la variación en el material genético de una población o especie, la variabilidad genética nueva puede estar causada por

mutaciones, recombinaciones y alteraciones en el cariotipo, siendo los procesos que afectan la selección natural y la deriva genética. La variabilidad es la materia prima de la evolución, lo cual es deseable, en microorganismos de uso industrial o médico, cuando esta contrasta y genera un atributo deseable. No obstante, una vez que se tienen los atributos requeridos se debe de mantener la cepa microbiana estable. La variación genética o diversidad ha sido estudiada tradicionalmente por análisis de caracteres morfológicos o bioquímicos. No obstante, estos marcadores no dan una medida confiable de las diferencias genéticas. El análisis del ADN del microorganismo conduce a una evaluación directa de la variación en el genotipo. Los marcadores RAPD son una herramienta útil en este tipo de estudio.

Los resultados de las bacterias ácido lácticas de las 40 muestras analizadas, se presentan de la siguiente manera. En la Tabla no. 30, se presentan los coeficientes de similaridad de Jaccard, donde se observan los coeficientes de cada producto lácteo fermentado, encontrándose para cada marca respectivamente las variaciones de 0.61 a 0.93, de 0.50 a 0.83, de 0.48 a 0.96 y de 0.57 a 0.89 en la similaridad de la muestra número 1 de cada producto en comparación de las 9 muestras restantes, además los índices resultantes comparados entre diferentes productos genera valores menores.

Los coeficientes de similaridad de Jaccard más altos corresponden a cada grupo de bacterias aisladas de los productos de las leches fermentadas respectivamente.

Coeficientes de similaridad calculados por el método Jaccard muestran el grado de similaridad existente entre los genotipos estudiados, se puede observar el grado máximo de similaridad entre las cepas de un mismo producto, como también se puede apreciar la similitud genética de tres de los grupos (*Lactobacillus*) y la diferencia que existe entre éstos y el cuarto grupo (*Bifidobacterias*).

En la Figura no. 7, se muestra el dendograma UPGMA derivado de los coeficientes de similaridad calculados por el método Jaccard. Se observan cuatro grupos bien definidos: grupo 1 conformado por las cepas aisladas del producto Lalacult (L1 a

L10 = *Lactobacillus casei*), grupo 2 conformado por las cepas aisladas del producto Yakult (Y1 a Y10 = *Lactobacillus casei Shirota*), grupo 3 conformado por las cepas aisladas del producto Chamito (C1 a C10 = *Lactobacillus johnsonii*), y grupo 4 conformado por cepas aisladas del producto Activia A (A1 a A10 = Bifidobacterias).

La Tabla no. 31 define el perfil bioquímico de los microorganismos que crecieron en los medios de cultivo MRS, siendo bacilos gram positivos, inmóviles, catalasa negativos, fermentadores de lactosa, glucosa y fructosa. Además de mostrar crecimiento en el medio MRS con sales biliares y también desarrollarse en el MRS después de estar en buffer de citrato a pH 3, 37°C por 5 horas.

Figura no. 7 Dendograma UPGMA derivado de los coeficientes de similitud calculados por el método de Jaccard mostrando la relación entre las cepas de *Lactobacillus* y Bifidobacterias, analizados con RAPDs. L=*Lactobacillus casei*, Y= *Lactobacillus casei* Shirota, C= *Lactobacillus jonhsonii*, A= Bifidobacterias.

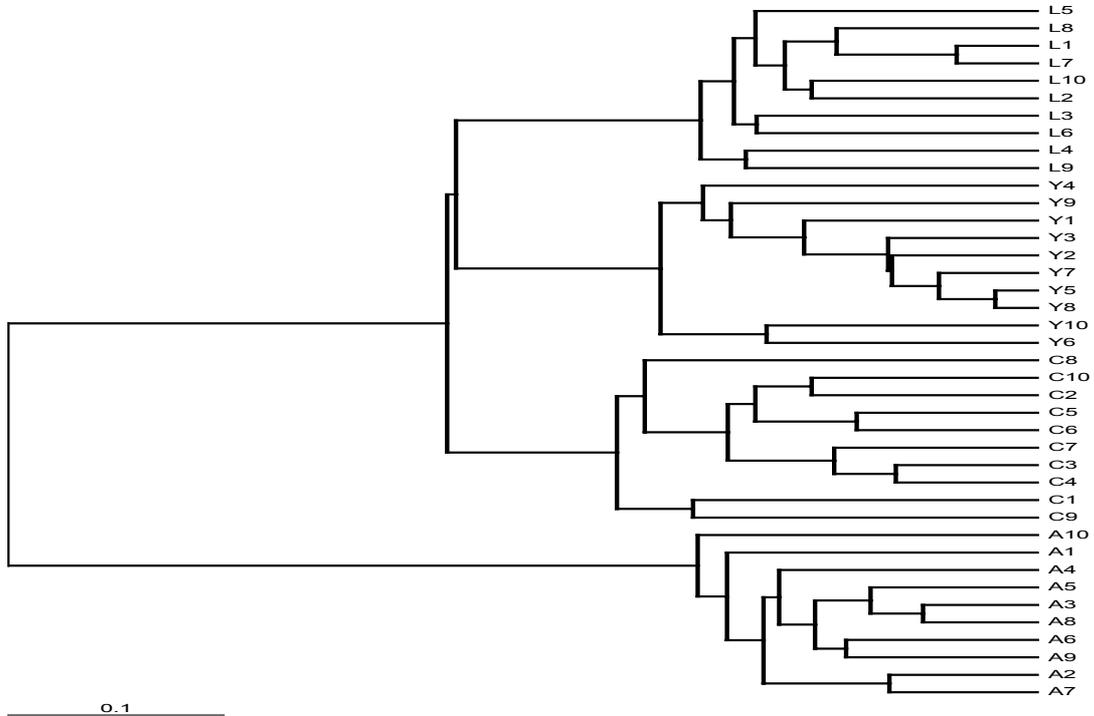


Tabla no. 31 Perfil bioquímico de las bacterias lácticas aisladas de leches fermentadas en la ciudad de Ocotlán, Jalisco

Producto	muestra	Incubación	Microscopia	Caracterización colonial				Bioquímica				Resistencia		
				diámetro	borde	color	elevación	movilidad	catalasa	glucosa	lactosa	fructosa	sales biliares	ácido
1	1	MRS 37°C/72 h anaerobiosis	Bacilos gram +	1-1.2 mm	regular	Blanca	Plana	-	-	+	+	+	±	±
	2	MRS 37°C/72 h anaerobiosis	Bacilos gram +	1-1.2 mm	regular	Blanca	Plana	-	-	+	+	+	±	±
	3	MRS 37°C/72 h anaerobiosis	Bacilos gram +	1-1.2 mm	regular	Blanca	Plana	-	-	+	+	+	±	±
	4	MRS 37°C/72 h anaerobiosis	Bacilos gram +	1-1.2 mm	regular	Blanca	Plana	-	-	+	+	+	±	±
	5	MRS 37°C/72 h anaerobiosis	Bacilos gram +	1-1.2 mm	regular	Blanca	Plana	-	-	+	+	+	±	±
	6	MRS 37°C/72 h anaerobiosis	Bacilos gram +	1-1.2 mm	regular	Blanca	Plana	-	-	+	+	+	±	±
	7	MRS 37°C/72 h anaerobiosis	Bacilos gram +	1-1.2 mm	regular	Blanca	Plana	-	-	+	+	+	±	±
	8	MRS 37°C/72 h anaerobiosis	Bacilos gram +	1-1.2 mm	regular	Blanca	Plana	-	-	+	+	+	±	±
	9	MRS 37°C/72 h anaerobiosis	Bacilos gram +	1-1.2 mm	regular	Blanca	Plana	-	-	+	+	+	±	±
	10	MRS 37°C/72 h anaerobiosis	Bacilos gram +	1-1.2 mm	regular	Blanca	Plana	-	-	+	+	+	±	±
2	1	MRS 37°C/72 h anaerobiosis	Bacilos gram +	1-1.2 mm	regular	Blanca	Plana	-	-	+	+	+	±	±
	2	MRS 37°C/72 h anaerobiosis	Bacilos gram +	1-1.2 mm	regular	Blanca	Plana	-	-	+	+	+	±	±
	3	MRS 37°C/72 h anaerobiosis	Bacilos gram +	1-1.2 mm	regular	Blanca	Plana	-	-	+	+	+	±	±
	4	MRS 37°C/72 h anaerobiosis	Bacilos gram +	1-1.2 mm	regular	Blanca	Plana	-	-	+	+	+	±	±
	5	MRS 37°C/72 h anaerobiosis	Bacilos gram +	1-1.2 mm	regular	Blanca	Plana	-	-	+	+	+	±	±
	6	MRS 37°C/72 h anaerobiosis	Bacilos gram +	1-1.2 mm	regular	Blanca	Plana	-	-	+	+	+	±	±
	7	MRS 37°C/72 h anaerobiosis	Bacilos gram +	1-1.2 mm	regular	Blanca	Plana	-	-	+	+	+	±	±
	8	MRS 37°C/72 h anaerobiosis	Bacilos gram +	1-1.2 mm	regular	Blanca	Plana	-	-	+	+	+	±	±
	9	MRS 37°C/72 h anaerobiosis	Bacilos gram +	1-1.2 mm	regular	Blanca	Plana	-	-	+	+	+	±	±
	10	MRS 37°C/72 h anaerobiosis	Bacilos gram +	1-1.2 mm	regular	Blanca	Plana	-	-	+	+	+	±	±
3	1	MRS 37°C/72 h anaerobiosis	Bacilos gram +	1 mm	regular	Blanca	Plana	-	-	+	+	+	±	±
	2	MRS 37°C/72 h anaerobiosis	Bacilos gram +	1 mm	regular	Blanca	Plana	-	-	+	+	+	±	±
	3	MRS 37°C/72 h anaerobiosis	Bacilos gram +	1 mm	regular	Blanca	Plana	-	-	+	+	+	±	±
	4	MRS 37°C/72 h anaerobiosis	Bacilos gram +	1 mm	regular	Blanca	Plana	-	-	+	+	+	±	±
	5	MRS 37°C/72 h anaerobiosis	Bacilos gram +	1 mm	regular	Blanca	Plana	-	-	+	+	+	±	±
	6	MRS 37°C/72 h anaerobiosis	Bacilos gram +	1 mm	regular	Blanca	Plana	-	-	+	+	+	±	±
	7	MRS 37°C/72 h anaerobiosis	Bacilos gram +	1 mm	regular	Blanca	Plana	-	-	+	+	+	±	±
	8	MRS 37°C/72 h anaerobiosis	Bacilos gram +	1 mm	regular	Blanca	Plana	-	-	+	+	+	±	±
	9	MRS 37°C/72 h anaerobiosis	Bacilos gram +	1 mm	regular	Blanca	Plana	-	-	+	+	+	±	±
	10	MRS 37°C/72 h anaerobiosis	Bacilos gram +	1 mm	regular	Blanca	Plana	-	-	+	+	+	±	±
4	1	MRS 37°C/72 h anaerobiosis	Bacilos gram +	0.9-1.2mm	regular	Blanca	Plana	-	-	+	+	+	±	±
	2	MRS 37°C/72 h anaerobiosis	Bacilos gram +	0.9-1.2mm	regular	Blanca	Plana	-	-	+	+	+	±	±
	3	MRS 37°C/72 h anaerobiosis	Bacilos gram +	0.9-1.2mm	regular	Blanca	Plana	-	-	+	+	+	±	±
	4	MRS 37°C/72 h anaerobiosis	Bacilos gram +	0.9-1.2mm	regular	Blanca	Plana	-	-	+	+	+	±	±
	5	MRS 37°C/72 h anaerobiosis	Bacilos gram +	0.9-1.2mm	regular	Blanca	Plana	-	-	+	+	+	±	±
	6	MRS 37°C/72 h anaerobiosis	Bacilos gram +	0.9-1.2mm	regular	Blanca	Plana	-	-	+	+	+	±	±
	7	MRS 37°C/72 h anaerobiosis	Bacilos gram +	0.9-1.2mm	regular	Blanca	Plana	-	-	+	+	+	±	±
	8	MRS 37°C/72 h anaerobiosis	Bacilos gram +	0.9-1.2mm	regular	Blanca	Plana	-	-	+	+	+	±	±
	9	MRS 37°C/72 h anaerobiosis	Bacilos gram +	0.9-1.2mm	regular	Blanca	Plana	-	-	+	+	+	±	±
	10	MRS 37°C/72 h anaerobiosis	Bacilos gram +	0.9-1.2mm	regular	Blanca	Plana	-	-	+	+	+	±	±

**Estudio de percepción de los productos lácteos fermentados.** Por último, se elaboro un estudio de percepción que se tiene de las leches fermentadas y los microorganismos probióticos, a la miembro de una comunidad de una institución educativa de nivel bachillerato. Los datos detallados de la información obtenida de la encuesta aplicada están presentados a continuación.

La tabla no. 32 no da la información general del grupo encuestado; siendo más del 83% de edades entre 14 a 19 años y estudiantes de bachillerato, la parte restante son académicos y solo el 1.82% empleados.

Tabla no. 32 Rangos de edad, ocupación y grado académico de los encuestados sobre preferencias de productos lácteos fermentados

Rango de edad	No.	%	Profesión	No.	%	Grado académico	No.	%
15- 19 años	92	83,64	Estudiante	66	60,00	Bachillerato	90	81,82
20-24 años	4	3,64	Trabaja	0	0,00	Bachillerato técnico	4	3,64
25-29 años	0	0,00	Estudia y trabaja	22	20,00	Licenciatura	6	5,45
30-34 años	2	1,82	Estudia y ama de casa	4	3,64	Maestría	8	7,27
35-39 años	4	3,64	Empleado	2	1,82	Doctorado	2	1,82
40-44 años	0	0,00	Académico/ docente	16	14,55			
45-49 años	2	1,82						
50-54 años	4	3,64						
55-59 años	2	1,82						
<b>Total</b>	<b>110</b>	<b>100,00</b>	<b>Total</b>	<b>110</b>	<b>100,00</b>	<b>Total</b>	<b>110</b>	<b>100,00</b>

Respecto del consumo de productos lácteos 108 de los encuestados afirmaron consumirlos siendo estos, leche, queso, yogurt y crema. Respecto del consumo de productos lácteos fermentados solo 94 de los encuestados consintieron comerlos, siendo el yogurt el de mayor preferencia. A la vez la cantidad consumida fue de 80 ml (botecito) a 1 litro. La marca demandada en orden de predilección son Danone, Yakult, Sello Rojo, Lala y Yoplait (ver Tabla no. 33). Los resultados globales no concuerdan con el número de encuestados, que contestaron afirmativamente, porque algunos respondieron con más de una respuesta.

