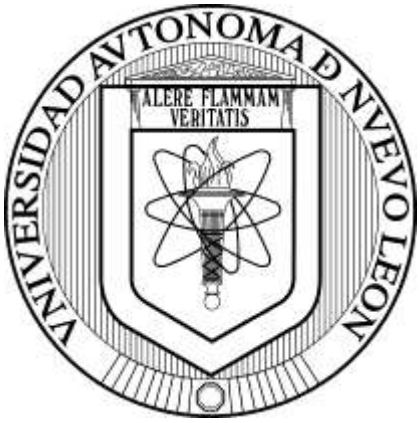
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



QUESO FRESCO COMO VEHÍCULO PARA MICROORGANISMOS PROBIÓTICOS Y SU EFECTO SOBRE EL CRECIMIENTO DE *Salmonella enteritidis* var. Typhimurium

Por

M. C. BLANCA EDELIA GONZÁLEZ MARTÍNEZ

Como requisito parcial para obtener el Grado de

DOCTOR EN CIENCIAS con especialidad en Microbiología

D i c i e m b r e, 2 0 0 5

QUESO FRESCO COMO VEHÍCULO PARA MICROORGANISMOS PROBIÓTICOS Y SU EFECTO SOBRE EL CRECIMIENTO DE *Salmonella enteritidis* var. Typhimurium

Aprobación de la Tesis:

Dra. Marivel Gómez Treviño
Directora de Tesis

Dr. Zacarias Jiménez Salas
Co-director de Tesis

Dra. Norma Laura Heredia Rojas
Secretaria

Dra. Licet Villarreal Treviño
Comisión de Tesis

Dra. Graciela García Díaz
Comisión de Tesis

Dra. Julia Verde Star
Subdirectora de Postgrado

RESUMEN AUTOBIOGRAFICO

Blanca Edelia González Martínez

Candidato para el grado de

Doctor en Ciencias con especialidad en Microbiología

Datos escolares:

Químico Bacteriólogo Parasitólogo por la Universidad Autónoma de Nuevo León en 1984.

Maestría en Ciencias con Especialidad en Alimentos por la misma Universidad en 1999 con Mención Honorífica.

Experiencia Profesional:

Profesor de Tiempo completo de la Facultad de Salud Pública y Nutrición de la Universidad Autónoma de Nuevo León desde 1984 a la fecha y coordinadora del Área de Alimentos desde 1986.

Logros Académicos

Durante los estudios de Doctorado se elaboraron Artículos

- **González-Martínez BE**, Gómez-Treviño M. Probióticos. Revista de Salud Pública y Nutrición. UANL. Vol. 2 No 3, 2001. .www.uanl.mx/publicaciones/respyn

- Alvidres-Morales AA, **González-Martínez BE**, Jiménez-Salas Z, 2002 Tendencias en la Producción de Alimentos. Alimentos Funcionales. Revista de Salud Pública y Nutrición. UANL. Vol. 3 No 3. www.uanl.mx/publicaciones/respyn.

- **González-Martínez BE**, Gómez-Treviño M., Jiménez-Salas Z, 2003, Bacteriocinas de Probióticos. Revista de Salud Pública y Nutrición. UANL. Vol. 4 No 2. www.uanl.mx/publicaciones/respyn.

- **B.E. González-Martínez,** Z. Jiménez-Salas, M. Gómez-Treviño, 2005. Evaluation of Fresh Cheese as Probiotic Carrier Food. Enviados para publicación a Journal of Dairy Science.

- **F. González Rivas, B.E. González-Martínez** 2005. Propiedades mínimas de calidad de los microorganismos probióticos y evidencias sobre efectos hipocolesterolemicos. Aceptado para publicación en Revista de Salud Pública y Nutrición. UANL. www.uanl.mx/publicaciones/respyn.

- **González-Martínez BE**, Jiménez-Salas Z, Juan Francisco Contreras Cordero, Gómez-Treviño M. 2005. Inhibición de S*almonella enteritidis* var. Typhimurium en queso panela con probióticos. Enviados para publicación a Ciencia UANL

- **B.E. González-Martínez,** Z. Jiménez-Salas, M. Gómez-Treviño, 2005. Evaluación de Productos con Probióticos Manuscrito en preparación

Proyectos PAICyT Aprobados

- **Antibiosis de bacterias ácido lácticas y probióticas en alimentos. 2002 Número de proyecto CN 738-02**
- **Inhibición de *Salmonella* spp. por microorganismos probióticos en quesos frescos. 2004. Número de proyecto CN 940-04**
- **Evaluación de las propiedades anticolesterolemicas de cepas de probióticos aislados de productos alimenticios. 2005. Número de proyecto CN1077-05**

Participaciones en congresos Nacionales e internacionales

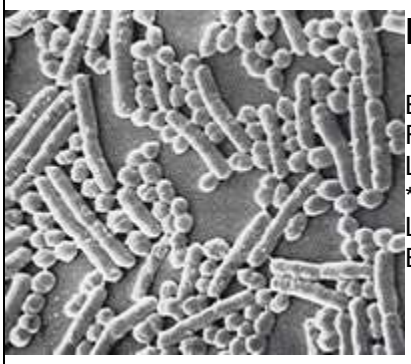
(25 participaciones)

- Congreso Internacional de Inocuidad Alimentaria
- Congreso Latinoamericano de Nutrición
- Simposium Mexicano de Probióticos
- Congreso Nacional de Microbiología
- Asociación de Tecnólogos de México (ATAM)
- Congreso Nacional de Ciencia de los Alimentos
- Congreso Mexicano de Nutriología
- Congreso de Investigación Biomedica
- Congreso de la Asociación de Escuelas y Facultades de Nutrición (AMMFEN)

RESPYN Revista Salud Pública y Nutrición

Vol 2 No.3 Julio-Septiembre 2001

Salus cum propositum vitae



PROBIÓTICOS

Blanca Edelia González-Martínez y Marivel Gómez-Treviño*
Facultad de Salud Pública y Nutrición (Universidad Autónoma de Nuevo León)
*Facultad de Ciencias Biológicas (Universidad Autónoma de Nuevo León)
E-mail: bgozale@ccr.dsi.uanl.mx

Introducción

Los probióticos son microorganismos vivos, que al ser ingeridos en cantidades adecuadas producen efectos benéficos para la salud, además de los efectos de nutrición (1). Estos efectos a la salud, están relacionados con mejoría en enfermedades infecciosas, enfermedades crónicas intestinales como colitis ulcerosa, inmunomodulación, biodisponibilidad de nutrientes, enfermedades cardiovasculares, diabetes mellitus no insulinodependiente, obesidad, osteoporosis y cáncer. Este efecto benéfico de los microorganismos probióticos es debido a que cuando se ingieren en las cantidades adecuadas, ocurre la modificación del ecosistema de los billones de microorganismos que habitan en el intestino, generando un equilibrio que se manifiesta por un estado de salud, en donde existe competencia por los nutrimientos entre los probióticos y los patógenos ingeridos por accidente, así como competencia por los sitios de adherencia, impidiendo la colonización de patógenos, y reforzando los mecanismos de defensa estimulando el sistema inmune. Cuando éstos probióticos son incorporados en alimentos como parte del proceso de elaboración o como aditivos, se generan alimentos funcionales, es decir, aquellos alimentos obtenidos por cualquier procedimiento, con características particulares de alguno de sus componentes, sea o no nutrimento, que afecta de manera positiva o promueve un efecto fisiológico al organismo mas allá de su valor nutritivo tradicional (2).

El uso de probióticos no es nuevo ya que se consumen desde la antigüedad, incluso hace mas de un siglo científicos como Pasteur y Metchnikoff observaron el potencial benéfico de algunas bacterias por su antagonismo con agentes infecciosos (3). Sin embargo, el concepto de microbio como agente perjudicial para la salud es el que ha sido exaltado y se ha minimizado el potencial benéfico de algunas bacterias.

← regresar ↑ subir

Revista de la Facultad de Salud Pública y Nutrición
Ave. Dr. Eduardo Aguirrre Pequeño y Yuriria ,
Col Mitras Centro, Monterrey, N.L. México 64460
Tels. (8)348-4354, 348-6080, 348-6447
mailto:respyn@ccr.dsi.uanl.mx

Universidad Autónoma de Nuevo León
webmaster@uanl.mx

Educación para la vida

RESPYN Revista Salud Pública y Nutrición

Vol 3 No.3 Julio-Septiembre 2002

Salus cum propositum vitae

TENDENCIAS EN LA PRODUCCIÓN DE ALIMENTOS: ALIMENTOS FUNCIONALES

Alicia Alvídrez-Morales, Blanca Edelia González-Martínez, Zacarias Jiménez-Salas.
Facultad de Salud Pública y Nutrición. Universidad Autónoma de Nuevo León (México).
Email: alialviderz@hotmail.com

Introducción

Las tendencias mundiales de la alimentación en los últimos años indican un interés acentuado de los consumidores hacia ciertos alimentos, que además del valor nutritivo aporten beneficios a las funciones fisiológicas del organismo humano. Estas variaciones en los patrones de alimentación generaron una nueva área de desarrollo en las ciencias de los alimentos y de la nutrición que corresponde a la de los alimentos funcionales. Aunque la relación entre la dieta y la salud fue reconocida por la medicina china hacia el año 1,000 a. de C. y con la frase "deja que la alimentación sea tu medicina y que la medicina sea tu alimentación", propuesta por Hipócrates hace casi 2,500 años, actualmente existe una renovada atención en este campo (1). En este trabajo se analizan el concepto actual de alimentos funcionales, se proporcionan algunos ejemplos de los mismos y se proponen las acciones a seguir en este campo.