Tabla no. 33 Variedad, marca y cantidad de productos lácteos y fermentados consumidos por los encuestados sobre preferencias de productos lácteos fermentados

Producto lácteo	No.	%	Lácteo fermentado	No.	%	Cantidad	No.	%
Leche	98	24,75	Yogurt	46	41,07	1 litro	12	12,77
Yoghurt	90	22,73	Líquido	16	14,29	1 vaso (500 ml)	10	10,64
Queso	94	23,74	Queso	8	7,14	250 ml	14	14,89
Crema	62	15,66	Leche	4	3,57	1 botecito yakult	10	10,64
Panela	12	3,03	Panela	4	3,57	1 queso	6	6,38
Requesón	12	3,03	Danonino	4	3,57	½ LT	6	6,38
Leche búlgara	2	0,51	Dan up	2	1,79	(250 ml)	4	4,26
Otros	18	4,55	Jocoque	4	3,57	500 gr	4	4,26
Varios <sup>1</sup>	8	2,02	Sólido	2	1,79	1 tasa	4	4,26
<b>Total</b>	<b>396</b>	<b>100,00</b>	bebida tipo yakult	2	1,79	1 Botella	4	4,26
<b>Marca</b>	<b>No.</b>	<b>%</b>	Natilla	2	1,79	½ Panela	4	4,26
Danone	26	20,63	Gelatina	2	1,79	Danonino	4	4,26
Sello rojo	18	14,29	Soful	2	1,79	350 ml	2	2,13
Yakult	22	17,46	Crema	2	1,79	50 ml por día	2	2,13

Lala	16	12,70	Bebida	2	1,79	50 ml X semana	2	2,13
Yoplait	12	9,52	Jericalla	2	1,79	1 porción	3	3,19
Todas	10	7,94	Nata	2	1,79	½ tasa	3	3,19
De la que sea	8	6,35	Tequila	2	1,79			
Nestlé	4	3,17	P/quitar estreñimiento	2	1,79			
Danonino	6	4,76						
Varias	2	1,59						
Sin marca	2	1,59						
<b>Total</b>	<b>126</b>	<b>100,00</b>	<b>Total</b>	<b>110</b>	<b>100,00</b>	<b>Total</b>	<b>94</b>	<b>87,23</b>

La Tabla no. 34 refleja el gusto como la principal causa de consumo, seguida por el antojo, comiéndolos con un frecuencia de diaria a una semana.

Tabla no. 34 Causa y frecuencia de consumo de productos lácteos fermentados consumidos por los encuestados sobre preferencias de productos lácteos fermentados

Causa de consumo	No.	%	Frecuencia	No.	%
Gusto	56	59,57	Diario	34	36,17
Antojo	8	8,51	Cada semana	12	12,77
Sabe bueno/rico	6	6,38	Cuando se me antoja	12	12,77
Porque me da hambre	3	3,19	1 a 2 veces por semana	9	9,57
Por nutritivo	3	3,19	De vez en cuando	3	3,19
Como suplemento alimenticio	3	3,19	Cuando se presenta la ocasión	2	2,13
Porque me agrada	1	1,06	Cuando no desayuno	2	2,13
Recomendación del doctor	1	1,06	Varias veces al día	2	2,13
Alimentación	1	1,06	Cuando tenga ganas	2	2,13
Porque me quita el estreñimiento	1	1,06	A veces	2	2,13
Por necesidad	2	2,13	Regularmente	2	2,13
Por salud	3	3,19	Casi siempre	2	2,13
Porque es bueno y saludable	2	2,13	Casi nunca	2	2,13
Regularizar el intestino	2	2,13	Cada tercer día	2	2,13
Como parte de una dieta balanceada	2	2,13	Ocasionalmente	2	2,13
			2 a 3 veces por semana	2	2,13
			1 a 2 veces al mes	2	2,13
<b>Total</b>	<b>94</b>	<b>100,00</b>	<b>Total</b>	<b>94</b>	<b>100,00</b>

La Tabla no. 35 informa sobre el conocimiento que tienen las personas interrogados en relación a ¿que son y para qué sirven los microorganismos probióticos? 86 encuestados expresaron que son microorganismos o bacterias buenas para el organismos, así como, su utilidad para la flora intestinal y protegernos de enfermedades, lo cual denota un entendimiento adecuado y similar a la publicidad por diversos medios que realizan las empresas que venden los productos.

Tabla no. 35 Percepción de ¿que son y para qué sirven los probióticos? por los encuestados sobre preferencias de productos lácteos fermentados

Que son los probióticos	No.	%	Para qué sirven los probióticos	No.	%
Microorganismos o bacterias	13	15,12	Para la flora intestinal	11	12,79
Bacterias buenas para el organismo	11	12,79	Protegenos de enfermedades	9	10,47
Microorganismos que ayudan a regular el organismo (Activia)	7	8,14	Ayudan al organismo	6	6,98
Gusanitos	5	5,81	No se	6	6,98
Lactobacilos	5	5,81	Para el problema intestinal	4	4,65
Microorganismos que llegan a la flora intestinal	5	5,81	Para regular(la buena) la digestión	4	4,65
Bacterias en los lácteos	4	4,65	Ayudan /restauran al sistema digestivo	4	4,65
No se	4	4,65	P/regular el organismo (escuche en un anuncio)	4	4,65
Microorganismos que vienen en el yakult	2	2,33	Para limpiar el estomago y la flora	4	4,65
Componentes del yakult	2	2,33	Asimilación de comida	4	4,65
Bacterias o microorganismos que ayudan en la flora intestinal	4	4,65	Para proteger nuestro estomago	4	4,65
Yogurt con probióticos actiregularis	2	2,33	Para eliminar bacterias	2	2,33
Microorganismos que llegan vivos al estomago	2	2,33	Ayuda a combatir enfermedades estomacales/intestinales	2	2,33
Bacterias que ayudan al cuerpo	2	2,33	Para el buen funcionamiento intestinal	2	2,33
Sustancias que ayudan al organismo	2	2,33	Ayudan a los órganos involucrados con la alimentación y/o digestión	2	2,33
No estoy seguro	2	2,33	Ayudan en alguna función al estomago	2	2,33
Microorganismos que están en la flora intestinal	2	2,33	Organismo más sano	2	2,33
Vitamina según la tele	2	2,33	Evita el estreñimiento	2	2,33
Microorganismos saludables / buenos para la salud	2	2,33	Ayuda a fortalecer las defensas	2	2,33
Organismos que ayudan al funcionamiento gastrointestinal	2	2,33	Para tener huesos fuertes	2	2,33
Microorganismos benéficos para el intestino	2	2,33	Para un poco mas de rendimiento	2	2,33
Buena digestión	2	2,33	Beneficios en la flora intestinal	2	2,33
Para el funcionamiento gastrointestinal	2	2,33	Para regularizar las bacterias del intestino	2	2,33
			Desconozco	2	2,33
Total	86	100	Total	86	100

Respectos de la dieta alimentaria los resultados se presentan en la Tabla no. 36, comentando que se alimentan 3 veces al día cerca de la mitad del universo valorado y consumiendo carne, frijoles y verduras la mayoría de ellos.

Tabla no.36 Frecuencia y tipo de alimentos que consumen al día de los encuestados sobre preferencias de productos lácteos fermentados

Frecuencias de comidas al día	No.	%	Tipo de alimento en las comidas del día	No.	%
2 veces	8	7,27	Carne	72	18,75
2 y 3 veces	15	13,64	Frijoles	38	9,90
3 veces	53	48,18	Verduras	34	8,85
3 y 4 veces	9	8,18	Frutas	26	6,77
3 y 5 veces	4	3,64	Leche	26	6,77
4 veces	9	8,18	Pan	18	4,69
4 y 5 veces	4	3,64	Huevo	16	4,17
5 veces	8	7,27	Sopas	12	3,13
			Cereales	18	4,69
			Queso	12	3,13
			Lácteos	8	2,08
			De todo	8	2,08
			Grasas	6	1,56
			Agua	6	1,56
			Pollo	14	3,65
			Tortilla	12	3,13
			Refresco	6	1,56
			Vegetales	4	1,04
			Legumbres	4	1,04
			Crema	4	1,04
			Peces	8	2,08
			Ensaladas	4	1,04
			Pastas	4	1,04
			Caldo	6	1,56
			Granos	2	0,52
			Carbohidratos	1	0,26
			Guisos	1	0,26
			Bistec	1	0,26
			Espagueti	1	0,26
			Chatarra	1	0,26
			Todo menos huevo	1	0,26
			Arroz	2	0,52
			Yogurt	1	0,26
			Mariscos	2	0,52
			Galletas	1	0,26
			Lo que se antoja	1	0,26
			De todo	1	0,26
			Otros	2	0,52
<b>Total</b>	<b>110</b>	<b>100,00</b>	<b>Total</b>	<b>384</b>	<b>100,00</b>

La Tabla no. 37 contiene los datos en relación a la cantidad de horas que duermen al día, siendo de 7 a 9 hrs. mas del 43%, con la mayor incidencia 8 hrs. (20.91%) de dormir. Estos hábitos son saludables, y están dentro de las recomendaciones para una vida plena.

Tabla no. 37 Número de horas que duermen por día los encuestados sobre preferencias de productos lácteos fermentados

Horas dormidas por día	número	Porcentaje
½ hrs. durante el día	2	1,82
4 ½ hrs. a 7 hrs.	2	1,82
6 hrs.	6	5,45
6 hrs. a 7 hrs.	2	1,82
7 hrs.	12	10,91
7 hrs. a 8 hrs.	8	7,27
7 hrs. a 9 hrs.	2	1,82
8 hrs.	23	20,91
8 hrs. a 9 hrs.	13	11,82
8 hrs. a 10 hrs.	8	7,27
8 hrs. a 12 hrs.	2	1,82
9 hrs.	10	9,09
9 hrs. a 10 hrs.	2	1,82
10 hrs.	6	5,45
Máximo 10 hrs.	2	1,82
No se	2	1,82
Ninguna	8	7,27
<b>Total</b>	<b>110</b>	<b>100,00</b>

A la pregunta expresa de si padecen algún tipo de malestar la respuesta positiva fue de 94 personas, siendo los padecimientos de estreñimiento, diarrea y dolor de estomago los más manifestado. Esto denota un valor alto, partiendo de la premisa de que la mayoría de los encuestados son jóvenes (ver Tabla no. 38).

Tabla no. 38 Tipo de malestar intestinal padecido por los encuestados sobre preferencias de productos lácteos fermentados

Tipo de malestar intestinal	número	Porcentaje
Dolor de estomago	10	13,51
Diarrea	10	13,51
Estreñimiento	11	14,86
Vomito	5	6,76
Gastritis	7	9,46
Retortijón	4	5,41
Espasmos	3	4,05
Irritación	2	2,70
Acidez	2	2,70
Cólico	2	2,70
Estreñimiento después del embarazo	1	1,35
Dolor boca estomago	2	2,70
Dolor riñón	1	1,35
Úlcera	2	2,70
Agruras	2	2,70
Reflujo	2	2,70
Mala digestión	1	1,35
Inflamación estomacal	1	1,35
Empacho	1	1,35
Colitis	3	4,05
Hemorroides	1	1,35
Infección por alimentos en mal estado	1	1,35
<b>Total</b>	<b>74</b>	<b>100,00</b>

Por último, la Tabla no. 39 arroja los números sobre la cantidad y tipo de uso del baño, utilizándolo 5 veces al día, de las cuales 3 ocasiones son para orinar y 1 o 2 veces para defecar.

Los resultados globales puntualizando las respuestas de mayor frecuencia se integran al instrumento aplicado, que se presenta contestado. La información obtenida de la aplicación de la encuesta es la siguiente. El 60%(66) de los encuestados son del sexo femenino, 87.27%(96) son solteros, la población de 15 a 19 años representa el 83.64% del total de los encuestados. El 98.18% (108) consumen productos lácteos, de los cuales los más mencionados son: leche 24.75%(98), queso 23.74%(94), yogurt 22.73%(90). Los datos obtenidos demuestran el 85.45%(94), consumen algún alimentos lácteos fermentados, siendo las marcas más consumidas Danone. 20.63%(26), Yakult con 17.46%(22).

En relación al producto lácteo demandado fue el yogurt solido (viscoso) con el 41.07%(46), y el yogurt para beber 14.29%(16) de las preferencias expresadas. La cantidad consumida de lácteos fermentados varía de 250 ml (14.89%) a 1 litro (12.77%), la frecuencia de consumo oscilo entre 36.17% diario, 12.77% cada semana, y 12.77% solo cuando se le antoja.

Tabla no. 39 Frecuencia y tipo de uso del baño al día de los encuestados sobre preferencias de productos lácteos fermentados

Frecuencias de uso del baño al día			Frecuencias de orinar al día			Frecuencias de defecado al día		
	No.	%		No.	%		No.	%
2 veces	2	1,82	2 veces	10	9,09	1 veces	38	34,55
2 a 3 veces	10	9,09	2 a 3 veces	19	17,27	1 a 2 veces	12	10,91
3 veces	14	12,73	3 veces	36	32,73	2 veces	36	32,73
3 a 5 veces	2	1,82	3 a 4 veces	4	3,64	2 a 3 veces	10	9,09
3 a 7 veces	2	1,82	3 a 5 veces	1	0,91	3 veces	12	10,91
4 veces	14	12,73	4 veces	10	9,09	4 a 5 veces	2	1,82
4 a 5 veces	2	1,82	4 a 5 veces	2	1,82			
4 a 6 veces	4	3,64	4 a 6 veces	1	0,91			
5 veces	22	20,00	5 veces	14	12,73			
5 a 6 veces	4	3,64	6 veces	2	1,82			
5 a 7 veces	2	1,82	9 veces	1	0,91			
6 veces	6	5,45	10 veces	2	1,82			
6 a 7 veces	2	1,82	5 veces	1	0,91			
7 veces	6	5,45	8 veces	1	0,91			
8 veces	4	3,64	Mucha agua	6	5,45			
10 veces	4	3,64						
12 veces	4	3,64						
Muchas veces	2	1,82						
Según veces	4	3,64						
<b>Total</b>	<b>110</b>	<b>100,00</b>	<b>Total</b>	<b>110</b>	<b>100,00</b>	<b>Total</b>	<b>110</b>	<b>100,00</b>

También se cuestiono el conocimiento de los microorganismos probióticos y el 78.18%(86) refiere haber escuchado hablar de microorganismos probióticos, de ellos en relación de que son manifestaron el 15.12%(13) coinciden en que son microorganismos o bacterias; y el 12.79%(10) refiere que son bacterias buena para el organismo; en referencia de para qué sirven expresaron el 112.79%(11) refiere que son buenos para la flora intestinal y el 10.47%(9) son para protegernos de las enfermedades.

**ENCUESTA SOBRE PREFERENCIAS EN CONSUMO DE PRODUCTOS LACTEOS  
FERMENTADOS CON MICROORGANISMOS PROBIOTICOS (Contestado)**

ENCUESTADOR

NUMERO 110

LUGAR Ocotlán, Jalisco

FECHA Y HORA Mayo-junio 2011

SEXO FEMENINO 66 MASCULINO 46 ESTADO CIVIL Solteros 90/ Casados 14

FECHA DE NACIMIENTO 15 (diciembre 1992-97) EDAD 92 (14-19 años)

A QUE SE DEDICA: 66 estudiantes/22 estudia y trabaja NIVEL DE ESTUDIOS 90 Bachillerato.

PRIMERA PARTE

SI LA RESPUESTA ES NO PASE A LA SEGUNDA PARTE

1.-USTED CONSUME PRODUCTOS LACTEOS SI 108 NO 2 A VECES 6.

CUAL Leche 98/ queso 94/ yogurt 90// crema 62

2.-CONSUME USTED PRODUCTOS LACTEOS FERMENTADOS? SI 94 NO 16

QUE MARCA 26 Danone/ 22 yakult QUE TIPO 46 yogurt/ 16 yogurt beber

QUE CANTIDAD QUE CONSUME (APROXIMADAMENTE) 14 (250 ml.)/12 (l litro)

POR QUE LO CONSUME 56 gusto/ 8 antojo.

CADA CUANDO LO CONSUME 34 diario/ 12 cuando se me antoja.

SEGUNDA PARTE

3.- HA OIDO HABLAR DE MICROORGANISMOS PROBIOTICOS SI 86 NO 24

QUE SON? 13 microorganismos/ 11 bacterias buenas para el organismo

PARA QUE LE SIRVEN? 10 para la flora intestinal/ protegernos de enfermedad 9.

TERCERA PARTE

4.- REGULARMENTE CUANTAS VECES COME AL DIA: 53(3 veces al día); 15 (2 a 3 veces al día)

QUE ES LO QUE COME NORMALMENTE? 72 carne/ 38 frijoles/ 34 verduras/ 26 frutas

5.- CUANTAS HORAS DUERME AL DIA? 23 (8 hrs.)/ 12 (7hrs.).

CUARTA PARTE

6.- A TENIDO ALGUN MALESTAR INTESTINAL SI 74 NO 36.

CUAL? 11 estreñimiento/ 10 diarrea/ 10 dolor de estomago,

7.- ¿CUANTAS VECES VA AL BAÑO AL DIA? 22 (5 veces)/ 14 (3 veces)/ 14 (2 veces)

¿CUANTAS VECES ORINA? 36 (3 veces) ¿CUANTAS VECES DEFECA? 38 (1 vez)/ 36 (2 veces)

## Discusión.

**El Censo de productos lácteos fermentados**, no dio la información de los productos lácteos fermentados que se comercializaban en los supermercados de la ciudad de Ocotlán. A partir del mismo se seleccionaron para realizar los estudios experimentales dos categorías Yogurt y leche fermentadas, la diferencia de ellas se sustenta en el tipo de microorganismo que se utiliza para realizar la fermentación de la leche, en el caso Yogur, es un Cultivos simbióticos de *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii* subesp. *bulgaricus*, esto de acuerdo al CODEX STAN 243-2003, y la norma NOM-181-SCFI-2010. Para la leche fermentada el codex contempla las categorías de yogurt, Yogur en Base a Cultivos Alternativos (*Streptococcus thermophilus* y toda especie *Lactobacillus*), Leche Acidófila: (*Lactobacillus acidophilus*), Kefir (*Lactobacillus kefir*, *Leuconostoc*, *Lactococcus* y *Acetobacter*) y Kumys (*Lactobacillus delbrueckii* subesp. *bulgaricus* y *Kluyveromyces marxianus*). La norma 181 es específica para yogurt y lo clasifica como yogurt propiamente y yogurt en base a cultivos alternativos.

Los tres yogurtes seleccionados representan a igual número de empresas siendo 2 transnacionales y una nacional y en el caso de las leches fermentadas son 3 mundiales y 1 mexicana.

**Yogurt.** Si hacemos un análisis comparativo de los resultados de los recuentos microbianos obtenidos en relación a los límites permitidos en la Norma Oficial Mexicana (NOM-185-SSA1-2000), los recuentos de Microbiología Sanitaria, coliformes totales, *Staphylococcus aureus* y *Salmonella* fueron negativos, por lo tanto, están dentro de norma. Estos grupos microbianos tienen la intencionalidad de garantizar la calidad del producto, ya que los coliformes totales, indican prácticas sanitarias objetables, el estafilococos posibilidad de contaminación humana y la *Salmonella* el riesgo de patógenos en el alimento Fernandez-Escartín (2009)

En el mismo sentido, los parámetros fisicoquímicos, referenciados con la norma, en la temperatura el 33% de las muestras están fuera de norma, siendo los valores de la marca 2. Respecto del pH el 7% del total de muestras están fuera del límite normativo, correspondiendo a de la marca 2 de yogurt de beber y la marca 3 de yogurt cuchareable, con dos muestras cada una. Los datos de la acidez de están en conformidad con el límite mínimo.

La temperatura de almacenamiento es de refrigeración de 0°C a 10°C Stanton (1985) y son recomendadas por el productor con la finalidad de asegurar que el producto mantenga su calidad durante su vida de anaquel, No obstante en los supermercados por cuestiones mercadológicas los exhibe en refrigeradores verticales y abiertos. La fermentación de la leche, modifica el valor de pH de casi neutro a menores de 5, el caso de la acidez es inverso de 0.12% a mayores de 0.8 Stanton (1985). La norma si establece valores definidos pH menores de 4.4 y acides mayor de 0.5%.

Las características organolépticas registradas demuestran perfiles con sabores y texturas suaves que fueron desarrollados y evaluados por los fabricantes, siendo un parámetro subjetivo dependiente del consumidor Pedrero et al. (1997).

**Leche fermentadas.** Después de meses de trabajo, recolectando 60 muestras diferentes de 4 leches fermentadas, todas de diferente lote y elegidas al azar, obtuvimos resultados variantes referentes a la cuenta de bacterias ácido lácticas (BAL) tanto en el medio Man, Rogosa y Sharpe (MRS), como en medio All Purpose Tween Agar (APT).

Una fermentación microbiana alcanza cantidades de bacterias de más de  $1 \times 10^9$  ufc/g Yildiz (2010). El CODEX STAN243-2003 y la NOM-181-SCFI-2010, establece una cantidad mínima de  $10^7$  ufc/g, al comparar los resultados de los recuentos de las BAL, se observo, en los recuentos mínimos, que las marcas analizadas, no cubren los límites de esta norma, excepto la marca 4 en el medio MRS. El Medio de cultivo APT es recomendado por Fernández-Escartin (2009) y el medio de cultivo MRS está recomendado por el Libro The Prokaryotes (2006). A la vez hay estudios realizados por Shah (2000), Dave y Shah (1996), Tharmaraj y

Shah (2003), donde se evaluaros diferentes condiciones y medios del cultivo, para el recuento selectivo de bacterias probióticas. Entre estos medios se probó el MRS en su fórmula original o adicionando ingredientes para enriquecerlo y/o hacerlo selectivo para recuento de bacterias probióticas en mezcla con cultivos iniciadores para el yogurt. Teniendo en algunos datos recuperaciones mayores a 3 logaritmos.

**Variabilidad Genética de BAL.** Evaluación de la diversidad genética de los microorganismos aislados por medio de la técnica de RAPD. La variabilidad genética se refiere a la variación en el material genético de una población o especie, que es causada por mutaciones, recombinaciones y alteraciones en el cariotipo, siendo estos los procesos que afectan la selección natural y la variación genética entre las especies. La variabilidad es la materia prima de la evolución, lo cual es deseable, en microorganismos de uso industrial o médico, cuando esta mejorando o generando un atributo deseable (Mora y col. 2002). La variación genética o diversidad ha sido estudiada tradicionalmente por análisis de caracteres morfológicos o bioquímicos. No obstante, estos marcadores no dan una medida confiable de las diferencias genéticas. El análisis del DNA del microorganismo conduce a una evaluación directa de la variación en el genotipo. Los marcadores RAPD son una herramienta útil en este tipo de estudio.

Las 10 cepas de cada uno de los productos lácteos analizados, se observa que los coeficientes de similitud de Jaccard más altos corresponden al grupo de bacterias aisladas de cada uno de los productos. Coeficientes de similitud calculados por el método Jaccard muestran el grado de similitud existente entre los genotipos estudiados, se puede observar el grado máximo de similitud entre las cepas de un mismo producto, como también se puede apreciar la similitud genética de tres de los grupos (*Lactobacillus*) y la diferencia que existe entre éstos y el cuarto grupo (*Bifidobacterias*).

La variabilidad genética que presentan las muestras de cada grupo se puede explicar puesto que al realizarse varias resiembras de estas bacterias en los medios de cultivo, y cambiar ciertas condiciones naturales de las cepas, pudieron

haber sufrido algunas mutaciones lo que nos pudo originar modificaciones en el genoma del microorganismo. Además las cepas de estos productos al ser comerciales pueden estar “diseñadas” para en caso de resiembras o manejo externo al embase, originen mutaciones en su genoma.

En la última década, debido al uso de métodos moleculares, nuestro conocimiento de la diversidad microbiana en ecosistemas microbianos ha crecido dramáticamente. En particular, están disponibles nuevas y con mayor rendimiento técnicas moleculares independientes o dependientes de cultivo para estudio de comunidades microbianas asociadas a alimentos. Mientras que los primeros están ayudando a resolver los problemas específicos relacionados con la dinámica y composición heterogénea de población de las comunidades microbianas en matrices alimentarias complejas, los segundos están expandiendo nuestro conocimiento sobre la diversidad taxonómica de la microflora relacionados con la alimentación. Enfoques moleculares para estudiar la evolución de la flora microbiana podrían ser usados para comprender mejor el proceso microbiano involucrado en el procesamiento y madurado de alimentos, proveyendo seguridad microbiológica por el monitoreo de bacterias patogénicas in situ, y evaluando la composición efectiva de la población microbiana (Cocolin y Ercolini 2008).

Los enfoques para el estudio de microorganismos en alimentos han cambiado sin duda. Los avances de biología molecular han provisto más información sobre las bacterias asociadas a alimentos, y han proporcionado a la comunidad científica métodos consistentes, confiables y eficaces para la detección, identificación y tipificación de los microorganismos de los alimentos.

Se han realizado un gran número de análisis a microorganismos probióticos, estos bajo técnicas moleculares incluida la técnica de RAPD. Se han logrado establecer la similitud genética de gran número de BAL (Andrighetto y col. 2002; Corroler y col. 1998; Holzapfel y col. 2001; McCartney, 2002; Mohania y col. 2008; Mora y col. 2000; Mora y col. 2002; Tilsala-Timisjärvi y Alatosava 1998).

La técnica de RAPD es una herramienta de gran utilidad, con la que se pueden lograr análisis poblacional de gran número de microorganismos y puede realizarse a muestras de DNA originadas casi por cualquier método de extracción lo que

simplifica y justifica aún más el uso de esta técnica (Araújo y col. 2004). Es una técnica que es ampliamente utilizada por investigadores puesto que arroja resultados claros y confiables (Mora y col. 2002).

Es importante realizar más estudios y con mayor profundidad para obtener mejor información, para que los consumidores de estos productos probióticos tengan un diagnóstico de la variedad y calidad de los productos lácteos con microorganismos probióticos, así como su beneficio comprobado a la salud e implantación en la flora intestinal. Además de desarrollar de productos lácteos de consumo común con probióticos. Con esto se coadyuvará a desmitificar estos productos y dar información veraz al consumidor para que haga compras más razonadas de estos alimentos.

En relación del perfil bioquímico de las BAL aisladas de las leches fermentadas, no es concluyente para diferenciarlas y se necesitan desarrollar más pruebas específicas para marcar diferenciación.

**Estudio de percepción de los productos lácteos fermentados.** Los datos obtenidos de la encuesta nos dan información siguiente. El 60%(66) de los encuestados son del sexo femenino, 87.27%(96) son solteros, la población de 15 a 19 años representa el 83.64% del total de los encuestados. El 98.18% (108) consumen productos lácteos, de los cuales los más mencionados son: leche 24.75%(98), queso 23.74%(94), yogurt 22.73%(90). Los datos obtenidos demuestran el 85.45%(94), consumen algún alimentos lácteos fermentados, siendo las marcas más consumidas Danone. 20.63%(26), Yakult con 17.46%(22). En relación al producto lácteo demandado fue el yogurt solido (viscoso) con el 41.07%(46), y el yogurt para beber 14.29%(16) de las preferencias expresadas. La cantidad consumida de lácteos fermentados varía de 250 ml (14.89%) a 1 litro (12.77%), la frecuencia de consumo oscilo entre 36.17% diario, 12.77% cada semana, y 12.77% solo cuando se le antoja.

También se cuestiono el conocimiento de los microorganismos probióticos y el 78.18%(86) refiere haber escuchado hablar de microorganismos probióticos, de ellos en relación de que son manifestaron el 15.12%(13) coinciden en que son

microorganismos o bacterias; y el 12.79%(10) refiere que son bacterias buena para el organismo; en referencia de para qué sirven expresaron el 112.79%(11) refiere que son buenos para la flora intestinal y el 10.47%(9) son para protegernos de las enfermedades.