Origen del concepto de alimento funcional

El término Alimento Funcional fue propuesto por primera vez en Japón en la década de los 80's con la publicación de la reglamentación para los "Alimentos para uso específico de salud" ("Foods for specified health use" o FOSHU) y que se refiere a aquellos alimentos procesados los cuales contienen ingredientes que desempeñan una función específica en las funciones fisiológicas del organismo humano, más allá de su contenido nutrimental. Los alimentos de este tipo son reconocidos porque llevan un sello de aprobación del Ministerio de Salud y Bienestar del gobierno japonés (2). Algunas de las principales funciones son las relacionadas con un óptimo crecimiento y desarrollo, la función del sistema cardiovascular, los antioxidantes, el metabolismo de xenobioticos, el sistema gastrointestinal, entre otros.

← regresar ↑ subir

Revista de la Facultad de Salud Pública y Nutrición
Ave. Dr. Eduardo Aguirrre Pequeño y Yuriria ,
Col Mitras Centro, Monterrey, N.L. México 64460
Tels. (8)348-4354, 348-6080, 348-6447
mailto:respyn@ccr.dsi.uanl.mx

Universidad Autónoma de Nuevo León
webmaster@uanl.mx

Educación para la vida

RESPYN Revista Salud Pública y Nutrición

Vol 4 No.2 Abril-Junio 2003

Salus cum propositum vitae

BACTERIOCINAS DE PROBIÓTICOS

Blanca Edelia González-Martínez[1], Marivel Gómez-Treviño[2], Zacarias Jiménez-Salas[1]

1.Facultad de Salud Pública y Nutrición (Universidad Autónoma de Nuevo León), 2. Facultad de Ciencias Biológicas (Universidad Autónoma de Nuevo León)

E-mail: bedeliagzz@hotmail.com

Introducción

Los probióticos son microorganismos vivos que al ser ingeridos en cantidades adecuadas ejercen una influencia positiva en la salud o en la fisiología del hospedero (1). La forma mas frecuente de consumir probióticos es a través de alimentos lácteos que contienen especies intestinales de lactobacilos y bifidobacterias; por los efectos benéficos adicionales a los nutritivos, estos alimentos se consideran en el grupo de los alimentos funcionales (2).

Una vez que los probióticos son ingeridos ocurren cambios en la microflora intestinal que repercuten positivamente en el estado de salud del consumidor. Es importante resaltar que la flora intestinal es una comunidad interactiva de organismos con funciones especificas para mantener el estado de salud. Esta función es la suma resultante de las diferentes actividades combinadas de los organismos que la conforman como lo son la fermentación de sustratos de la dieta no digeribles y del moco producido por el epitelio con la producción de ácidos grasos de cadena corta (acetato, propionato y butirato) favoreciendo la recuperación y la absorción de calcio, hierro y magnesio, en la regulación del metabolismo de la glucosa reduciendo la glicemia postprandial, así como, la síntesis de la vitamina K y de las del grupo B (3). Algunos beneficios incluyen mejoría en las enfermedades infecciosas, enfermedades crónicas intestinales como colitis ulcerosa, inmunomodulación, biodisponibilidad de nutrientes, enfermedades cardiovasculares, diabetes mellitus no insulinodependiente, obesidad, osteoporosis y cáncer (4, 5, 6). Estos efectos pueden deberse directa o indirectamente a la regulación de la microflora intestinal o de la respuesta inmunológica (7). Entre las bacterias probióticas mas utilizadas para el consumo humano se encuentran las llamadas bacterias ácido lácticas (BAL), que incluyen a las siguientes: *Lactobacillus acidophilus, L. plantarum, L. casei, L. casei* spp *rhamnosus, L. delbrueckii* spp *bulgaricus, L. fermentum, L. reuteri, Lactococcus lactis* spp *lactis, Lactococcus lactis* spp. *cremoris, Bifidobacterium bifidum, B. infantis, B. adolecentis, B. longum, B. breve, y Enterococcus faecalis* (8) .

Revista de la Facultad de Salud Pública y Nutrición
Ave. Dr. Eduardo Aguirrre Pequeño y Yuriria ,
Col Mitras Centro, Monterrey, N.L. México 64460
Tels. (8)348-4354, 348-6080, 348-6447
mailto:respyn@ccr.dsi.uanl.mx

Universidad Autónoma de Nuevo León
webmaster@uanl.mx

Educación para la vida

Interpretative summary

Fresh Cheese as probiotic carrier food

González-Martínez

The efficacy of panela fresh cheese was investigated as a useful system to integrate probiotic microorganisms. A panela cheese of conventional form was made using microbial renin; after removing the serum from the cheese, it was divided into two parts and a probiotic mixture was added to one of the parts. It was shown that fresh cheese is an adequate vehicle to transport probiotics because it permits the survival of them in order to produce beneficial health effects without changing organoleptic properties, product's acceptability and shelf-life.

FRESH CHEESE AS PROBIOTIC CARRIER FOOD

Evaluation of Fresh Cheese as Probiotic Carrier Food

B.E. González-Martínez,[1] Z. Jiménez-Salas,[1] M. Gómez-Treviño[2]

[1]Facultad de Salud Pública y Nutrición, [2]Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León, Ciudad Universitaria 66451, Nuevo León, México

Corresponding Author: Blanca Edelia González-Martínez

Address: Facultad de Salud Pública y Nutrición Dr. Eduardo Aguirre Pequeño y Yuriria S/N CP. 64460 Colonia Mitras Centro Monterrey, Nuevo León; México

Telephone Number: (81) 83 33 99 68

Fax Number: (81) 83 48 43 54

E-mail: bgonzalez@faspyn.uanl.mx

ABSTRACT

The efficacy of panela fresh cheese was investigated as a useful system to integrate probiotic microorganisms, as well as their effect on microbiological quality, shelf-life and product's acceptability. A panela cheese of conventional form was made using microbial renin; after removing the whey from the cheese, it was divided into two parts and a probiotic mixture was added to one of the parts (*Lactobacillus casei rhamnosus, L. Plantarum* and *Bifidobacterium adolescentis*), these were compressed and stored for 3 weeks. It was analyzed probiotic's survival and microbiological quality that included fecal coliforms, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* sp, molds and yeast; moreover, a sensory and shelf-life evaluation was made. The number of probiotics in cheeses was 1.6 x 10^8 cfu/g and they did not show a content decrease during the study. Cheeses made with and without probiotics neither showed *Salmonella sp* nor *Listeria monocytogenes* in any of the repetitions. There was no significant difference between the cheese with probiotics and its control on parameters of microbiological contamination. Adding probiotics does not change attributes of color, texture, flavor, and aroma of cheese and continues the shelf-life with respect to the control. It was shown that panela cheese is an adequate vehicle to transport probiotics because it permits the survival of them in order to produce beneficial health effects without changing organoleptic properties and with the product's acceptability.

Key Words: probiotic, panela cheese, survival, functional food.

Propiedades mínimas de calidad de los microorganismos probióticos y evidencias sobre efectos hipocolesterolémicos.

Fabián González Rivas* y Blanca Edelia González-Martínez*.

* Facultad de Salud Pública y Nutrición, Universidad Autónoma de Nuevo León. (Nuevo León, México).

RESUMEN:

En los últimos años se ha observado un desarrollo muy importante del mercado de los alimentos funcionales que portan microorganismos vivos. Estos productos soy muy interesantes desde el punto de vista económico, ya que en la mayoría de los casos son leches fermentadas, que al contener algún microorganismo adicional, se les puede incrementar el precio dejando un interesante margen al productor. Sin embargo en muchos casos estos nuevos microorganismos no cumplen unos mínimos aspectos de calidad que aseguren su funcionalidad y efectos beneficiosos en el consumidor, por lo que este paga más para obtener lo mismo.

Esta revisión pretende plantear cuales son, según los conocimientos científicos actuales, las pruebas de calidad que estos microorganismos deben superar antes de ser considerados como probióticos y por tanto incluidos en alimentos y publicitados como funcionales. Siempre partiendo de la base que han superado las pruebas previas de seguridad, básicamente las de inocuidad.

A su vez en la presente revisión se plantea la funcionalidad de estos microorganismos haciendo hincapié en la reducción del colesterol plasmático.

Palabras clave: Probióticos, pruebas de calidad, colesterol.

ABSTRACT:

Functional food with live microorganisms market has been developed a lot in the last few years. These products have a great economical importance for food industry in order to leave a big profit rate that traditional fermented milk doesn't do. However in most cases these microorganisms not acquire minimum quality standards that guarantee its functionality and heath benefits for consumers. In other words, consumers are paying more for the same product.

This is a review of the quality probes, in order to the present scientific knowledge, that a microorganism need to excel before they can be named "Probiotic", introduced in foods and advertising as functional. In all cases safety probes must be taken before and this review do not study safety rules.

Moreover this paper learns about of probiotics capability for reduce plasmatic cholesterol.

Key words: Probiotics, quality probes, cholesterol

CAPITULO 1
INTRODUCCIÓN

En los últimos años, ha aumentado la demanda de los consumidores por alimentos que, además de su valor nutricional, otorguen beneficios adicionales a la salud, lo que origina la industria de los alimentos funcionales. Dentro de este grupo, destacan los alimentos con probióticos que son microorganismos que al ser ingeridos en cantidades adecuadas producen efectos benéficos a la salud, además de los efectos en la nutrición. Entre los beneficios a la salud que producen los probióticos se incluyen la mejoría en los problemas de intolerancia a la lactosa, modulación del sistema inmune y reducción del riesgo de aparición de cáncer de colon, entre otros.

El modo de acción de los microorganismos probióticos es muy diverso; algunos tienen la capacidad de producir compuestos con características antimicrobianas, además también compiten con las bacterias entéricas por los sitios de adhesión en el intestino.

En los paises europeos y en Japón, el consumo de probióticos es común desde hace décadas. Entre los alimentos con probióticos que se producen destacan el yogurt, las leches fermentadas, fórmulas infantiles y bebidas a base de jugos, quesos, formulados farmacéuticos, productos cárnicos, entre otras. Sin embargo, en México los probióticos son de ingreso reciente a la industria alimenticia y se consumen principalmente como productos lácteos y bebidas que se elaboran principalmente para el sector infantil, desprotegiendo a los otros sectores de la población.

Estudios recientes han sugerido que los probióticos adicionados a los alimentos pueden tener efectos sobre los microorganismos presentes en los alimentos, disminuyendo el riesgo de que ocurran enfermedades infecciosas a la además de contribuir a controlar los microorganismos deterioradores de

los alimentos e incrementar la vida de anaquel de los productos mediante un proceso de bioconservación.

Por otra parte, cabe señalar la poca investigación que se realiza para conocer la calidad de los productos con probióticos que actualmente se comercializan en el país.

Por lo anterior, se considera una área de oportunidad analizar la calidad de los principales alimentos con probióticos que se comercializan en la actualidad en México, así como elaborar nuevas presentaciones de alimentos probióticos que puedan llegar a impactar a otros sectores de la población, además del infantil.

LUGAR DE TRABAJO

El presente trabajo se realizó en los laboratorios de Bacteriología General y Virología del Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL y en el Laboratorio de Investigación en Nutriología Básica de la Facultad de Salud Pública y Nutrición de la UANL bajo la dirección de la Dra. Marivel Gómez Treviño y la co-dirección del Dr. Zacarías Jiménez Salas.

DEDICATORIA

A mis padres:

Antonio González Elizondo y **Ma. de los Ángeles Martínez de G.** por su amor y sabios consejos.

A mi esposo:

Mauricio Alonso González Villarreal por enseñarme el amor a la vida y el valor de las cosas sencillas.

A mis hijos:

Ana Paulina y Mauricio Antonio; porque fueron el impulso más grande para seguir adelante. Gracias por su amor y paciencia.

AGRADECIMIENTOS

A la **Universidad Autónoma de Nuevo León** por ser el espacio donde las personas pueden trascender al cumplir sus metas.

A la **Facultad de Ciencias Biológicas y la Facultad de Salud Pública y Nutrición** facilidades otorgadas en la realización de éste trabajo.

Al **Consejo Nacional de Tecnología (CONACYT), a la UANL y PROMEP** por las becas otorgadas.

A la **Dra. Marivel Gómez** por la confianza y apoyo necesario para realizar este sueño y sobretodo por su valiosa amistad.

Al **Dr. Zacarías Jiménez Salas** por compartir conmigo durante estos años logros y dificultades.

A la **Dra. Licet Villarreal Treviño** por su apoyo recibido en mi estancia en el Laboratorio de Bacteriología General.

A la **Dra. Norma Laura Heredia Rojas** por sus valiosas observaciones en el desarrollo de la tesis.

A la **Dra. Graciela García Díaz** por compartir sus conocimientos y valiosas aportaciones.

Al **Dr. Roberto Mercado Hernández** por su participación en la estadística de este trabajo.

Al **Dr. Juan Francisco Contreras Cordero** por su amistad y hacerme ver las oportunidades en medio de las dificultades.

Al **QBP. Francisco Saucedo Olivo, Ing. Silvia Osorio, Beatriz Villarreal y Dr. Eduardo Campos Góngora** por su valiosa colaboración en las diferentes etapas del proyecto.

A todos **mis compañeros de clases y laboratorio** por su apoyo y paciencia en estos años.

A mis cercanas colaboradoras, **Corina, Griselda y Consuelo** pasantes de la Licenciatura en Nutrición por su dedicación y amistad.

A mis **padres y hermanas,** por su apoyo, amor incondicional y comprensión.

A mis **amigos, compañeros y todas las personas** que de una u otra forma contribuyeron para hacer éste sueño realidad.

LISTA DE ABREVIATURAS

®	Marca registrada
ANOVA	Análisis de varianza
AST	Agar Soya Tripticasa
ATCC	American Type Culture Colection
B.	Bifidobacterium
cel /ml	Celulas/mililitro
CTAB	Bromuro de N-Cetil-N,N,N-trimetil amonio
DNA	Acidodesoxirribunucleico
DNAzol®	Reactivo para extracción de DNA
dNTPs	
EDTA	Ácido etilen-diamino tetrácetico
F6PPK:	Fructosa 6 fosfato fosfocetolasa
$FeCl_3 6H_2O$	Cloruro férrico hexa hidratado
g	Gramos
g/ml	Gramos/mililitros
HCl	Ácido clorhídrico
KCl	Cloluro de potasio
l	Litro
LMS-FCB- UANL	Lab. de Microbiología Sanitaria, Fac. de Ciencias Biológicas
mg/ml	Miligramos/mililitros
$MgCl_2$	Cloruro de magnesio
Min	Minutos
Ml	Mililitros
mM	Milimolar
Mm	Milimetros
MRS	Man-Rogosa-Sharp
NaCl	Cloruro de sodio
NaF	Floruro de sodio
nm	nanómetro
NMP	Número Más Probable
NMP/g	Número Más Probable/gramos
NOM	Norma
ºC	Grados centígrados
Pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
rpm	Revoluciones por minuto
subsp.	Subespecie
Tris-HCl	Buffer Tris en ácido clorhídrico
UA/ml	Unidades de Actividad por mililitro
UFC/g	Unidad de Formación de Colonias/gramos
UFC/ml	Unidad de Formación de Colonias/mililitros
var.	Variedad
µl	Microlitro

Índice de Contenido

Capítulo	Página
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1. Conceptos	3
2.2. Historia	4
2.3. Características de probióticos	5
2.4. Microorganismos probióticos	6
2.5. Ecología intestinal	7
2.6. Efectos positivos	11
2.6.1. Mejoría del estado nutricio	12
2.6.1.1. Producción de nutrimentos	12
2.6.1.2. Concentración y metabolismo del colesterol	12
2.6.2. Disfunciones intestinales	14
2.6.2.1. Mejoría en problemas de intolerancia a la lactosa	14
2.6.2.2. Estreñimiento	15
2.6.3. Enfermedades gastrointestinales	15
2.6.3.1. Diarrea por rotavirus	15
2.6.3.2. Diarrea asociada por antibióticos	17
2.6.3.3. Infección causada por *Helicobacter pylori*	18
2.6.3.4. Enfermedades gastrointestinales por bacterias	20
2.6.4. Otras infecciones	22
2.6.4.1. Influenza	22
2.6.4.2. Candidiasis	23
2.6.5. Enfermedades de base inmunológica	23
2.6.5.1. Enfermedad inflamatoria y síndrome de intestino irritable	23
2.6.5.2. Alergias	24
2.6.5.3. Artritis reumatoide	25
2.6.6. Actividad antitumoral	25
2.7. Mecanismos de acción de probióticos	27
2.7.1. Efecto barrera y competencia por sitios de adhesión	27
2.7.1.1. Adhesión de microorganismos probióticos	28
2.7.1.2. Inhibición de la adhesión de microorganismos patógenos por probióticos	30
2.7.2. Bacteriocinas y otros compuestos formados	32
2.7.3. Modulación del sistema inmune	37
2.8. Productos con probióticos	40
2.8.1. Leches fermentadas y yogurt	41
2.8.2. Quesos	45
2.8.3. Otros alimentos	47
2.9. Inocuidad de probióticos	48
2.10. Efecto de los probióticos en alimentos	51