La dieta alimentaria fue otro rubro, los datos vertidos son en la frecuencia de consumir alimentos 3 veces al día es de 48.18%(53) y de 2 a 3 veces 13.64%(15). De la categoría de alimentos consumidos, la carne representa el 18.75%(72), las leguminosas como los frijoles fueron 9.90%(38) referidos al total de menciones. En sus hábitos de dormir al día fueron 8 horas es 20.91%(23), 7 horas 10.91%(12), los demás datos varían de 4 horas a 10 horas.

Por último, en el funcionamiento digestivo, el 66.27%(74) de las personas encuestadas refieren tener algún tipo de malestar digestivo, siendo el estreñimiento el más común con un 14.86%(11), seguido de la diarrea y dolor de estomago con el 13.51%(10) cada uno. La frecuencia del uso del sanitario es de 5 veces por día 20.00%(22), de las cuales, orinaban de 3 veces al día el 32.73%(36) y 34.55%(38) defecaban una vez al día.

## Conclusiones

1. Los yogurt de beber y batido expendidos en la ciudad de Ocotlán se encuentran dentro de norma respecto de los recuentos microbianos.
2. Los parámetros fisicoquímicos del yogurt fueron aceptables y de acuerdo a la norma a excepción del pH en una marca.
3. La calidad microbiológica del yogurt fue aceptable y dentro de norma.
4. En las leches fermentadas la norma mexicana no establece una cantidad mínima de bacterias lácticas por ml de producto.
5. Todas las marcas de las leches fermentadas contenían bacterias ácido lácticas viables.
6. La temperatura de almacenamiento de las leches fermentadas sobrepasaba el límite establecido por la norma.
7. Los parámetros de acidez y pH de las leches fermentadas están en conformidad de la normatividad vigente, excepto una marca respecto del pH.
8. Toda la Microbiología Sanitaria de las leches fermentadas fue negativa y dentro de norma.
9. En la variabilidad genética de las bacterias ácido lácticas de las leches fermentadas, el dendograma UPGMA derivado de los coeficientes de similaridad calculados por el método Jaccard establece la existencia de cuatro grupos de diversidad genética.
10. En el estudio de percepción, el producto lácteo fermentado mas consumido es el yogurt.

## Bibliografía

1. Adams MR, Marteau P (1995): On the safety of lactic acid bacteria. *Int J Food Micro*, 27: 263-264
2. Agarwal, M. Shrivastava, N. and Padh. H. (2008). Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. *Plant Cell Rep*; 27:617–631.
3. Ahrne, S., Lonnermark, E., Wold, A.E., Aberg, N. and Hesselmar, B. (2005). Lactobacilli in the intestinal microbiota of Swedish infants. *Microbes Infect*; 7: 1256–1262.
4. Alimentos funcionales. Alimentos que pretenden mejorar las funciones vitales de nuestro organismo. [www.consumer.es/web/es/alimentacion/aprender\\_a\\_comer\\_bien/alimentos\\_funcionales](http://www.consumer.es/web/es/alimentacion/aprender_a_comer_bien/alimentos_funcionales). acceso: 2 agosto 2012.
5. Álvarez-Olmos, M.I. and Oberhelman, R.A. (2001) Probiotic agents and infectious diseases: A modern perspective on a traditional therapy. *Clin Infect Dis*; 32:1567-1576
6. Amores, R., Calvo, A., Maestre J.R. y Martínez-Hernández, D. (2004) Probióticos. *Rev. Esp. Quimioterap*; 17(2):131-139
7. Axelsson, L. (2004) Lactic Acid bacteria: Classification and Physiology. In: *Lactic Acid Bacteria, Microbiology and Functional aspects*. (Salminen, S. and Von Wright, A., eds). New York. Marcel Dekker, Inc.
8. BCC Research (2005) Probiotics: ingredients, supplements, foods. Norwalk, CT. BCC Inc.
9. Ben-Amor, K., Heilig, H., Smidt, H., Vaughan, E. E., Abee, T. and de Vos, W. M. (2005) Genetic diversity of viable, injured, and dead fecal bacteria assessed by fluorescence-activated cell sorting and 16S rRNA gene analysis. *Appl. Environ. Microbiol*; 71:4679–4689.
10. Benno, Y. Sawada, K., and Mitsuoka, T. (1984) The intestinal microflora of infants: composition of fecal flora in breast-fed and bottle-fed infants. *Microbiol. Immunol*; 28:975-986

11. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 1994 (9a. ed) John G. Holt, Noel R. Krieg, Peter H.A. Sneath, James T. Staley y Stanley T. Williams. Lippincott Williams & Wilkins. USA
12. Bernardeau, M., Guguen, M. and Vernoux, J. P. (2006) Beneficial lactobacilli in food and feed: longterm use, biodiversity and proposals for specific and realistic safety assessments. FEMS Microbiol. Rev; 30(4):487–513.
13. Bibel, D.J. (1988) Elie Metchnikoff's bacillus of long life. ASM News; 54(12):661
14. Bogart, R. (1977) Scientific Farm Animal Production. Burgess Publishing Company, Minneapolis, Minnesota, pp. 1–19.
15. Bojalili, L.F. y Aznavurian A. (1984) Introducción a la Biología. Editorial Terra Nova, S.A. UAM Xochimilco. (Pp59-75)
16. Bouvier, M., Meance, S., Bouley, Ch., Berta, J.L. and Grimaud, J.C. (2001) Effects of Consumption of a Milk Fermented by the Probiotic Strain *Bifidobacterium animalis* DN-173 010 on colonic Transit Times in Healthy Humans. Bioscience. Microflora; 20(2):43-48.
17. Brigidi, P., Swennen, E., Vitali, B., Rossi, M. y Matteuzzi, D.(2003) PCR detection of *Bifidobacterium* strains and *Streptococcus thermophilus* in feces of human subjects after oral bacteriotherapy and yogurt consumption. International Journal of Food Microbiology; 81:203-209
18. Brook, I. (1999) Bacterial interference. Crit. Rev. Microbiol; 25:155-172
19. Buchanan, R.E., Gibbons, N.E. (Eds.) (1974) Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (8th ed) Williams and Wilkins Baltimore, MD.
20. Business Communications Co. Ltd. (BCC) julio de 2005.
21. Campbell, J.R. and Marshall, R.T. (1975) The Science of Providing Milk for Man. McGraw-Hill, New York, pp, 1–24.
22. CeNAN (1982) Técnicas para el Análisis Microbiológico de Alimentos y Bebidas. Madrid
23. Chandan, R.C. (1999) Enhancing market value of milk by adding cultures. J Dairy Sci; 82:2245-2256

24. Chauviere, G., Coconnier, M.H., Kerneis, S., Darfeuille-Michaud, A., Joly, B. and Servin, A.I. (1992) Competitive exclusion of diarrheagenic *Escherichia coli* (ETEC) from human enterocyte-like Caco-2 cells by heat killed *Lactobacillus*. *FEMS Microbiol. Lett*; 70:213-217
25. Condon Salcedo R, Mariné Font A, Rafecas Martínez M. (1988) Yogur: elaboración y valor nutritivo. Fundación Española de la Nutrición. Publicaciones: serie "Divulgación", nº 10. Madrid, octubre.
26. Crittenden, R.G. y Playne, M.J. (1996) Production, properties and applications of food-grade oligosaccharides. *Trends in Food Science and Technology*; 7:353-361.
27. Crueger, W. and Crueger, A. (1993) Introducción Pp 1-3.en *Biotecnología: Manual de Microbiología Industrial*. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza, España.
28. Dairy Council of California (2000) Probiotics – Friendly Bacteria with a Host of Benefits.
29. Datamonitor. Insights into Tomorrow's Nutraceutical Consumers 2005. Available at <http://www.marketresearch.com/product/display.asp?productid%41173944>. Accessed on August 8, 2007.
30. Dave, R.I. and Shah, N.P. (1996) Evaluation of Media for Selective Enumeration of *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *Bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterias*. *J Dairy Sci*; 79:1529-1536.
31. Dave, R.I. and Shah, N.P. (1997) Ingredient Supplementation Effects on Viability of Probiotic Bacteria in Yogurt. *J Dairy Sci*; 80:2804-2816.
32. De Beer, H. (2004) Observations on the history of Dutch physical stature from the late-Middle Ages to the present. *Econ. Hum. Biol*; 2(1):45–55.
33. Diplock, A.T., Aggett, P., Ashwell, M., Bornet, F., Fern, E. and Roberfroid M. (1999) Scientific concepts of functional foods in Europe: Consensus document. *Br J Nutr*; 81(1):S1-S27
34. EFSA (2005) Opinion of the Scientific Committee on a request from EFSA related to a generic approach to the safety assessment by EFSA of

microorganisms used in food/feed and the production of food/feed additives. EFSA J; 226:1-12

35. Escalante-Lozada, A. (2000) Técnicas moleculares en la investigación de probióticos. Memorias. 2° Simposio Mexicano de Probióticos. 8y9 de junio, Guadalajara, Jalisco, México.
36. Escalante-Lozada, A. (2001) El potencial de la manipulación de la flora intestinal por medios dietéticos sobre la salud humana. Enferm. Infecc. Microb. Clin; 21:106-114
37. Famuralo, G., De Simone, C., Mateuzzi, D., Pirovano, F. (1999) Traditional and high potency probiotic for oral bacteriotherapy. *Bio-Drugs*; 12:455-470
38. FAO/WHO (2001) Joint Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria, October 2001.
39. FAO/WHO (2002) Report of a Joint Working Group on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. London, Ontario, Canada, 30 April-1 May 2002
40. FAO/WHO (2006) Probiotic in foods. Health and nutritional properties and guidelines for evaluation. In FAO Food and Nutrition Paper 85, ISBN 92-5-105513-0. Also available at <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/009/a0512e/a0512e00.pdf>. acceso 2 agosto 2012.
41. Farjas-Abadía, P. (2003) Sobre los alimentos funcionales. *Revista Española de Salud Pública*; 77:313-316.
42. Farnworth, R.E. Editor. (2008) *Handbook of Fermented Functional Foods*. Second Edition. CRC Press Taylor & Francis Group
43. Fasoli, S., Marzotto, M., Rizzotti, L., Rossi, F., Dellaglio, F. And Torriani, S. (2003) Bacterial composition of commercial products as evaluated by PCR-DGGE analysis. *International Journal of Food Microbiology*; 82:59-70
44. Fenema, R. Owen. Bernabe Sanz Pérez, et al. (2000) Introducción a la Química de los Alimentos Pp 1 -18 en *Química de los alimentos*, pag 2.editorial Acribia

45. FDA (1997) Substances Generally Recognized As Safe. Fed. Reg. FDA. 62:18937-18964
46. Fernández-López, J.R. Hernández-Mejía, R. y Cueto-Espinar, A. (1996) La calidad de vida: un tema de investigación necesario. Concepto y método (I). Rev. Medicina Integral; 27(2):54
47. Fernández-Escartín, E. (2009a) Introducción a las enfermedades microbianas transmisibles por los alimentos (ETA's) Pp 99-122. En Microbiología e Inocuidad de los Alimentos. 2º Edición, Universidad Autónoma de Querétaro. México
48. Fernández-Escartín, E. (2009b) Alimentos fermentados, desecados y congelados Pp. 685-700. En Microbiología e Inocuidad de los Alimentos. 2º Edición, Universidad Autónoma de Querétaro. México
49. Finegold, S.M., Sutter, V.L. and Mathisen, G.E. (1983) Normal indigenous intestinal flora, Chap. I In: Hentges DJ, ed. Human Intestinal Microflora in Health and Disease. New York: Academic Press, 1983, p. 3-31.
50. Fons, M., Gómez, A., Karjalainen, T. (2000) Mechanisms of colonization and colonization resistance of the digestive tract. Microbiol. Ecol. Health. Dis; (2):S240-S246
51. Fooks, L.J. and Gibson, G.R. (2002) Probiotics as modulators of the gut flora. British Journal of Nutrition; 88(1):S39-S49.
52. Frost & Sullivan (2004) End-User Analysis of the European Probiotics Market. NYC
53. Fuller, R. (1989) Probiotics in man and animals. J. Appl. Bacteriol; 66:365-378
54. García-Garibay, M. (2000) Prebióticos. Memorias en. 2º Simposio Mexicano de Probióticos. 8y9 de junio, Guadalajara, Jalisco, México.
55. Richardson, Gary H. (1985) Standard methods for examination of dairy products. (15a. ed) American public association
56. Gibson, F. and Robertfroid, M. (1995) Dietary modulation of the human colonic microbiota: Introducing the concept of prebiotics. J. Nutr;125:1401-1412

57. Gilliland, S.E. (2000) Fermented milks and probiotics. *Memorias. 2º Simposio Mexicano de Probióticos. 8y9 de junio, Guadalajara, Jalisco, México.*
58. Gorbach, S.L.; Plaut, A.G.; Nahas, L. and Weinstein, L. (1967) Microorganisms of the small intestine and their relations to oral and faecal flora. *Gastroenterology*; 53:856
59. Grajek, W., Olejnik, A. and Sip, A. (2005) Probiotics, prebiotics and antioxidants as functional food. *Avta Biochimica Polonica*; 52(3):665-671. Presented at the International Review Conference on Biotechnology, Vienna, Austria, November 2004.
60. Gueimonde, M., Debor, L., Tölkkö, S., Jokisalo, E. and Salminen, S. (2007) Quantitative assessment of faecal bifidobacterial populations by using novel real-time PCR assays. *J. Appl. Microbiol*; 102:1116–1122.
61. Gueimonde, M., Frias, R. and Ouwehand, A. (2006) Assuring the continued safety of lactic acid bacteria used as probiotics. *Biologia*; 61(6):755–760.
62. Gueimonde, M. y Clara de los Reyes-Gavilán, C. (2009) Detection and enumeration of gastrointestinal microorganisms. 25-43 In *Handbook of Probiotics and Prebiotics*; Lee, Y.K. and Salminen, S. Eds.; John Wiley & Sons, Inc.: New York.
63. Hammes, W.P. and Tichaczek, P.S. (1994) The potential of acid bacteria for the production of safe and wholesome food. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*; 198:193-201
64. Hans-Jürgern, Hapke (1997) Instituto de Farmacobiología, Toxicología y Farmacia de la escuela superior de medicina veterinaria de Hannover, Alemania. Presencia de compuestos indeseables en alimentos de origen animal. *Memorias Simposium Significado sanitario de residuos químicos potencialmente tóxicos en alimentos.* 12-21
65. Harish, K. and Varghese, T. (2006) Probiotics in humans – evidence based review. *Calicut Medical Journal*; 4(4):e3
66. Harmsen, H.J.M., Gibson, G. R., Elfferich, P., Raangs, G.C., and Wildeboer-Veloo, A.C.M. (1999) Comparison of viable cell counts and fluorescence in