2.10.1. Bacteriocinas en alimentos 51
2.10.2. Efecto de los probióticos sobre microorganismos patógenos en alimentos 55
2.11. Hipótesis 61
2.12. Objetivos 61
2.12.1. Objetivo General 61
2.12.2. Objetivos Específicos 61
3. MATERIAL Y MÉTODOS 62
3.1. Estrategia general de análisis 62
3.2. Material biológico, activación y mantenimiento de cepas 63
3.2.1. Productos con probióticos 63
3.2.2. Microorganismos 63
3.2.2.1. Microorganismos patógenos 63
3.2.2.2. Microorganismos probióticos 63
3.3. Evaluación de la calidad de los productos con probióticos 64
3.3.1. Identificación de probióticos 64
3.3.1.1. Aislamiento 65
3.3.1.2. Gram y morfología celular 65
3.3.1.3. Identificación del género *Bifidobacterium* 65
3.3.1.4. Identificación de especies de probióticos 66
3.3.2. Contenido de microorganismos probióticos viables 66
3.3.3. Sobrevivencia de organismos probióticos 67
3.3.4. Calidad microbiológica de los productos con probióticos 67
3.3.4.1. Normatividad vigente 67
3.3.4.2. Normatividad de alimentos 68
3.3.4.3. Técnicas de análisis microbiológicos oficiales 68
3.4. Inhibición de patógenos por microorganismos probióticos 69
3.4.1. Actividad antimicrobiana 69
3.4.2. Cuantificación de la inhibición 70
3.5. Selección de cepas probióticas 71
3.6. Elaboración y evaluación de queso con probióticos 71
3.6.1. Elaboración de queso con probióticos 71
3.6.2. Evaluación de queso con probióticos 72
3.6.2.1. Cuenta de microorganismos probióticos 72
3.6.2.2. Sobrevivencia de microorganismos probióticos 72
3.6.2.3. Calidad microbiológica de queso con probióticos 72
3.6.3. Vida de anaquel de queso con probióticos 73
3.6.4. Evaluación sensorial de queso con probióticos 73
3.6.4.1. Sujetos 73
3.6.4.2. Prueba analítica de diferenciación (Prueba triangular) 74
3.6.4.3. Prueba de nivel de agrado (Hedonista) 74
3.7. Efecto inhibitorio de microorganismos probióticos sobre *Salmonella enteritidis var. Typhimurium* en queso tipo panela 75
3.7.1. Estandarización de la técnica de PCR para la detección de *Salmonella enteritidis var. Typhimurium* con cepas de 76

referencia
3.7.2. Extracción de DNA de cepas de referencia 76
3.7.3. Estandarización de las condiciones de la técnica de PCR 77
3.7.4. Electroforesis en geles de agarosa 77
3.8. Pruebas de especificidad de los iniciadores para el gen inv A 78
3.9. Detección de *Salmonella enteritidis var. Typhimurium* en queso tipo panela 78
3.9.1. Inoculación de *Salmonella enteritidis var. Typhimurium* en queso tipo panela 78
3.9.2. Extracción de DNA a partir de muestras de queso 79
3.9.3. PCR y electroforesis para la detección de *Salmonella enteritidis var. Typhimurium* en queso 80
3.9.4. Límites de detección de *Salmonella* en queso por la técnica de PCR 80
3.9.5. Efecto inhibitorio de microorganismos probióticos sobre *Salmonella enteritidis var. Typhimurium* 80
3.10. Análisis estadístico 81
3.10.1. Evaluación de la calidad de los productos con probióticos 81
3.10.1.1. Cuenta de probióticos 81
3.10.1.2. Calidad microbiológica de productos con probióticos 81
3.10.2. Inhibición de patógenos por microorganismos probióticos. Cuantificación de la inhibición. Unidades de Actividad (UA) 81
3.10.3. Evaluación de quesos con probióticos 82
3.10.3.1. Calidad microbiológica 82
3.10.3.2. Vida de anaquel 82
3.10.3.3. Evaluación sensorial 82
3.10.3.4. Inhibición de *Salmonella* en quesos con probióticos 82
4. RESULTADOS 83
4.1. Evaluación de productos con probióticos 83
4.1.1. Identificación de los microorganismos probióticos 83
4.1.2. Contenido de probióticos 85
4.1.3. Sobrevivencia de probióticos 87
4.1.4. Calidad microbiológica 89
4.2. Acción antagónica *in vitro* de los probióticos contra microorganismos patógenos 92
4.2.1. Actividad antimicrobiana 92
4.2.2. Cuantificación de la inhibición 93
4.3. Selección de las cepas probióticas para elaboración de quesos 100
4.4. Elaboración y evaluación de quesos con probióticos 101
4.4.1. Contenido de probióticos en quesos 101
4.4.2. Sobrevivencia de probióticos en queso fresco 101
4.4.3. Calidad microbiológica 102
4.4.4. Vida de anaquel 103
4.4.5. Evaluación sensorial 103
4.4.5.1. Prueba analítica de diferenciación triangular 103

4.4.5.2. Prueba afectiva hedonista 105
4.5. Efecto inhibitorio de probióticos sobre *Salmonella enteritidis var . Typhimurium* en queso tipo panela 106
4.5.1. Estandarización de la técnica de PCR para la detección de *S. enteritidis var. Typhimurium* con cepas de referencia 106
4.5.2. Pruebas de especificidad 106
4.5.3. Estandarización de PCR en muestras de queso tipo panela 108
4.5.4. Límite de detección de *Salmonella* por PCR 109
4.5.5. Inhibición de *Salmonella* en quesos con probióticos 109
5. DISCUSIÓN 115
5.1. Evaluación de productos con probióticos 115
5.2. Acción antagónica *in vitro* de los probióticos contra microorganismos patógenos. 120
5.3. Elaboración de nuevos productos con probióticos 122
5.4. Efecto inhibitorio de probióticos sobre *Salmonella enteritidis var. Typhimurium* inoculada en quesos frescos tipo panela 125
6. CONCLUSIONES 129
7. REFERENCIAS 131
8. APÉNDICES 165

Índice de Figuras

Figura		Página
1	Estrategia general para obtener un queso fresco con probióticos con un efecto positivo demostrado sobre *Salmonella enteritidis var.* Typhimurium.	62
2	Aspectos a evaluar en los productos con probióticos	64
3	Esquema para demostrar el efecto de los probióticos sobre *S. enteritidis var.* Typhimurium en quesos.	75
4	Contenido de probióticos en bebidas lácteas.	86
5	Contenido de probióticos en leches en polvo para lactantes.	86
6	Contenido de probióticos en suplementos.	87
7	Sobrevivencia de probióticos de bebidas lácteas a temperatura de 4º C.	88
8	Sobrevivencia de microorganismos probióticos de leches en polvo.	88
9	Sobrevivencia de microorganismos probióticos de suplementos	89
10	Comparación de promedios de UA de cultivos probióticos de diferentes orígenes	96
11	Sensibilidad de patógenos a compuestos difusibles de probióticos.	96
12	Sensibilidad de los patógenos a los a compuestos difusibles de los diferentes géneros de probióticos.	97
13	Sensibilidad de los patógenos a los compuestos difusibles de los diferentes de probióticos agrupados por origen	98
14	Promedios de UA de cultivos probióticos que se aislaron de bebidas lácteas.	98
15	Promedios de UA de cultivos probióticos que se aislaron de leches en polvo para lactantes	99
16	Promedios de UA de cultivos probióticos comerciales liofilizados de uso alimentario	99
17	Sobrevivencia de microorganismos probióticos en queso fresco tipo panela mantenido a 4º C	101
18	Resultados de la prueba de diferenciación triangular	104
19	Resultados de la prueba de diferenciación triangular	104
20	Resultados de la prueba afectiva hedónica	105
21	Resultados de la prueba afectiva hedónica	105
22	Pruebas de especificidad de los inciadores para el gen i*nv* A	107
23	Electroforesis de productos de PCR de gen i*nv* A para detección de *Salmonella*	110

24	Frecuencia de detección de *Salmonella* en quesos con y sin probióticos por día a diferentes concentraciones de inóculo	111
25	Frecuencia de detección de *Salmonella* en quesos con y sin probióticos por concentración de inóculo a diferentes días	112
26	Diferencia de detección de *Salmonella* a diferentes días y concentraciones de inóculo.	114

Índice de Tablas

Tabla		Página
1	Información de las etiquetas de productos con probióticos y hallazgos microbiológicos	84
2	Calidad microbiológica de bebidas lácteas	90
3	Calidad microbiológica de leches en polvo para lactantes con probióticos	91
4	Calidad microbiológica de suplementos con probióticos	92
5	Distribución de cepas con actividad antimicrobiana de acuerdo a su origen	93
6	Grado de inhibición de cepas de probióticos aislados de alimentos y suplementos expresado como Unidades de Actividad (UA)	94
7	Grado de inhibición de las cepas probióticas liofilizadas expresado como Unidades de Actividad (UA)	95
8	Resultados de parámetros que se evaluaron para la selección de cepas probióticas	100
9	Contenidos promedio de los microorganismos investigados en los quesos con y sin probióticos en los diferentes días.	102
10	Pruebas de especificidad de los iniciadores para el gen *inv* A	108
11	Límite de detección de *Salmonella* inoculada en queso tipo panela.	109
12	Frecuencia de detección de *Salmonella* en quesos con y sin probióticos a diferentes concentraciones de inóculo	110
13	Prueba de Mann-Whitney de comparación de resultados de la presencia de *Salmonella* en quesos con y sin probióticos por día y concentración.	113
14	Diferencia entre la detección de *Salmonella* en los quesos con y sin probióticos (Queso sin probióticos – Queso con probióticos)	113