- situ hybridisation using specific rRNA-based probes for the quantification of human fecal bacteria. FEMS Microbiol. Lett; 183:125–129.
67. Harmsen, H.J.M., Raangs, GC, He T, Degener JE, and Welling GW. Extensive set of 16S rRNA-based probes for detection of bacteria in human feces. Appl. Environ. Microbiol; 68:2982–2990.
  68. Hayashi, H., Sakamoto, M., Kitahara, M. and Benno, Y. (2003) Molecular analysis of fecal microbiota in elderly individuals using 16S rDNA library and T-RFLP. Microbiol Immunol; 47:557–570.
  69. Heller, K.J. (2001) Probiotics bacteria in fermented foods: product characteristics and starter organisms. Am. j. Clin. Nutr; 73(37)4S-9S
  70. Henriksson, A., Borody, T. and Clancy, R. (2005) Probiotics under the regulatory microscope. Expert Opin Drug Safety; 4(6):1135–1143.
  71. Hernández-Mejía, R. Fernández-López, J.A. Rancaño-García, I. y Cueto-Espinar, A. (2001) Calidad de vida y enfermedades neurológicas. Rev. Neurología; 16(1):30-32.
  72. Hidalgo, J.R. (2001) La seguridad de llamarse yogur. [www.consumaseguridad.com](http://www.consumaseguridad.com) Fundación Grupo Erosky. Junio 2001. acceso 2 agosto 2012
  73. Hopkins, M.J., Sharp, R. and Macfarlane, G.T. (2001) Age and disease related changes in intestinal bacterial populations assessed by cell culture, 16S rRNA abundance, and community cellular fatty acid profiles. Gut; 48: 198–205.
  74. <http://www.fao.org/es/ESN/Probio/probio.htm> acceso 2 agosto 2012
  75. Hughes, D.B. and Hoover, D.G. (1991) BIFIDOBACTERIA. Their potential for use in American dairy products. Food Technology; Abril:74-81
  76. Ishibashi, N. and Shimamura, S. (1993) BIFIDOBACTERIA: Research and Development in Japan. Development and use of *Bifidus* food products is more widespread in Japan than in the U.S. Food Technology; Junio:126-135
  77. International Life Sciences Institute (ILSI) (1995) The Safety Assessment of Novel Foods; ILSI Europe; 1–24.Brussel

78. Joshi, V.K. and Pandey, A. (1999) *Biotechnology: Food Fermentations*, Vol. I, Educational Publishers and Distributors, New Delhi, pp. 1–24.
79. Katelaris, P.H. (1966) Probiotic control of diarrhoeal disease. *Asia Pacific J Clin*; 5:39-43.
80. Kosikowski, Frank V. and Mistry Vikram V. (1997) *Cheese and Fermented Milk Foods*. 3th ed. United States Of America Edwards Brothers
81. Kun-Lee, Y. and Salminen, S. Editors. (2009) *Handbook of Probiotics and Prebiotics*. Second Edition, ed. John Wiley & Sons, Inc. Pag 4- 24
82. Lane, D.L., Field, K.G., Olsen, G.J., and Pace, N.R. (1998) Reverse transcriptase sequencing of ribosomal RNA for phylogenetic analysis. *Meth. Enzymol*; 167:138-144
83. Lee, Y.K.; Nomoto, K.; Salminen, S.; and Gorbach, S.L. (1999) Safety of probiotic bacteria. 17-21. In *Handbook of Probiotics*; Lee, Y.K., Nomoto, K., Salminen, S., Gorbach, S.L., Eds.; John Wiley & Sons, Inc.: New York.
84. Lilly, D.N., Stillwell, R.H. (1968) Probiotics: Growth promoting factors produced by microorganisms. *Science*; 147:747-748
85. López-Brea, M. y Domingo, D. (2007) Antibioticoterapia con probióticos. *Rev Esp Quimioterap*; 20(2):170-181
86. Lourens-Hattingh, A. and Viljoen, B.C. (2002) Survival of probiotic bacteria in South African commercial bio-yogurt. *South African J Sci*; 98(5–6):298–300.
87. Macfarlane, G.T. and Cummings, H.J. (1999) Probiotics and prebiotics: Can regulating the activities of intestinal bacteria benefit health? *BMJ*;318:999-1003
88. Man, Rogosa, Sharpe (1960) *J. Appl. Bact*; 23:130
89. Marcos A. Puesta al día. (2002) Mesa redonda de nutrición y alimentos funcionales. *Anales Españoles de Pediatría*; 56(3):S11-S13.
90. Marteau, P., Minekus, M., Havenaar, R. and HuisIn't Veld, J.H.J. (1997) Survival of Lactic Bacteria in a Dynamic Model of the Stomach and Small Intestine: Validation and the Effects of Bile. *J Dairy Sci*;80:1031-1037

91. Metchnikoff, E. and Chalmers-Mitchell, P. (1908) *The Prolongation of Life. Optimistic studies.* New York: G. P. Putnam's Sons, The Knickerbocker Press. Edited by P. Chalmers Mitchell
92. Mistry, V.V. and Kosikowski, F.V. (1985) Fermentation of Ultrafiltered Skim Milk Retentates with Mesophilic Lactic Cheese Starters. *J. Dairy Sci*; 68:1613-1617.
93. Mohammed, M., Abd El-Aziz, H., Omran, N. Anwar, S., Awad, S. and El-Soda, M. (2009) Rep-PCR characterization and biochemical selection of lactic acid bacteria isolated from the Delta area of Egypt. *International Journal of Food Microbiology*; 128:417–423
94. Mitsuoka, T. and Hayakawa, K. (1973) Die fecal flora beimenschen. *Zbl. Bakteriolog. Hyg. I. Orig*; A 223:333-342
95. Mitsuoka, T. (1996) Intestinal flora and human health. *Asia Pacif. J. Clin. Nutr*; 5:2-9
96. Naidu, A.S., Biblack, W.R. and Clemens, R.A. (1999) Probiotic spectra of lactic acid bacteria (LAB). *Crit. Revs. Food. Sci. Nutr*; 39:13-126
97. Norma de Codex para leches fermentadas (2003) CODEX STAN 243-2003.
98. Ohigashi, H. (1996) An approach to functional food: cancer preventive potential of vegetables and fruits and their active constituents. *Nutrition Reviews*; 54(11).
99. Oparin, A.I. (1968) *El Origen de la Vida.* Editorial Grijalbo, México, D.F. (Pp7-26)
100. Organización de Naciones Unidas (2005) *OBJETIVOS DE DESARROLLO DEL MILENIO: UNA MIRADA DESDE AMÉRICA LATINA Y EL CARIBE.* Publicación de las Naciones Unidas. Impreso en Naciones Unidas, Santiago de Chile.
101. Orla-Jensen, S. (1919) *The Lactic Acid Bacteria;* Host and Son: Copenhagen.
102. Orla-Jensen, S. (1924) La classification des bactéries lactiques. *Le Lait*; 4:468-480.
103. Orla-Jensen, S., Olsen, E. Geill, T. (1945) Senility and intestinal flora. A reexamination of Metchnikoff's hypothesis.

104. Oyatayo, V.O. and Oyetayo, F.L. (2005) Potencial of probiotics as biotherapeutic agents targeting the innate immune system. *African Journal of Biotechnology*. 4(2): 123-127
105. Parker, R.B. (1974) Probiotics: The other half of the antibiotic story. *An. Nut. Health*; 29:4-8
106. Pedrero, F., Daniel. L. y Pangborn, R. Marie (1997) Evaluación Sensorial de los Alimentos Métodos Analíticos (2ª Ed). Editorial Alhambra Mexicana
107. Pérez-Tamayo, R. (1989) Como acercarse a la ciencia(1ªed). Dirección General de Publicaciones del Consejo Nacional para la Cultura y las Artes.(Pp7-42)
108. Pérez-Tamayo, R. (2000) Microbios y enfermedades (1ªed). Fondo de Cultura Económica. (Pp13-36)
109. Plaut, R. (1984) Análisis de riesgo, alcance y limitaciones para el administrador de salud. *Bol of Sanit. Panam*; 96(4):196-304.
110. Ramírez A.A. (1997) Problemática de los residuos tóxicos en alimentos. Memorias Simposium Significado sanitario de residuos químicos potencialmente tóxicos en alimentos. 1-11
111. Reid, G., Sander, M.E., Gaskins, H.R., Gibson, G.R., Mercenier, A., Rastall, R., Roberfroid, M., Rowland, I., Cherbut. C., and Klaenhammer, T.R. (2003) New scientific paradigms for probiotics and probiotics. *J. Clin. Gastroentrol*; 37:105-118
112. Reid, G. (2005) The Importance of guidelines in the development and application of probiotics. *Current Pharmaceutical Design*; 11:11-16
113. Reid, G. (2006) Safe and efficacious probiotics: what are they? *Trends Microbiol*; 14(8):348–352.
114. Requena, T., Burton, J., Matsuki, T., Munro, K. and Simon, M.A. (2002) Identification, detection and enumeration of human *Bifidobacterium* species by PCR targeting the transaldolase gene. *Appl. Environ. Microbiol*; 68:2420–2427.

115. Rizzo, R. (2000) Influencia de la lactancia en la flora intestinal. Memorias en. 2° Simposio Mexicano de Probióticos. 8y9 de junio, Guadalajara, Jalisco, México.
116. Roberfroid, M.B. (2000) Prebiotics and probiotics: are they functional. *Am. J. Clin. Nutr*; 71(S):1682S-1687S
117. Rodríguez Jerez J.J. La esencia del yogur pasteurizado. [www.consumaseguridad.com](http://www.consumaseguridad.com). Fundación Grupo Erosky. acceso 2 agosto2012
118. Rogosa, M.; Sharpe, M.E. (1960) Species differentiation of human vaginal lactobacilli. *J. Gen. Microbiol*; 23:197.
119. Rosenblueth, A. 1994. *Mente y Cerebro seguido de el Método Científico*. 10ª Edición. México. Siglo XXI editores, S.A. de C.V. (Pp 7-35)
120. Rubin R, (2003) A bug for what's bugging you? 7 August, USA TODAY.
121. Saarela, M., Mogensen, G., Fondén, R., Mättö, J. and Mattila-Sandholm, Y. (2000) Probiotic bacteria: Safety, functional and technological properties. *J. Biorechnol*; 84:197-215
122. Salminen, S., Bouley, M.C., Boutron-Rualt, M.C., Cummings, J., Franck, A., Gibson, G., Isolauri, E., Moreau, M.C., Roberfroid, M. and Rowlandl. (1998) Functional food science and gastrointestinal physiology and function. *Br. J. Nutr*; 80(1):S147-S171
123. Salminen, S., Nurmi, J. and Gueimonde, M. (2005) The genomics of probiotic intestinal microorganisms. *Genome Biol*; 6:225.
124. Salminen S. y Von Wright, A.(eds.). (1998) *Lactic acid bacteria, Microbiology and Functional aspects* Marcel Dekker, Inc. New York.
125. Salminen, S. (2000) Clinical applications of probiotics and intestinal microflora modification. Memorias. 2° Simposio Mexicano de Probióticos. 8y9 de junio, Guadalajara, Jalisco, México.
126. Salminen, S. And Wright, A.V. ed (1998) *Lactic Acid Bacteria in Health and Disease* pag 211- 253 en *Lactic Acid Bacteria: Microbiology and Functional Aspects*. 2a. Ed. Marcel Dekker, Inc.

127. Salminen, S. And Wright, A.V. editores. (1998) Lactic Acid Bacteria in the Human Microbial Ecosystem and Its Development pag 279- 342 en Lactic Acid Bacteria: Microbiology and Functional Aspects. 2a. Ed. Marcel Dekker, Inc.
128. Salminen, S. And Wright, A.V. ed (1998) Safety of Probiotic Bacteria pag 369 – 384 en Lactic Acid Bacteria: Microbiology and Functional Aspects. 2a. Ed. Marcel Dekker, Inc.
129. Salminen, S., Bouley, C., Boutron-Ruault, M.C. (1998) Functional food science and gastrointestinal physiology and function. Br J Nutr; 80(S):147S-171
130. Salminen S. y Von Wright, A. (ed.). (2004) Lactic acid bacteria, Microbiology and Functional aspects Marcel Dekker, Inc. New York.
131. Sanders, M.E., Tompkins, T., Heimbach, J.T. and Kolida S. (2005) Weight of evidence needed to substantiate a health effect for probiotics and prebiotics Regulatory considerations in Canada, E.U. and U.S. Eur. J. Nutr; 44(5):303–310.
132. Sanz, Y., Collado, M.C. and Dalmau, J. (2003) Probióticos: criterios de calidad y orientaciones para el consumo. Acta Pediátrica Española;61(9):476-482
133. Saavedra, J. M. (1995) Microbes to fight microbes: a not so novel approach to controlling diarrheal diseases. J. Ped. Gastroenterol. Nutr; 21:125-129
134. SCAN (2000): Report of the Scientific Committee on Animal Nutrition on the Safety of Use of Bacillus Species in Animal Nutrition. European Commission Health & Consumer Protection Directorate-General. ><http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scan/out41.pdf>
135. Scherezenmeir, J., De Vrese, M. (2001) Probiotics, prebiotics and synbiotics approaching a definition. Am. J. Clin. Nutr; 73(2)361S-364S
136. Schleifer, K.H., Ehrmann, M., Krusch, U., Neve, H. 1991. Revival of the species *Streptococcus thermophilus* (ex Orla-Jensen, 1919) nom. rev. Syst. Appl. Microbiol. 14, 386-388.