RESUMEN

Blanca Edelia González Martínez **Fecha de Graduación: diciembre, 2005**

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Ciencias Biológicas

Título del Estudio: QUESO FRESCO COMO VEHÍCULO PARA MICROORGANISMOS PROBIÓTICOS Y SU EFECTO SOBRE EL CRECIMIENTO DE *Salmonella enteritidis* var. Typhimurium

Número de páginas: 171 **Candidato para el Grado de doctorado en ciencias con especialidad en Microbiología**

Área de estudio: Microbiología

Propósito y método del estudio:

Los probióticos han sido definidos como complementos dietéticos o alimentos que contienen microorganismos viables que afectan benéficamente al huésped a través de diferentes efectos en el tracto intestinal. Entre los efectos benéficos de los probióticos se encuentran la disminución de los niveles de colesterol plasmático, la prevención y el tratamiento de diversas como el estreñimiento y la intolerancia a la lactosa, así como infecciones gastrointestinales causadas por rotavirus y por bacterias enteropatógenas, también tienen efectos benéficos en la diarrea asociada a tratamiento con antibióticos, las enfermedades de base inmunológica y la actividad antitumoral. Una estrategia para que los efectos benéficos de los probióticos lleguen a mayor cantidad de personas es producir más alimentos o presentaciones que los contengan. En la actualidad, los productos que se comercializan están enfocados principalmente a la alimentación de infantes (leches en polvo para lactantes y bebidas lácteas) por lo que es conveniente desarrollar alimentos con probióticos de consumo familiar. En México, el 70% del consumo de quesos corresponde a queso

fresco, sin un proceso de maduración. Este tipo de queso, por su bajo costo de producción representa un producto accesible a la mayoría de las familias, constituyéndose como una de las fuentes principales de consumo de productos lácteos de la población mexicana. Asimismo, es interesante conocer si la adición de los probióticos puede inhibir el crecimiento del patógeno y disminuir el riesgo de gastroenteritis y mejorando la inocuidad del producto, contrastandolo con un queso panela sin probióticos.

Contribuciones y conclusiones:

Los resultados de este estudio demostraron que en el queso fresco tipo panela se alcanzó una concentración de $1.6x10^8$ UFC/g, la cual aumentó hasta de 1.4 $x10^9$ UFC/g durante las tres semanas siguientes. Las evaluaciones sensoriales indican que la adición de los probióticos no altera las propiedades organolépticas del alimento conservando la buena aceptabilidad del mismo, además de alargar la vida de anaquel, por lo que se considera que es un vehículo adecuado para transporte de microorganismos probióticos pues permite la sobrevivencia de probióticos en la cantidad necesaria para producir los efectos benéficos a la salud de los consumidores.

Al analizar la presencia de *Salmonella enteritidis* var. Typhimurium en quesos inoculados con diferentes concentraciones del patógeno, se observó que en los quesos con la adición de probióticos se advierte la presencia del patógeno solo con mayores concentraciones de inóculo; en contraste, se observó una mayor presencia de *Salmonella* en los quesos sin probióticos, Este efecto de inhibición de *Salmonella* fue significativo en el día 2 en las concentraciones de 10, 1 y 0.1 UFC/g. Concluyendo que los probióticos ejercieron una inhibición transitoria en el desarrollo de *Salmonella* en las diferentes concentraciones inoculadas.

Estos resultados muestran un panorama alentador para el uso de los probióticos como estrategia para contribuir al logro de la inocuidad alimentaria, además de los efectos en la salud que ya se han demostrado**.**

Firma del asesor:_____

CAPITULO 2

ANTECEDENTES

2.1. CONCEPTOS

El concepto de probiótico fue acuñado por primera vez en 1965 por Lilly y Stillwel y se utilizó para describir a una sustancia secretada por un microorganismo que estimula el crecimiento de otro como un producto contrario a los antibióticos; este concepto ha evolucionado con el devenir de los años. En 1974, Parker los definió como organismos o substancias que contribuyen al balance microbiano intestinal (Schrezenmeir y Vrese, 2001). En 1989, Fuller modifica el concepto y señala que los probióticos "son complementos dietéticos o alimentos que contienen microorganismos viables que afectan benéficamente al huésped a través de diferentes efectos en el tracto intestinal" (Gibson y Fuller, 2000). Posteriormente en 1992 Havenaar y col. lo definen como "un cultivo, o mezcla de cultivos viables, que aplicados en animales o en el hombre afectan benéficamente al hospedero por mejoría de la flora intestinal" (Klaenhammer, 2000).

En 1994, publicados en forma independiente, surgen los conceptos de Salminen y Schaafsma; mientras que el primero los describe como "cultivo microbiano vivo o cultivos de productos lácteos con una influencia benéfica en la salud y la nutrición del hospedero" el segundo establece que "los probióticos son microorganismos vivos, que al ser ingeridos en cantidades adecuadas producen efectos benéficos para la salud, además de los efectos de nutrición" (Schrezenmeir y Vrese, 2001). Ya que el concepto de Salmienen excluye todos los productos fermentados a base de vegetales, carne y cereales, algunos científicos no lo aprueban.

Como se observa, el término probiótico tiene diversas acepciones, lo que genera que los fabricantes elaboren muy diversos productos con probióticos, indistintamente de los microorganismos que contienen y de la viabilidad de los

mismos, así como de la diversidad de efectos positivos que, aseguran, se producen por el consumo de los mismos.

Los efectos a la salud que han sido reportados incluyen la mejoría en problemas como intolerancia a la lactosa, modulación del sistema inmune, reducción de la severidad de las diarreas causadas por rotavirus y reducción de riesgo de aparición del cáncer de colon. También están relacionados con aumento en la biodisponibilidad de nutrientes, mejoría en enfermedades infecciosas, enfermedades crónicas intestinales como colitis ulcerosa, enfermedades cardiovasculares, diabetes mellitus no insulinodependiente, obesidad, osteoporosis y diversos tipos de cáncer (Roberfroid, 2000).

2.2. HISTORIA

Aunque las bacterias han vivido con el hombre durante siglos, su descubrimiento y estudio es relativamente reciente y se ha enfocado principalmente a unos cuantos microorganismos que son capaces de causar enfermedad y se ha dejado de lado a la gran mayoría de los microorganismos que no se relacionan con ninguna enfermedad. Sin embargo, el uso de microorganismos probióticos no es nuevo ya que se consumen desde la antigüedad, incluso hace mas de un siglo, científicos como Pasteur y Metchnikoff observaron el potencial benéfico de algunas bacterias por su antagonismo con agentes infecciosos (Guarner, 2000a).

Las bacterias ácido lácticas, donde se encuentran los probióticos, están asociadas a habitats ricos en nutrientes tales como varios productos alimentarios y materiales de plantas; también se han encontrado en suelo, agua, estiércol y aguas negras; en humanos se encuentran en la cavidad oral, tracto intestinal y vagina, ecosistemas donde su presencia ha demostrado tener una influencia benéfica. Por las razones anteriores, diversas bacterias ácido lácticas son consideradas como candidatos para su aplicación como probióticos (Holzapfel *et al.,* 2001).

Las bacterias ácido lácticas en alimentos tienen una larga historia en la elaboración de quesos, cárnicos y vegetales fermentados. La mayoría de las cepas ácido lácticas son consideradas como microorganismos iniciadores de fermentaciones sin potencial patógeno. Muchos de los miembros del género *Lactobacillus* son considerados productos GRAS (generalmente reconocidos como seguros) mientras que miembros de los géneros *Streptococcus* y *Enterococcus* contienen patógenos oportunistas (Torres, 2002). Actualmente los probióticos pueden ser administrados a través de yogurt tradicional, otros alimentos fermentados, así como polvos, tabletas, suspensiones líquidas y liofilizados en forma de cápsulas (Gibson y Fuller, 2000) y se encuentran productos con monocepas, multicepas y multiespecies (Timmerman *et al*., 2004).

2.3. CARACTERÍSTICAS DE PROBIÓTICOS

Para ser consideradas como probióticos las bacterias deben de reunir algunas características como son: ser habitante normal del intestino humano, no patógena, no toxigénica, capaz de sobrevivir y metabolizar en el ambiente intestinal y tener la capacidad de ejercer un efecto benéfico en el huésped (Torres, 2002).

Una cepa ideal de probiótico debe sobrevivir durante el paso por el estómago y el intestino, esto es, debe ser estable al ácido y a las sales biliares, tener capacidad de adherirse al tejido epitelial del intestino, esta capacidad de adhesión es considerada como un prerrequisito para la colonización y la estimulación del sistema inmune, además es deseable la capacidad de producir sustancias antimicrobianas que permitan la inhibición del crecimiento y la colonización de microorganismos nocivos (Dunne *et al.,* 2001; Tuomola *et al.,* 2001).

No todas las cepas aisladas de fuentes humanas tienen las características deseables para ser usadas como probióticos. Gómez y col. (1998) encontraron que de 25 cepas aisladas de heces de infantes, las que presentaban buena

adherencia y capacidad inhibitoria no eran resistentes a bilis y a pH bajo, y solo un 25% fueron resistentes a una concentración de 0.5% de bilis.

Otra característica importante a considerar es la estabilidad de las cepas probióticas durante el procesado y el almacén de los productos usados como vehículos, especialmente el aspecto de la viabilidad de los microorganismos (Tuomola *et al.,* 2001). Para lograr esta estabilidad es necesario considerar el estado fisiológico de los probióticos (si los organismos se encuentran en fase logarítmica o estacionaria), las condiciones físicas del producto en el que se adicionan (por ejemplo la temperatura), la composición química del producto donde el probiótico es añadido y la interacción de los probióticos y otros organismos iniciadores. Además, debe asegurarse que en los productos en los que son adicionados los probióticos no desarrollen efectos adversos en aroma y sabor (Heller, 2001).

2.4. MICROORGANISMOS DE PROBIÓTICOS

Los microorganismos usados como probióticos humanos son principalmente del género *Lactobacillus*, del cual, se tienen cientos de reportes de su uso desde hace décadas (Reid, 1999). Actualmente existen microorganismos considerado como probióticos también en los géneros *Bifidobacterium, Lactococcus, Enterococcus, Pediococcus, Leuconostoc* y *Propionibacterium* (Holzapfel *et al.,* 2001). Las especies microbianas probióticas reportadas en el Manual de Bergey como de origen humano son las siguientes: *Lactobacillus acidophilus, L. amylovorus, L. plantarum, L. casei, L. rhamnosus, L. delbrueckii bulgaricus, L. reuteri, L. crispatus, L. gasseri, L. johnsonii, Bifidobacterium bifidum, B. lactis, B. infantis, B. adolescentis, B. longum, B. breve, Enterococcus faecium* y *Leuconostoc mesenteroides* (Scardovi, 1986; Sanders y Klaenhammer, 2001). La mayoría de estos microorganismos pertenecen al grupo de las bacterias ácido lácticas, han sido usadas como probióticos y son aceptadas en la mayoría de los países (Farnworth, 2001). Además, las especies *Lactobacillus fermentum* y *Enterococcus faecalis,* han sido utilizadas como probióticos para animales mientras que *Lactococcus lactis* y *Pediococcus acidilactici* son

microorganismos aislados de alimentos con gran potencial de uso probiótico (Holzapfel *et al.,* 2001).

La inocuidad de los probióticos es una preocupación constante, lo que implica que solo debe permitirse el uso de microorganismos plenamente identificados y aceptados. Se ha observado en modelos gentobióticos murinos que *B. longum* puede pasar a través del intestino y llegar a órganos como hígado, riñón y nódulos linfáticos sin causar daño ni infección; es posible que otras bacterias tengan esa capacidad (Ishibashi y Yamazaki, 2001).

A partir de mayo de 2002 expertos de la FAO y la OMS redactaron nuevas guías para la evaluación de probióticos en alimentos (FAO/WHO, 2002); estas incluyen primeramente una identificación no sólo hasta género, sino hasta conocer la cepa específica, además de estudios *in vitro*, en animales y humanos, así como, estudios de fase dos (controlados, doble ciego, con placebo, aleatorio) y recomiendan estudios fase tres (estudios que comparan el efecto de los probióticos con los tratamientos estándares para las diversas patologías). En la medida que los productores cumplan estas guías se dará mayor confianza y seguridad a los consumidores.

2.5. ECOLOGÍA INTESTINAL

Los microorganismos en el interior del cuerpo humano constituyen un importante ecosistema ya que el hombre alberga unos 100 billones de bacterias de unas 400 especies distintas y de éstas, el 95% vive en el tracto digestivo, especialmente en el colon. En nuestro organismo existen más células bacterianas que humanas, en una proporción de 10:1 (100 billones de bacterias por 10 billones de células humanas) (Guarner y Malagelada, 2002).

El tracto gastrointestinal es un tubo especializado dividido en varias regiones que se extiende desde los labios hasta el ano. En cada una de las porciones intestinales la flora microbiana es diferente en número y tipo de microorganismo, mientras que el estómago e intestino proximal contienen pocos

microorganismos (10^3 a 10^5 UFC/g o ml) en el íleon el contenido es de 10^8 UFC/g o ml y en el colon llega hasta 10^{12} UFC/g o ml (Mackie *et al.,* 1999).

La flora intestinal se encuentra perfectamente adaptada al ser humano desde hace millones de años y el hombre no podría sobrevivir sin ella. En el colon, se encuentra un verdadero ecosistema donde muchas especies distintas participan de ciclos vitales relacionados, o incluso interdependientes. Algunas especies viven de los productos de otras y a su vez la actividad metabólica de unas beneficia la proliferación de terceras. Es importante resaltar que la flora intestinal es una comunidad interactiva de organismos con funciones específicas para mantener el estado de salud (Guarner, 2000b).

Cabe destacar el rol predominante que juegan las bacterias anaerobias que constituyen más del 99% de las bacterias aisladas en heces y que por las dificultades para cultivarlas, aun no han sido bien estudiadas (Mackie *et al.,* 1999).

Algunas de las especies de este complejo ecosistema son consideradas potencialmente dañinas por su capacidad de producir toxinas, invadir la mucosa intestinal y activar la respuesta inflamatoria o su actividad carcinogénica. Estos microorganismos pueden vivir en armonía con el hospedero y solo causan daño cuando la resistencia del huésped se ve disminuida (Salminen *et al.,* 1998).

La flora intestinal tiene su origen durante el nacimiento ya que el tracto intestinal del feto es estéril; los primeros microorganismos que adquieren los recién nacidos son los del tracto genital de la madre por el canal de parto y los del medio ambiente en los bebés nacidos por cesárea. En los neonatos, se encuentran las especies de *Bifidobacterium* y Bacteriodes en una cantidad mayor a 10^9 UFC/g y las especies de Enterobacterias, Enterococos, Propionibacterias, Estreptococos, Eubacterias, Fusobacterias y Veillonella en cantidad de 10^6 a 10^8 UFC/g, y con concentraciones menores a 10^5 UFC/g se encuentran las especies de Lactobacilos, Micrococos, Corynebacterias, Estafilococos, así como Clostridios (Mackie *et al.,* 1999).

Después del nacimiento los seres vivos se exponen continuamente a nuevos microorganismos principalmente a través de los alimentos, en las primeras semanas se incrementa el contenido de Lactobacilos, Eubacterias, Fusobacterias y Clostridos, después de la introducción de alimentos sólidos se incrementan en número y diversidad las bacterias anaerobias estrictas, el patrón de la flora intestinal logrado a los dos años de edad permanece estable hasta la edad adulta (Mackie *et al.,* 1999).

La flora intestinal de los individuos tiene características únicas (Bezkorovainy, 2001). Esta variabilidad entre individuos se produce porque la adquisición de la flora es un evento específico influido por factores externos tales como la carga microbiana del medio ambiente, la composición de los microorganismos de la madre, los alimentos y hábitos alimentarios, y también por factores internos como la fisiología del hospedero, el pH y el potencial de óxido reducción del intestino, las interacciones entre los microorganismos, peristalsis, los ácidos biliares, las secreciones del hospedero, la respuesta inmune etc. (Mackie *et al.,* 1999). Sin embargo, las funciones metabólicas que la flora desarrolla son similares en todos los individuos a pesar de la variabilidad de la misma (Salminen *et al.,* 1998).

Las funciones de la flora del colon son diversas. Destacan la fermentación de sustratos no digeridos y del moco endógeno con la consecuente obtención de energía metabólica y la producción de vitaminas del complejo B y la vitamina K. También es importante la función de protección contra los microorganismos patógenos por el efecto barrera y la modulación del sistema inmune (Guarner, 2000b).

La flora intestinal contribuye a la función metabólica del intestino, ya que en él se presenta la actividad de muchas enzimas que no son del organismo humano. Las diferentes especies de bacterias contienen una variedad de enzimas que corresponden a los diferentes tipos y variedades de metabolismo del intestino (homofermentativo, heterofermentativo, putrefactivo) por lo que, al modificar la

flora por el consumo de probióticos, se generan cambios en los perfiles metabólicos y estos influyen en la salud del huésped y la resistencia a las enfermedades (Bezkorovainy, 2001).

Existen evidencias de que la flora intestinal está íntimamente relacionada con la salud y las enfermedades del huésped. Una flora saludable produce el efecto barrera, modula el sistema inmune, disminuye los procesos inflamatorios del intestino y reduce la actividad metabólica relacionada con la producción de compuestos carcinogénicos (Guarner, 2000b; Bezkorovainy, 2001).