137. Shah, N. P. (2000) SYMPOSIUM: PROBIOTIC BACTERIA. Probiotic Bacteria: Selective Enumeration and Survival in Dairy Foods. *J. Dairy Sci*; 83:894–907
138. Shah, N.P. (1997) Isolation and enumeration of bifidobacteria in fermented milk products: A review. *Milchwissenschaft*; 52(2):72-76
139. Shankary, P.A., Davies, F.L. (1977) Selective technique for yogurt bacteria enumeration. *J. Soc. Dairy Technol*; 30:28.
140. Shetty, K., G. Paliyath, A. Pometto and R. E. Levin, ed (2006) Food Microbiology Pp 1.1 – 1.9 en *Food Biotechnology*. (2a. ed) CRC Press Taylor & Francis Group.
141. Silveira-Rodríguez M.B, Monereo-Megías S, Molina and Baena B. (2003) Alimentos funcionales y nutrición óptima, ¿Cerca o lejos? *Revista Española de Salud Pública*; 77:317-331.
142. Simpson, P.J., Fitzgerald, G.F., Stanton, C., and Ross, R.P. (2004a) The evaluation of a mupirocin-based selective medium for the enumeration of bifidobacteria from probiotic animal feed. *J. Microbiol. Methods*; 57:9-16.
143. Simpson, P.J., Ross, R.P., Fitzgerald, G.F., and Stanton, C. (2004b) *Bifidobacterium psychraerophilum* sp. nov. and *Aeriscardovia aeriphila* gen. nov., sp. nov., isolated from a porcine caecum. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol*; 54:401-406.
144. Spanhaak, S., Havenaar, R. Schaafsma, G. (1998) The effect of consumption of milk fermented by *Lactobacillus casei* strain Shirota on the intestine microbiota and immune parameters in humans. *Eur. J. Clin. Nutr*; 52:899-907
145. Stackebrandt, E., and Teuber, M. (1988) Molecular taxonomy and phylogenetic position of lactic acid bacteria. *Review. Biochimie*; 70:317-324.
146. Stackebrandt, E., Liesack, W., and Witt, D. (1992) Ribosomal RNA and rDNA sequence analyses. *Gene*; 15(115):255-260. Review
147. Stanton, C., Gardiner, G., Meehan, H., Collins, K., Fitzgerald, G., Brendan Lynch, P. and Ross, P. (2001) Market potencial for probiotics. *Am j Clin Nutr*; 73(S)476S-83S

148. Syers, M. E. (1993) Effect of consumption of lactic cultures on human health. Pp. 67 – 130. In: *Advances in Food Nutrition Research*. J. E. Kinsella (ed.). Academic Press, San Diego.
149. Ta Kung Pao (Chinese Newspaper, HK), November 28, 2004.
150. Tannock, G.W., Munro, K., Bibiloni, R., Simon, M.A. and Hargreaves, P. (2004) Impact of consumption of oligosaccharide-containing biscuits on the fecal microbiota of humans. *Appl Environ Microbiol*; 70:2129–2136.
151. Tannock, G.W., Munro, K., Harmsen, G.W., Smart, J. and Gopal, P.K. (2000) Analysis of the fecal microflora of human subjects consuming a probiotic product containing *Lactobacillus rhamnosus* DR20. *Appl. Environ. Microbiol*; 66:2578-2588
152. Teragazhi, B.E., Sandine, W.E. (1975) Improved medium for lactic Streptococcaceae phages from cheese factories. *Appl. Environm. Microbiol*; 29:807.
153. Tharmaraj, N. and Shah, N.P. (2003) Selective enumeration of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *Bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, bifidobacterias, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus* y propionibacterias. *J Dairy Sci*;86: 2288-2296
154. *The Prokaryotes: An Handbook on the Biology of Bacteria* (2006) Martin Dworkin ed. (3a ed) Springer
155. *The Prokaryotes: An Evolving Electronic Resource for the Microbiological Community*, 3<sup>rd</sup> edition, Springer-Verlag, New York. Fecha actualización Agosto 2004
156. Torres Vitela, M.R. (2000) Microbiología de las bacterias con características probióticas. Memorias. 2° Simposio Mexicano de Probióticos. 8y9 de junio, Guadalajara, Jalisco, México
157. Torres-Vitela, M.R., Garay-Martínez, L.E., Peregrina-Gómez, E., Macías-Rodríguez, E. y Trías-Flores, M.L. (2000) Recuento de bacterias lácticas en materia fecal en humanos asociado al consumo de leche fermentada con lactobacilos probióticos. Memorias. 2° Simposio Mexicano de Probióticos. 8y9 de junio, Guadalajara, Jalisco, México

158. Torres Vitela, M.R. (2002) Flora intestinal, probióticos y salud. Editorial Grafica Nueva. 2ª. Edición © D.R. Distribuidora Yakult Guadalajara
159. Trapp, C.L., Chang, C.C., Halpen, G.M., Keen, C.L., Gerschim, M.E. (1993) The influence of chronic yogurt consumption on populations of young and elderly adults. *Int Immunotherapy*; IX:53-64
160. Vaughan, E.E., deVRies, M.M., Zoetendal, E.G., Ben-Amor, Akkermans, A.D., de Vos, W.M. (2002) The intestinal LABs. *Antonie Leewenhoek*; 82:341-352
161. Vinderola, C.G., Prosello, W., Ghiberto, D., and Reinhelmer, J.A. (2000) Viability of Probiotic (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei*) and Nonprobiotic Microflora in Argentinian Cheese. *J. Dairy Sci*; 83:1905-1911.
162. Voragen, A.G.J. (1998) Technological aspects of functional food-related carbohydrates. *Trends in Food Science and Technology*; 9:328 -335.
163. Walstra, P., Geurts, T.J., Normen, A., Jellema, A. and Van Boekel, M.A.J.S. (2001) *Ciencia de la leche y tecnología de los productos lácteos*. Editorial Acribia S.A. España.
164. Waksman S. (1954) *My life with the microbes*. New York, Simon and Schuster
165. Wildeboer-Veloo, A.C.M., Harmsen, H.J.M., Degener, J.E. and Welling, G.W. (2003) Development of a 16S rRNA-based probe for *Clostridium ramosum*. *C. spiroforme* and *C. cocleatum* and its application for the quantification in human faeces from volunteers of different age groups *Microbiol. Ecol. Health Dis*; 15:131–136.
166. Wilson, M. (2005) *Microbial Inhabitants of Humans. Their ecology and role in health and disease*. Cambridge Univ. Press.
167. Woese, C.R. (1987) Bacterial evolution. *Microbiol. Rev*; 51:221-271.
168. [www.euromonitor.com](http://www.euromonitor.com). acceso 2 agosto 2012
169. Xiao-Wand-Oefner, P.J. (2001) Denaturing high-performace liquid chromatography: a review. *Hum. Mutat*; 17:439–474.

170. Yildiz, Fatihed (2010) capitulo 1: Overview of Yogurt and Other Fermented Dairy Products in Development and manufacture of yogurt and other functional dairy products. CRC Taylor and Francis Group, LLC
171. Yoshioka, H., Fujita, K., Sakata, H., Murono, K. and Iseki, K., (1991) Development of the normal intestinal flora and its clinical significance in infants and children. *Bifidobacteria microflora*; 10(1):11-17
172. Yuhara, T., Isojima, S., Tsughiya, F. and Mitsuoka, T. (1983) On the intestinal flora of bottle-fed infants. *Bifidobacteria microflora*; 2:33-39
173. Zottola, E. A. and Lorraine, B. S. (1990) The microbiology of foodborne disease outbreaks: an update. *Journal of food safety*; 11:13-29

## Anexos

### Anexo 1 Medios de Cultivo

#### Agar-rojo- violeta-bilis-lactosa (RVBA)

##### Fórmula

Ingredientes	Cantidad
Peptona	7,0 g
Extracto de levadura	3,0 g
Lactosa	10,0 g
Sales biliares	1,5 g
Cloruro de sodio	5,0 g
Rojo neutro	0,03 g
Cristal violeta	0,002 g
Agar	15,0 g
Agua	1,0 l

Preparación: Mezclar los componentes en el agua y dejar reposar durante algunos minutos. Mezclar perfectamente y ajustar el pH a 7,4 con ácido clorhídrico 0,1N o con hidróxido de sodio 0,1N a 25°C, de forma que después del calentamiento se mantenga en este valor. Calentar con agitación constante y hervir durante 2 minutos. Enfriar inmediatamente el medio en un baño de agua hasta que llegue a 45°C. Evitar el sobrecalentamiento del medio. No debe esterilizarse en autoclave. Usar el medio dentro de las tres primeras horas después de su preparación.

#### Medio de Baird-Parker

##### Fórmula

Ingredientes	Cantidad
Medio base	95,0 ml
Solución de telurito de potasio	1,0 ml
Emulsión de yema de huevo	5,0 ml

Preparación: Cuando el medio base esté a 45°C, agregar los demás ingredientes y mezclar. Colocar de 15 a 20 ml del medio completo, enfriar y dejar solidificar. Las placas pueden almacenarse por 48 h a temperatura de 0 a 5°C.

#### Medio base de Baird-Parker

#### Fórmula

Ingredientes	Cantidad
Triptona	10,0 g
Extracto de levadura	1,0 g
Extracto de carne	5,0 g
Glicina	12,0 g
Cloruro de litio	5,0 g
Piruvato de sodio	10,0 g
Agar	20,0 g
Agua	1,0 l

Preparación: Disolver los ingredientes o el agar base en agua y calentar con agitación constante y hervir durante 1 min. Esterilizar a  $121^{\circ}\text{C} \pm 1$  durante 15 min. Enfriar y mantener el medio a  $45^{\circ}\text{C}$ .

#### **Caldo de infusión cerebro-corazón (BHI)**

##### Fórmula

Ingredientes	Cantidad
Infusión de cerebro de ternera	200,0 ml
Infusión de corazón de res	250,0 ml
Peptona de gelatina	10,0 g
Cloruro de sodio	5,0 g
Fosfato disódico dodecahidratado	2,5 g
Glucosa	2,0 g
Agua	1,0 l

Preparación: Disolver los ingredientes en agua y calentar ligeramente si es necesario. Distribuir y esterilizar durante 15 min a  $121^{\circ}\text{C} \pm 1$ .

#### **Agua de peptona tamponada**

##### Fórmula

Ingredientes	Cantidad
Peptona	10,0 g
Cloruro sódico	5,0 g
Fosfato sódico dibásico	3,5 g

Fosfato potásico monobásico	1,5 g
Agua	1,0 l

Preparación: Disolver los componentes en agua, calentando si es necesario. Ajustar el pH, si es necesario, después de la esterilización a 7,0. Distribuir en recipientes de vidrio esterilizables con la capacidad necesaria para obtener las porciones necesarias para la prueba. Esterilizar por 20 min a 121°C ±1

### **Caldo lactosado**

#### Fórmula

Ingredientes	Cantidad
Extracto de carne	3,0 g
Peptona	5,0 g
Lactosa	5,0 g
Agua destilada	1,0 l

pH final: 6,9 ± 0,2

Preparación: Disolver los ingredientes en agua, calentando a 6°C. Distribuir en porciones de 225 ml, en frascos de 500 ml. Esterilizar durante 15 min a 121°C ±1

### **Caldo selenito-cistina**

#### Fórmula

Ingredientes	Cantidad
Triptona o polipeptona	5,00 g
Lactosa	4,00 g
Fosfato disódico	10,00 g
Selenito ácido de sodio	4,00 g
L-cistina	0,01 g
Agua destilada	1,00 l

pH final: 7,0 ± 0,2 a 25°C

Preparación: Disolver los ingredientes en un litro de agua destilada estéril y distribuir en volúmenes de 10 y 225 ml en recipientes estériles, según se requiera. El caldo así preparado es transparente. De preferencia usarlo el mismo día de su preparación. Si se desea conservar el medio por varios días, puede exponerse al calor en autoclave por 5 min a 110°C, tomando entonces un color salmón

### **Caldo tetracionato**

#### Fórmula

Ingredientes	Cantidad
Proteosa peptona o triptona	5,0 g
Sales biliares	1,0 g
Carbonato de calcio	10,0 g
Tiosulfato de sodio pentahidratado	30,0 g
Agua destilada	1,0 l

pH final:  $7,0 \pm 0,1$

Preparación: Disolver los ingredientes en un litro de agua destilada estéril. Distribuir, agitando constantemente, en porciones de 10 y 225 ml, en recipientes estériles. Guardar en refrigeración. Antes de usar el medio, agregar 2 ml de una solución yodo-yoduro y 1 ml de solución de verde brillante al 0,1% por cada 100 ml de caldo. El medio una vez adicionado de yodo no debe calentarse y debe usarse el mismo día de su preparación.

### **Caldo de soya tripticasa**

#### Fórmula

Ingredientes	Cantidad
Tripticasa o triptosa	17,0 g
Fitona	3,0 g
Glucosa	2,5 g
Cloruro de sodio	2,5 g
Agua destilada	1,0 l

pH final:  $7,3 \pm 0,2$

Preparación. Disolver los ingredientes en 1 litro de agua destilada, calentando lentamente hasta su disolución completa. Distribuir porciones de 225 ml dentro de matraces de 500 ml y esterilizar en autoclave durante 15 min a  $121^{\circ}\text{C} \pm 1$

### **Leche descremada reconstituida**

Suspender 100 g de leche descremada en polvo en un litro de agua destilada. Agitar circularmente hasta disolución. Distribuir en volúmenes de 225 ml en

matraces Erlenmeyer de 500 ml. Esterilizar a  $121^{\circ}\text{C} \pm 1$  por 15 min. El volumen final debe corregirse para mantener 225 ml.

### **Caldo soya tripticasa estéril adicionado con sulfito de potasio**

Adicionar al caldo soya tripticasa 5 g de sulfito de potasio por cada 1000 ml de medio, quedando una concentración final de sulfito de potasio del 0,5%. Adicionar el sulfito de potasio antes de esterilizar en autoclave en la forma habitual.

### **Agar verde brillante (VB)**

#### Fórmula

Ingredientes	Cantidad
Extracto de levadura	3,0000 g
Polipeptona (Proteosa peptona No. 3)	10,0000 g
Cloruro de sodio	5,0000 g
Lactosa	10,0000 g
Sacarosa	10,0000 g
Rojo de fenol	0,0800 g
Agar	20,0000 g
Verde brillante	0,0125 g
Agua destilada	1,0000 l

pH final:  $6,9 \pm 0,2$

Preparación: Suspender los ingredientes en un litro de agua destilada y calentar a ebullición, hasta disolución completa. Ajustar el pH. Esterilizar en autoclave por 15 min a  $121^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ . El sobrecalentamiento del medio disminuye su selectividad. Enfriar el medio a  $50^{\circ}\text{C}$  y distribuirlo en cajas de petri estériles. El aspecto del medio es obscuro, de color marrón.