Este efecto benéfico de los microorganismos probióticos es debido a que cuando son ingeridas en las cantidades adecuadas, ocurre la modificación del ecosistema de los billones de microorganismos que habitan en el intestino, que genera un equilibrio que se manifiesta por un estado de salud, en donde existe competencia por los nutrimientos entre los probióticos y los patógenos ingeridos por accidente, así como competencia por los sitios de adherencia, se impide la colonización de patógenos, y refuerza los mecanismos de defensa que estimula el sistema inmune. Cuando éstos probióticos son incorporados en alimentos como parte del proceso de elaboración o como aditivos, se generan alimentos funcionales, es decir, aquellos alimentos que se obtienen por cualquier procedimiento, con características particulares de alguno de sus componentes, sea o no nutrimento, que afecta de manera positiva o promueve un efecto fisiológico al organismo mas allá de su valor nutritivo tradicional (Diplock *et al.,* 1999).

Los probióticos pueden ser una estrategia para mantener la flora intestinal en equilibrio, por ser un excelente mediador de protección por la reducción del riesgo de colonización de microorganismos patógenos a través de mecanismos muy diversos y complejos (Lu y Walker, 2001).

Los probióticos pueden estabilizar la flora intestinal y reforzar las diferentes líneas de defensa inmunológica. Una flora alterada genera una respuesta inflamatoria y ésta a su vez incrementa la permeabilidad intestinal con la

consecuente introducción de antígenos que generan a su vez más inflamación (Isolauri, 2001).

Desde hace más de 10 años existen reportes que demuestran la capacidad de colonización de diversas cepas de *Lactobacillus* en personas sanas y su efecto sobre otros microorganismos de la flora intestinal (bacterias anaerobias), después de 11 días de la administración de los probióticos (Johansson *et al.,* 1993). Resultados similares se encuentran con *L. rhamnosus* GG en ratas gnotobióticas sin causar daño (Banasaz *et al.,* 2002) y en voluntarios humanos, donde después de administrarlo por 12 días se encontró una persistencia de 87% y 29% a los 9 y 16 días de concluída la administración (Alander *et al.,* 1999) y hasta por tres semanas con *L. casei rhamnosus* Lcr35 (De Champs *et al*., 2003).

Bezkorovainy (2001) realizó pruebas de sobrevivencia en tracto digestivo con diferentes microorganismos probióticos y encontró que aun en casos de diarrea en niños y adultos sobreviven del 20 al 40% de especies seleccionadas de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* cuando fueron administrados en productos lácteos fermentados.

Existen estudios acerca de los beneficios de la colonización con bacterias del género *Lactobacillu*s como los reportados por Elliot y col. (1998) donde, señalan que las bacterias de este género aceleran la capacidad de sanar úlceras gástricas producidas intencionalmente en ratas.

2.6. EFECTOS POSITIVOS

El ser humano desde hace años utiliza los probióticos por sus efectos en la mejoría del estado nutricio y para prevenir o tratar diversas enfermedades entre las que se encuentran algunas disfunciones intestinales, las infecciones gastrointestinales causadas por virus y por bacterias enteropatógenas, la diarrea asociada a tratamiento con antibióticos, enfermedades de base inmunológica y la actividad antitumoral.

2.6.1. Mejoría del estado nutricio

La mejoría del estado nutricio se relaciona con el efecto de los probióticos en el aumento de la disponibilidad de nutrimentos y en el metabolismo del colesterol.

2.6.1.1. Producción de nutrimentos

Durante muchos años, se consideró que los microorganismos de la flora intestinal degradaban los productos de la digestión sin ningún beneficio para el ser humano sin embargo no es así, la flora bacteriana genera compuestos útiles para la nutrición del individuo como por ejemplo, ácidos grasos de cadena corta que aportan energía, vitamina K y del grupo B y algunos aminoácidos esenciales como lisina (Metges *et al.,* 1999; Metges, 2000; St-Onge *et al*., 2000)

2.6.1.2. Concentración y metabolismo del colesterol

Una elevada concentración del colesterol en sangre es considerada un factor de génesis de ateroesclerosis, que aumenta el riesgo de enfermedad cerebrovascular, coronaria y vascular periférica. En general, en un estado de salud, los tejidos mantienen un equilibrio del colesterol entre la ganancia (por el flujo de colesterol dietético y la síntesis hepática de colesterol) y la pérdida por la síntesis de esteroides y la formación de sales biliares a partir de colesterol (Guadalajara, 1996).

Se hicieron estudios *in vitro*, en animales y humanos para determinar si algunas cepas de probióticos tienen un efecto en la disminución de colesterol sanguíneo. Los estudios *in vitro* muestran que las bacterias pueden remover el colesterol del medio de cultivo, el mecanismo mas probable es la precipitación del colesterol con ácidos biliares libres, los mejores resultados se obtuvieron con *L. fermentum* KC5b y *Lactococcus lactis* subespecie diacetylactis (Gilliland *et al.,* 1985; Klaver y van der Meer, 1993; Kimoto *et al.,* 2002; Pereira y Gibson, 2002a). En experimentos con ratas se encontraron resultados positivos en la reducción de los niveles de colesterol sanguíneo con la ingestión de cepas

de *Lactobacillus gasseri* SBT0270, *Bifidobacterium longum* BL1 y *L. casei* (Usman y Ozono, 2000; Xiao *et al.,* 2003; Bertazzoni *et al.,* 2004), mientras que, en humanos en una revisión realizada por Roos y Katan (2000) encuentran resultados poco consistentes en los datos de los estudios realizados sobre los diversos microorganismos probióticos y la reducción de colesterol. Sin embargo, en experimentos realizados con *Bifidobacterium longum* BL1 se encontró una reducción en el contenido de colesterol total, en la mitad de los sujetos tratados con *B. longum* y no en el grupo control, esta reducción fue significativa en los individuos con niveles superiores a 240 mg/dl (Xiao *et al.,* 2003).

Existen varios mecanismos propuestos para explicar la disminución del colesterol sérico por el consumo de probióticos. Se sugiere que al fermentar carbohidratos los probióticos producen ácidos grasos de cadena corta y éstos inhiben la síntesis hepática del colesterol, también se lleva a cabo una redistribución del colesterol del plasma al hígado, Además las bacterias interfieren en la absorción del colesterol por la deconjugación del sales biliares o por asimilación directa del colesterol en las células bacterianas (Pereira y Gibson, 2002b).

El consumo de productos lácteos fermentados causa un incremento en la producción de ácidos grasos de cadena corta, los cuales disminuyen la concentración de colesterol circulante por inhibición de la síntesis del mismo o su redistribución del plasma al hígado. Además, la actividad bacteriana incrementa la desconjugación de ácidos biliares y esto permite que no sean absorbidos y sean excretados, esto a su vez aumenta la síntesis *de novo* de ácidos biliares a partir de colesterol (St-Onge *et al.,* 2000; Pereira *et al.,* 2003).

Estos resultados aun no son concluyentes, es necesario realizar más investigaciones, pero son promisorios para las personas que presentan cantidades elevadas de colesterol plasmático.

2.6.2. Disfunciones intestinales

Las disfunciones intestinales en las que se encuentra efecto positivo con el tratamiento con probióticos son la intolerancia a la lactosa y el estreñimiento.

2.6.2.1. Mejoría en problemas de intolerancia a la lactosa

La intolerancia a la lactosa es debida a una deficiencia de la enzima β–galactosidasa y se caracteriza por la presencia de diarrea, dolor abdominal fuerte y flatulencia excesiva después de la ingestión de leche. Mas de la mitad de la población adulta del mundo es intolerante a la lactosa, y existe variación étnica muy importante que va de 2% en adultos de la península escandinava, hasta 70% en los adultos del sur de Italia (Adolfsson *et al.,* 2004). Si la deficiencia de la β-galactosidasa no es muy severa no causa problemas cuando el consumo de leche es pequeño, mientras que en aquellas personas que tienen intolerancia severa y la actividad de la enzima se encuentra muy reducida, se limita la digestión y absorción de lactosa, que se acumula en la luz intestinal y se induce la retención de agua por su actividad osmótica y la generación de los síntomas ya mencionados (Saavedra, 2001).

Generalmente existe una buena tolerancia al consumo de productos lácteos fermentados, esto debido a que, durante el proceso de fermentación, las bacterias ácido lácticas degradan parcialmente la lactosa que contienen este tipo de productos (Rolfe, 2000; Mayo y Delgado, 2003). Sin embargo, se ha comprobado que el efecto de mejoría en los problemas de intolerancia a la lactosa es mayor cuando se ingieren productos con organismos vivos, ya que probablemente, además de la hidrólisis de la lactosa por la β-galactosidasa, las células vivas contribuyen con otros mecanismos como el incrementar la actividad de permeasa que permite que la lactosa entre a las células bacterianas (de Vrese, 2001; Adolfsson *et al.,* 2004).