### **Agar con sulfito de bismuto**

#### Fórmula

Ingredientes	Cantidades	Unidades
Extracto de carne de res	5,000	g
Mezcla de peptonas	10,000	g
Glucosa	5,000	g

Fosfato disódico (anhidro)	5,000 g
Sulfato ferroso (anhidro)	0,300 g
Sulfito de bismuto	8,000 g
Verde brillante	0,025 g
Agar	20,000 g
Agua destilada	1,000 l

pH final:  $7,6 \pm 0,2$

Preparación: Suspender los ingredientes en un litro de agua. Calentar hasta su disolución completa, agitando frecuentemente. Ajustar el pH. Enfriar a 45°C y verter en cajas de petri estériles, distribuyendo de manera homogénea el precipitado propio del medio. El aspecto de las placas es opaco, de color verde pálido y deben usarse el mismo día de su preparación. Si la coloración es parda, no deben utilizarse. El medio no debe esterilizarse en autoclave; el sobrecalentamiento afecta su selectividad.

### **Agar xilosa lisina desoxicolato (XLD)**

Fórmula

Ingredientes	Cantidad
Xilosa	3,75 g
L-lisina	5,00 g
Lactosa	7,50 g
Sacarosa	7,50 g
Cloruro de sodio	5,00 g
Extracto de levadura	3,00 g
R rojo de fenol	0,08 g
Agar	15,00 g
Desoxicolato de sodio	2,50 g
Citrato férrico-amónico	0,80 g
Tiosulfato de sodio	6,80 g
Agua destilada	1,00 l

pH final:  $6,9 \pm 0,2$

Preparación. Suspender los ingredientes en un litro de agua destilada, y calentar en baño de agua a 55°C, agitando frecuentemente, hasta disolución completa. Ajustar el pH. Enfriar a 50°C y verter en cajas de petri estériles. No se esterilice. El sobrecalentamiento produce una precipitación; la reactividad del medio puede ser satisfactoria, pero las colonias suelen ser muy pequeñas. El aspecto del medio es claro y de color rojo brillante.

### **Agar para Salmonella y Shigella (SS)**

#### Fórmula

Ingredientes	Cantidad
Extracto de carne	5,000 g
Polipeptona *	5,000 g
Lactosa	10,000 g
Sales biliares	8,500 g
Citrato de sodio dihidratado	8,500 g
Tiosulfato de sodio pentahidratado	8,500 g
Citrato férrico	1,000 g
Agar	13,500 g
Rojo neutro	0,025 g
Verde brillante	0,330 mg
Agua destilada	1,000 l

pH final: 7,0± 0,2

Preparación: Suspender los ingredientes en un litro de agua destilada estéril y calentar a ebullición hasta disolución completa. Ajustar el pH. No esterilizar en autoclave. Enfriar a 50°C y distribuir en cajas de petri estériles en condiciones asépticas. El aspecto del medio fundido es claro y de color rosado

### **Agar entérico Hektoen**

#### Fórmula

Ingredientes	Cantidad
Proteosa peptona	12,000 g
Extracto de levadura	3,000 g
Lactosa	12,000 g

Sacarosa	12,000 g
Salicina	2,000 g
Sales biliares	9,000 g
Cloruro de sodio	5,000 g
Tiosulfato de sodio	5,000 g
Citrato amónico férrico	1,500 g
Azul de bromotimol	0,064 g
Fuscina ácida	0,100 g
Agar	13,500 g
Agua	1,000 l

pH final: 7,5 ± 0,2

Preparación: Suspender los ingredientes en agua destilada, hervir con agitación hasta completa disolución del agar. No sobrecalentar. Dejar enfriar a 55-60°C y distribuir en cajas de petri estériles en condiciones asépticas.

### **Agar de tres azúcares y hierro (TSI)**

Fórmula

Ingredientes	Cantidad
Peptona de carne *	1,0 g
Peptona de caseína *	1,0 g
Cloruro de sodio	0,5 g
Lactosa	1,0 g
Sacarosa	1,0 g
Glucosa	0,1 g
Agar	1,3 g
Rojo de fenol	2,5 mg
Sulfato ferroso amónico pentahidratado	20,0 mg
Tiosulfato de sodio	20,0 mg
Agua destilada	100,0 ml

pH final: 7,3 ± 0,2

Preparación

Suspender los ingredientes en 100 ml de agua destilada. Calentar a ebullición, agitando ocasionalmente, hasta disolución completa. Enfriar a 60°C y ajustar el pH. Distribuir en volúmenes de 3 ml en tubos de 13 x 100 mm y esterilizar a 121°C durante 15 min. Inclinar los tubos de manera que el medio de cultivo en el fondo alcance una altura de 3 cm y una profundidad de 4 cm. El medio es de color rojo.

### **Agar de hierro y lisina (LIA)**

#### Fórmula

Ingredientes	Cantidad
Peptona de gelatina	0,5 g
Extracto de levadura	0,3 g
Glucosa	0,1 g
L-lisina	1,0 g
Citrato férrico-amónico	50,0 mg
Tiosulfato de sodio anhidro	4,0 mg
Púrpura de bromocresol	2,0 mg
Agar	1,5 g
Agua destilada	100,0 ml

pH final: 6,7 ± 0,2

Preparación: Suspender los ingredientes en el agua destilada y mezclar bien, calentar hasta ebullición con agitación frecuente hasta conseguir la disolución completa. Ajustar el pH. Distribuir en volúmenes de 3 ml en tubos de 13 x 100 mm, con tapón de rosca. Esterilizar en autoclave a 121°C ±1°C durante 12 min. Dejar que los tubos se enfríen en posición inclinada, de tal modo que se obtengan columnas de medio de 4 cm y una superficie inclinada de 2 cm. El medio ya preparado es de color púrpura

### **Agar nutritivo**

#### Fórmula

Ingredientes	Cantidad
Extracto de carne	3,0 g
Peptona	5,0 g
Agar	15,0 g

Agua destilada 1,0 l

pH final:  $6,8 \pm 0,2$

Preparación: Suspender los ingredientes en agua. Dejar reposar de 5 a 10 min. Calentar a ebullición hasta disolución completa. Distribuir en tubos de 13 x 100 mm, en cantidades de 1/3 de su volumen. Esterilizar a  $121^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  por 15 min. Inclinar los tubos antes que el agar solidifique.

### **Medio de SIM (para Sulfuro, Indol y Movilidad)**

#### Fórmula

Ingredientes	Cantidad
Extracto de carne	3,000 g
Peptona	30,000 g
Hierro peptonizado	0,200 g
Tiosulfato de sodio	0,025 g
Agua destilada	1,000 l

pH final:  $7,3 \pm 0,2$

Preparación: Suspender los ingredientes en el agua destilada, calentar a ebullición agitando frecuentemente hasta lograr una disolución completa. Enfriar a  $50^{\circ}\text{C}$  y ajustar el pH. Distribuir el medio en volúmenes de 3 ml en tubos de 13 x 100 mm y esterilizar en autoclave a  $121^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  durante 15 min. Se dejan enfriar los tubos en posición vertical.

### **Agar citrato de Simmons**

#### Fórmula

Ingredientes	Cantidad
Fosfato de amonio	1,00 g
Fosfato dipotásico	1,00 g
Cloruro de sodio	5,00 g
Citrato de sodio	2,00 g
Sulfato de magnesio	0,20 g
Azul de bromotimol	0,08 g
Agar	15,00 g
Agua destilada	1,00 l

pH final:  $6,8 \pm 0,2$

Preparación: Suspender los ingredientes en el agua destilada, calentar a ebullición agitando frecuentemente hasta lograr una disolución completa. Ajustar el pH. Distribuir el medio en volúmenes de 3 ml en tubos de 13 x 100 mm y esterilizar en autoclave a  $121 \pm 1^\circ\text{C}$  durante 15 min. Dejar enfriar los tubos en posición inclinada.

### **Caldo MR-VP (Rojo de metilo-Voges Proskauer)**

#### Fórmula

Ingredientes	Cantidad
Peptona	7,0 g
Dextrosa	5,0 g
Difosfato de potasio	5,0 g
Agua destilada	1,0 l

pH final:  $6,9 \pm 0,2$

Preparación: Suspender 26 g del medio deshidratado en un litro de agua, mezclar y ajustar el pH. Distribuir en volúmenes de 2 a 3 ml en tubos de 13 x 100 mm. Esterilizar a  $121 \pm 1^\circ\text{C}$  durante 15 min.

### **Caldo malonato**

#### Fórmula

Ingredientes	Cantidad
Extracto de levadura	1,000 g
Sulfato de amonio	2,000 g
Fosfato dipotásico	0,600 g
Fosfato monopotásico	0,400 g
Cloruro de sodio	2,000 g
Malonato	3,000 g
Glucosa	0,250 g
Azul de bromotimol	0,025 g
Agua	1,000 l

pH final:  $6,7 \pm 0,2$

Preparación: Suspender los ingredientes en agua, mezclar y ajustar el pH. Distribuir en tubos de 13 x 100 mm en cantidades de 3 ml. Esterilizar en autoclave a  $121 \pm 1^\circ\text{C}$  durante 15 min.

### **Caldo urea**

#### Fórmula

Ingredientes	Cantidad
Urea	20,00 g
Extracto de levadura	0,10 g
Fosfato monopotásico	9,10 g
Fosfato disódico	9,50 g
Rojo de fenol	0,01 g
Agua	1,00 l

pH final:  $6,8 \pm 0,2$

Preparación: Disolver los ingredientes en agua destilada. NO CALENTAR. Esterilizar por filtración a través de membrana  $0,45 \mu\text{m}$  o en autoclave de 5 a 8 lb de presión durante 15 min. Distribuir asépticamente de 1,5 a 3 ml en tubos estériles de 13 x 100 mm.

### **Caldo de urea rápido**

#### Fórmula

Ingredientes	Cantidad
Urea	20,000 g
Extracto de levadura	0,100 g
Fosfato monopotásico	0,091 g
Fosfato disódico	0,095 g
Rojo de fenol	0,010 g
Agua	1,000 l

pH final:  $6,8 \pm 0,2$

Preparación: Disolver los ingredientes en agua destilada. NO CALENTAR. Esterilizar por filtración a través de membrana  $0,45 \mu\text{m}$ . Distribuir asépticamente de 1,5 a 3 ml en tubos estériles de 13 x 100 mm.

### **Medio MRS**

Formula	
Ingredientes	Cantidad
Acetato de sodio	5.0 g
Agar	12.0 g
Citrato de amonio	2.0 g
Dextrosa	20.0 g
Extracto de carne	10.0 g
Extracto de levadura	5.0 g
Fosfato disódico	2.0 g
Peptona proteasa no.3	10.0 g
Polisorbato (Tween 80)	1.0 g
Sulfato de magnesio	0.1 g
Sulfato de manganeso	0.05 g
Agua	1.0 l

pH  $6.5 \pm 0.2$

Preparación: Rehidratar 67 g del medio en un litro de agua destilada. Reposar 10 a 15 minutos. Calentar agitando frecuentemente hasta el punto de ebullición durante 1 minuto para disolverlo por completo. Esterilizar en autoclave a 121°C (15 lbs de presión) durante 15 minutos. Enfriar aproximadamente a 45°C. Vaciar en cajas de Petri estériles. Conservar en refrigeración de 2° a 8°C.

### **Agar APT**

Fórmula	
Ingredientes	Cantidad
Agar	15.0 g
Glucosa	10.0 g
Cloruro de manganeso	0.14 g
Polisorbato 80	0.2 g
Cloruro de sodio	5.0 g
Sulfato ferroso	0.04 g
Citrato de sodio	5.0 g

Sulfato de magnesio	0.8 g
Extracto de levadura	7.5 g
Tiamina-HCl	0.001 g
Fosfato dipotásico	5.0 g
Triptona	12.5 g
Agua	1.0 l

pH  $6.7 \pm 0.2$

Preparación: Rehidratar 61.2 g del medio en un litro de agua destilada. Reposar 10 a 15 minutos. Calentar agitando frecuentemente hasta el punto de ebullición durante 1 minuto para disolverlo por completo. Esterilizar en autoclave a 121°C (15 lbs de presión) durante 15 minutos. NO SOBREESTERILIZAR. Enfriar aproximadamente a 45° C antes de utilizarlo.

## **Anexo 2 Soluciones, reactivos y materiales**

### **Solución de hidróxido de sodio 1,0 N**

#### Fórmula

Ingredientes	Cantidad
Hidróxido de sodio	4,0 g
Agua	100,0 ml

Preparación: Disolver el hidróxido de sodio y llevar a 100 ml con agua.

### **Agua peptonada**

#### Fórmula

Ingredientes	Cantidad
Peptona	1,0 g
Cloruro de sodio	8,5 g
Agua	1,0 l

Preparación: Disolver los componentes en un litro de agua. Ajustar el pH a  $7 \pm 0,1$  con hidróxido de sodio 1,0 N. Distribuir en porciones de 99, 90 y 9 ml o en cualquier volumen múltiplo de nueve según se requiera. Esterilizar a  $121 \pm 1,0^{\circ}\text{C}$  durante 15 minutos. Después de la esterilización, el pH y los volúmenes finales de la solución de trabajo deberán ser iguales a los iniciales. Si este diluyente no es usado inmediatamente, almacenar en lugar oscuro a una temperatura entre 0 a  $5^{\circ}\text{C}$  por un tiempo no mayor de un mes, en condiciones tales que no alteren su volumen o composición.

### **Solución de telurito**

#### Fórmula

Ingredientes	Cantidad
Telurito de potasio	1,0 g
Agua	100,0 ml

Preparación: Disolver el telurito de potasio en agua y esterilizar. La solución puede ser almacenada por varios meses a temperatura de 0 a  $5^{\circ}\text{C}$ .

### Emulsión de yema de huevo

Preparación: Lavar con agua y jabón los huevos frescos que sean necesarios y limpiarlos con una solución de tintura de yodo (solución alcohólica al 2%) o sumergirlos en solución de cloruro mercúrico (1:1000). Enjuagar con agua estéril y secar con gasa estéril. En campana de flujo laminar o en condiciones asépticas, abrir los huevos y vaciarlos en un separador de claras estéril. Transferir las yemas a una probeta hasta un volumen de 60 ml y completar a 90 ml con solución salina isotónica. Verter la emulsión a un matraz Erlenmeyer con perlas de vidrio estéril y agitar fuertemente para formar la emulsión. Filtrar a través de gasa. Las placas deben utilizarse dentro de las 48 h siguientes a su preparación.

### Solución salina isotónica

#### Fórmula

Ingredientes	Cantidad
Cloruro de sodio	0,85 g
Agua	100,0 ml

#### Preparación

Disolver el ingrediente en agua y esterilizar a 121°C ±1 durante 15 min.

### Acido desoxirribonucleico helicoidal de timo de ternera.

#### Fórmula

Ingredientes	Cantidad
Acido desoxirribonucleico helicoidal de timo de ternera o equivalente	0,03 g
Agar	1,00 g
Cloruro de calcio anhidro (Solución 0,01 M)	0,10 ml
Cloruro de sodio	1,00 g
Azul de toluidina (Solución 0,1 M)	0,30 ml
Tris-(hidroximetil-aminometano) (Tris solución 0,05 M, pH 9)	100,00 ml

Preparación: Disolver los ingredientes, excepto el azul de toluidina agitando hasta completar la disolución del ácido desoxirribonucleico y calentar a ebullición. Agregar el azul de toluidina. Distribuir en frascos pequeños con tapón de hule. No es necesario esterilizar. Este medio es estable a temperatura ambiente hasta 4 meses y funciona perfectamente aun después de fundirlo varias veces. Tomar un

porta objetos limpio y agregar 3 ml del medio fundido esparciéndolo por la superficie. Cuando el agar solidifique, hacer orificios con la punta de una pipeta Pasteur. Conservar en refrigeración para evitar la deshidratación.

#### **Solución de cloruro de calcio anhidro 0,01 M**

Cloruro de calcio PM = 110,99

Disolver 0,1199 g de cloruro de calcio en 100 ml de agua.

#### **Solución de azul de toluidina 0,1 M**

Disolver 3,05 g de azul de toluidina en 100 ml de agua.

#### **Solución amortiguadora 0,05 M Tris-(hidroximetilaminometano)**

(Tris pH 9) PM = 121,1

Disolver 6,055 g de Tris en 100 ml de agua.

#### **Plasma de conejo**

Emplear plasma de conejo deshidratado o rehidratado siguiendo las instrucciones del fabricante y agregar ácido etilendiaminotetracético (EDTA) en solución al 0,1% en plasma rehidratado. Si se utiliza plasma deshidratado diluir con agua estéril en proporción de 1:3. Puede emplearse plasma de conejo liofilizado adicionado de EDTA. No debe emplearse sangre citratada.

#### **Vassiliadis-Rappaport**

Fórmula

##### **Solución A**

Ingredientes	Cantidad
Triptona	5,0 g
Cloruro de sodio	8,0 g
Fosfato de potasio dihidrogenado	1,6 g
Agua destilada	1,0 l

Disolver los componentes en agua por calentamiento cercano a 70°C.

##### **Solución B**

Ingredientes	Cantidad
Cloruro de magnesio hexahidratado	400,0 g
Agua destilada	1,0 l

Disolver el cloruro de magnesio en agua. Como esta sal es muy higroscópica es conveniente disolver el contenido entero de cloruro de magnesio desde un recipiente recientemente abierto de tal modo que la concentración de la solución sea de 0,4 g/ml. Conservar en frasco ámbar a temperatura ambiente.

### **Solución C**

Ingredientes	Cantidad
Oxalato de verde de malaquita	0,4 g
Agua destilada	100,0 ml

Disolver el oxalato de verde de malaquita en agua. Conservar en frasco ámbar a temperatura ambiente.

### **Solución verde brillante al 0,1% (1:1000)**

#### Fórmula

Ingredientes	Cantidad
Verde brillante	0,1 g
Agua destilada estéril	100,0 ml

Disolver 0,1 g de verde brillante en agua destilada estéril hasta completar 100 ml.

### **Solución de yodo-yoduro**

#### Fórmula

Ingredientes	Cantidad
Cristales de yodo	6,0 g
Yoduro de potasio	6,0 g
Agua destilada	100,0 ml

Disolver los cristales y el yoduro de potasio en agua destilada hasta completar 100 ml. Conservar en frasco ámbar.

### **Solución salina al 0,85%**

#### Fórmula

Ingredientes	Cantidad
Cloruro de sodio	0,85 g
Agua destilada	100,00 ml

Disolver el cloruro de sodio en el agua y esterilizar a  $121 \pm 1^\circ\text{C}$  durante 15 min

### **Solución salina formalizada**

#### Fórmula

Ingredientes	Cantidad
Solución de formaldehído (36-38%)	6,0 ml
Cloruro de sodio	8,5 g
Agua destilada	1,0 l

Disolver 8,5 g de cloruro de sodio en 1 litro de agua destilada. Esterilizar a  $121 \pm 1^\circ\text{C}$  durante 15 min. Enfriar a temperatura ambiente. Adicionar 6 ml de la solución de formaldehído. No esterilizar después de la adición de formaldehído.

### **Reactivo de Kovac**

#### Fórmula

Ingredientes	Cantidad
p-dimetil-aminobenzaldehído	5,0 g
Alcohol amílico	75,0 ml
Acido clorhídrico concentrado	25,0 ml

Disolver el p-dimetil-aminobenzaldehído en el alcohol amílico y después agregar el ácido clorhídrico lentamente. Conservar en frasco ámbar en refrigeración.

### **Solución de alfa-naftol al 5%**

#### Fórmula

Ingredientes	Cantidad
Alfa-naftol	5,0 g
Alcohol	100,0 ml

Disolver 5 g de alfa-naftol en alcohol hasta completar 100 ml.

### **Solución de rojo de metilo**

#### Fórmula

Ingredientes	Cantidad
Rojo de metilo	0,10 g
Alcohol etílico	300,00 ml
Agua destilada c.b.p.	500,00 ml

Disolver el rojo de metilo en el alcohol etílico y adicionar agua hasta completar 500 ml.

### **Solución de hidróxido de potasio al 40%**

Fórmula

Ingredientes	Cantidad
Hidróxido de potasio	40,0 g
Agua destilada	100,0 ml

Disolver 40 g de hidróxido de potasio en agua hasta completar 100 ml.

### **Solución de gelatinasa al 5%**

Fórmula

Ingredientes	Cantidad
Gelatinasa	5,0 g
Agua	100,0 ml

Disolver 5 g de gelatinasa en 100 ml de agua destilada. NO CALENTAR.

### **Violeta cristal de Gram**

Solución A

Ingredientes	Cantidad
Violeta cristal	2.0 g
Etanol (95%)	20.0 ml

Disuelva el violeta cristal en el etanol

Solución B

Ingredientes	Cantidad
Oxalato amónico, Q.P.	0.8 g
Agua destilada	80.0 ml

Disuelva el oxalato amónico en el agua destilada

Después de preparar las dos soluciones, vierta una en la otra agitando hasta que se mezclen perfectamente.

### **Yodo Gram**

Ingredientes	Cantidad
Yodo Q.P.	1.0 g

Yoduro de potasio Q.P. 2.0 g  
Agua destilada 300.0 ml

Mezcle, en un mortero, el yodo y el yoduro de potasio y muélalos muy finamente. Añada luego una pequeña cantidad de agua para lavar el material; agregue el resto del agua. Agite bien.

### **Safranina Gram**

Ingredientes	Cantidad
Safranina	0.25 g
Etanol (95%)	10.0 ml
Agua destilada	100.00 ml

Disuelva la safranina en el etanol, mezclando bien. Agregue el agua destilada y vuelva a agitar. Filtre la solución con papel filtro.

### **Acetona-alcohol**

Ingredientes	Cantidad
Etanol (95%)	700.0 ml
Acetona	300.0 ml

Mezcle ambos líquidos

### **Alcohol acidulado**

Ingredientes	Cantidad
Acido Clorhídrico (37%)	30.0 ml
Etanol (95%)	970.0 ml

Disuelva el ácido clorhídrico en el Etanol

### **Antisueros**

Antisuero polivalente somático (O)

Antisuero polivalente flagelar (H)

Antisuero Vi

### **Materiales**

Matraces Erlenmeyer de 100, 500 y 1,000

Termómetro metálico

Ángulos de vidrio

Cucharas, espátulas y pinzas

Tubos de ensaye de 16 x 150 mm y de 20 x 100 mm

Tubos para serología de 10 x 75 mm o de 13 x 100 mm

Pipetas bacteriológicas de 10,0; 5,0; 2,0 y 1,0 ml, graduadas en 0,1 ml y protegidas con tapón de algodón

Pipetas de 1 ml, con graduaciones de 0,01 ml

Cajas de petri estériles de vidrio o desechables

Rejillas para tubos de ensaye

Asa de platino o nicromel de aproximadamente 3 mm de diámetro

Todo el material que tenga contacto con las muestras bajo estudio debe esterilizarse mediante: Horno, durante 2 horas a 170-175°C o autoclave, durante 15 min como mínimo a 121°C ± 1°C

Frascos de vidrio de 250 ml con tapón de rosca.

Kit tinción de gram

Porta pipetas y porta cajas de acero inoxidable

### **Aparatos e instrumentos**

Baño maría con termostato y termómetro

Balanza granataria con sensibilidad de 0,1 g

Mecheros Bunsen o Fisher

Incubadora con termostato que evite variaciones mayores de ± 1,0° C.

Contador de colonias de campo oscuro, con luz adecuada, placa de cristal cuadrículada y lente amplificador.

Registrador mecánico o electrónico.

Microscopio óptico.

Potenciómetro con una escala mínima de 0,1 unidades de pH a 25 °C.

Bureta automática

Refrigerador

Horno para esterilizar que alcance los 180°C

Autoclave con termómetro o manómetro, probado con termómetro de máximas

Mecheros Bunsen o Fisher

Potenciómetro

Estereoscopio

Vortex

Ultracentrifuga

Termociclador

Transluminador

Electroforesis

### **Anexo 3 Abreviaturas**

ABRV: agar bilis rojo violeta  
AC: Antes de Cristo  
ADN: Acido Desoxirribonucleico  
AFLP: Polimorfismos de fragmentos amplificados  
APN: Actidiona-polimixina-nitrato  
AP-PCR, RAPD: Primers al azar de Reacción en cadena de polimerasa, también conocido como amplificación al azar de DNA polimórfico  
ARDRA: Análisis de restricción de DNA ribosomal amplificado  
APT: Purpose Tween Agar  
Aw. Actividad de agua  
B: Bifidobacterium  
BAL: Bacterias ácido lácticas  
BBC: British Broadcasting Corporation  
BM: Baño maría  
BP: Baird Parker  
CDV: Calidad de Vida  
CO<sub>2</sub>: Bióxido de carbono  
CODEX: Codex Alimentarius  
CPS: centipoas  
CSC: Caldo selenito cistina  
CT: Caldo tetrionato  
CTAB: Bromuro de hexadeciltrimetilamonio  
D: Dextrogiro  
DBPC: Control de Placebo, al azar y doble ciego  
DC: Después de Cristo  
DGGE, TGGE: Electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización, Electroforesis en gel con gradiente de temperatura  
DL: respuesta entre varas especies  
EDTA: Ácido etilendiaminotetraacetico  
EFSA: Autoridad Europea de Seguridad de Alimentos

dNTP's: Solución de trifosfato desoxinucleotido  
ERIC: Secuencias intergénica repetitiva de enterobacterias  
EUA: estados Unidos de América  
FAME: Ester metil ácidos grasos  
FAO: Organización para la Agricultura y la Alimentación  
FDA: Asociación Americana de Drogas y Alimentos  
g: gramos  
G+C: Guanina-Citosina  
GMO: Organismos genéticamente modificados  
GRAS: Generalmente clasificado como seguro  
h: horas  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Peróxido de hidrogeno  
H<sub>2</sub>S: Ácido sulfhídrico  
ILSI: Instituto Internacional de Ciencias de la Vida  
L. Lactobacillus  
L: Levogiro  
LIA: Agar hierro lisina  
ml: mililitros  
mm. milímetros  
MRS: Man, Rogosa y Sharpe  
NaCl: Cloruro de sodio  
NMP: Número más probable  
NOM: Norma Oficial Mexicana  
OMS: Organización Mundial de la Salud  
ONU: Organización de las Naciones Unidas  
p/v: Peso/Volumen  
PCR: Reacción en cadena de polimerasa  
PFGE: Electroforesis en gel de campos pulsados  
pH: Potencial de iones hidrogeno  
QPS: Califica presuntivamente de segura  
RAPD: Amplificación al azar de DNA polimórfico

REP-PCR: Reacción en cadena de polimerasa de elementos palindrómico extragénicos repetidos

RISA, ARISA: Análisis de espacio intergénico ribosomal, Análisis automatizado de espacio intergénico ribosomal

rpm: revoluciones por minuto

RNA: Acido Ribonucleico

rRNA: Acido Ribonucleico Ribosomal

S: Streptococcus

SB: Sulfito bismuto

SCAN: Comité Científico de Nutrición Animal

SCFI: Secretaria de Comercio y Fomento Industrial

seg: segundos

spp: especies

subsp: subespecie

Taq Polomerasa: Polimerasa de *Thermus aquaticus*

TE: Tris-Edta

TAE 1X: Buffer Tris-Edta

TAPPCR: Reacción en cadena de polimerasa de triple primers al azar

TGI: Tracto gastrointestinal

TSI: Agar triple azúcar hierro

Tris: Hidroximetil aminometano

UFC: Unidades formadoras de colonias

UPGMA: Método par-grupo sin ponderar con promedios aritméticos

UV: Ultravioleta

VB: Verde brillante

X= Suave

XLD: Xilosa lisina desoxicolato

XX= Ligeramente ácido

XXX= Ácido

XXXX= Muy ácido

µg: Microgramos

μL: microlitro

Eh: Potencial de oxido reducción

\$D: Dólares

%: Por ciento

-: Negativo

+: Positivo

+/-: respuesta entre varias especies

↑: Incremento

°C: Grados Centígrados