Se ha encontrado que no todas las especies del género *Lactobacillus,* poseen la misma capacidad para aliviar los problemas de intolerancia a la lactosa.

Szilagyi en 1999, reportó una correlación de este efecto con los cambios en las enzimas bacterianas en las heces, en especial con el incremento de la β-galactosidasa, cuando se ingieren diversas especies de *Lactobacillus.*

2.6.2.2. Estreñimiento

El estreñimiento es una disfunción intestinal motora definida en términos de frecuencia en la defecación, que se traduce en un incremento del tiempo de tránsito intestinal con síntomas de malestar abdominal, dificultad para evacuar y vaciado incompleto del recto. Las causas de este padecimiento son muy variadas y principalmente se debe a una dieta baja en fibra (Mayo y Delgado, 2003).

Existen pocos reportes sobre el papel de los probióticos en esta patología, y los resultados son muy diversos. En una revisión realizada por Adolfsson en 2004, se mencionan algunos resultados prometedores como el incremento en el número de defecaciones de 3 a 7 por semana con el consumo de leche fermentada con *Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus* y hasta de 15 por semana cuando la leche fue fermentada con *L. acidophilus.*

2.6.3. Enfermedades gastrointestinales

Los probióticos se utilizan como preventivos o en el tratamiento de las infecciones gastrointestinales causadas por rotavirus, diarrea asociada a tratamiento con antibióticos y por *Clostridium difficile,* infecciones por *Helicobacter pylori* y gastroenteritis causada por bacterias.

2.6.3.1 Diarrea por rotavirus

Las infecciones por rotavirus son la principal causa de diarreas graves en la infancia y una importante causa de mortalidad. Durante la enfermedad, la mucosa intestinal se ve afectada y se altera la composición de la microflora intestinal. El tratamiento es la rehidratación oral y la vigilancia para evitar

infecciones intestinales secundarias, existen algunas investigaciones que demuestran que el uso de probióticos trae consigo un acortamiento de la duración de la diarrea (Isolauri *et al.,* 1991; Roos y Katan, 2000).

Se sugiere que la ingestión de probióticos ejerce un efecto profiláctico y terapéutico en la infección por rotavirus mediante la estimulación del tejido linfoide asociado al intestino, que resulta en un incremento de la respuesta antigénica humoral (Saavedra, 2001). En los niños con diarrea por rotavirus, se observó una buena relación entre la respuesta inmune y la adherencia de las bacterias probióticas, como se demuestra en las investigaciones realizadas por Juntunen y col. (2001) donde encontraron que es muy variable la capacidad de adherencia de las diferentes cepas de probióticos al mucus intestinal (de 1 a 34% en sujetos saludables) el valor mayor para *L. rhamnosus* GG y el menor para *L. casei* Shirota, y observaron un efecto sinérgico con la combinación de cepas.

Entre los estudios clínicos doble ciego con placebo, se encuentra el de Shornikova y col. (1997a). En este estudio se demuestra la eficiencia de *Lactobacillus* GG en la reducción de la duración de la diarrea causada por rotavirus. Los pacientes que recibieron *Lactobacillus* GG presentaron un tiempo de diarrea de 2.7 días, mientras que en el grupo control con placebo el tiempo de diarrea fue de 3.7 días con un valor de $p = 0.03$. Así también, Guandalini y col. (2000) con el mismo probiótico, encontraron en el grupo con placebo 76.6 $\pm$ 41.6 horas de diarrea contra 56.2 $\pm$ 16.9 en el grupo con probióticos. Resultados similares se han encontrado con *Lactobacillus reuteri* (Shornikova y col. 1997b). Se requieren más estudios clínicos, en especial de otras cepas de probióticos con buena capacidad de adhesión.

En el 2003, Reid y col. realizaron una revisión de una decena de investigaciones que incluyen estudios doble ciego, aleatorizados y con placebo y concluye que los probióticos, en especial *Lactobacillus rhamnosus* GG, tienen un efecto positivo en el tratamiento de la diarrea por rotavirus.

2.6.3.2. Diarrea asociada con antibióticos

Los antibióticos pueden dañar severamente la ecología microbiana del intestino y el resultado mas común de este daño es la aparición de diarrea; se ha descrito que aproximadamente un 20% de los pacientes que consumen antibióticos desarrollan esta condición (Rolfe, 2000; Saavedra, 2001). La severidad de la diarrea asociada al tratamiento con antibióticos puede ser desde breve y auto limitante hasta severa con desbalance de electrolitos, deshidratación, dolor abdominal intenso, colitis pseudomembranosa e incluso hasta la muerte (Arvola *et al.,* 1999).

En un estudio en niños con infecciones respiratorias se encontró una incidencia de diarrea asociada con antibióticos del 16% y se detectaron modificaciones en la flora intestinal a través de la disminución de la actividad enzimática en las heces por la terapia antimicrobiana, mientras que solamente se observó una incidencia del 5% en el grupo tratado con *Lactobacillus rhamnosus* GG (Arvola *et al.,* 1999).

En un meta-análisis realizado en 2002 por D' Souza y col. concluyen que los probióticos pueden ser usados para prevenir la diarrea asociada a antibióticos y que entre los microorganismos con mayor potencial esta *Sacharomyces boulardii* y algunas especies de *Lactobacillus*.

El clásico ejemplo de microorganismos oportunistas relacionados con la diarrea asociada a antibióticos es *Clostridium difficile,* bacteria que coloniza al intestino y libera dos exotoxinas. Este patógeno es el responsable del 20 al 40% de las diarreas asociadas al tratamiento con antibióticos, y también es el principal microorganismo que causa diarrea nosocomial, pues infecta del 15 al 25% de los adultos hospitalizados en los Estados Unidos, especialmente personas ancianas y/o debilitadas (Rolfe, 2000).

El efecto de probióticos para coadyuvar en el tratamiento de *Clostridium difficile* ha mostrado resultados alentadores pero poco consistentes. En un meta-

análisis Reid y col. (2003) reportaron que en tres de cuatro estudios con *Saccharomyces boulardi* hubo un efecto significativo en disminución de la recurrencia de la enfermedad, mientras que en las investigaciones realizadas con *Lactobacillus* GG la eficiencia fue menor.

Hopkins y Macfarlane (2003) observaron que con el consumo de oligosacaridos no digeribles se incrementa la resistencia a la colonización de *C. difficile* evaluado mediante la cuenta de microorganismos viables, formación de ácidos grasos de cadena corta y actividad citotóxica; esta resistencia es atribuida a la estimulación de las diferentes especies de *Bifidobacterium* de la flora normal del intestino.

2.6.3.3. Infección causada por Helicobacter pylori

En 1983 fue encontrada una bacteria llamada *Helicobacter pylori* en las capas de la mucosa gástrica o adherida al epitelio del estómago. Ahora se conoce que juega un rol importante en enfermedades como úlcera péptica, gastritis crónica, adenocarcinoma gástrico y linfoma asociado a la mucosa.

Algunos estudios *in vitro* han mostrado la capacidad de las bacterias de la flora intestinal de reducir la viabilidad del *H. pylori* (Reid *et al.,* 2003). *Lactobacillus acidophilus* LB secreta una sustancia antibacterial con actividad contra *H. pylori in vitro* e *in vivo,* este compuesto disminuye la viabilidad del patógeno independientemente del pH y nivel de ácido láctico. El tratamiento con el sobrenadante de *L. acidophilus* LB inhibe la actividad ureásica *in vitro,* mecanismo necesario para poder sobrevivir en el medio ambiente ácido del estómago (Coconnier *et al.,* 1998).

Se analizó el antagonismo de diferentes bacteriocinas (nisina A, lactacina A164, BH5, JW3, y NK24, pediocina PO2 y leucocina K) contra cuatro cepas de *Helicobacter pylori* y se encontró que las bacteriocinas que mostraron una fuerte actividad antibacteriana fueron principalmente las leucocinas producidas por *Lactococcus lactis,* con menor actividad se observó la pediocina PO2 de

Pediococcus acidilactici y sin actividad la leucocina K producida por *Leuconostoc* sp (Kim *et al.,* 2003).

Wang y col. (2004) probaron la inhibición *in vitro* de *H. pylori* por la inoculación de *Lactobacillus acidophilus* La5 y *Bifidobacterium lactis* Bb12 y encontraron que solo el *Bifidobacterium* ejercía un efecto inhibitorio.

Algunos estudios en animales han mostrado la capacidad de las bacterias de inhibir la adhesión del patógeno al epitelio del estómago. Reid y col. (2003) encontraron que *Lactobacillus acidophilus* LB secreta *in vivo* una sustancia antibacterial con actividad contra *H. pylori,* este compuesto disminuye la adhesión del patógeno probablemente por la disminución en la viabilidad ya demostrada en estudios *in vitro.*

El probiótico *Lactobacillus gasseri* demostró ser efectivo en disminuir la viabilidad del *H. pylori* y también en reducir la inflamación de la mucosa gástrica (Sakamoto *et al.,* 2001). Por su parte Cruchet y col. (2003) evaluaron si la ingestión regular de *Lactobacillus johnsonii* La1 y *Lactobacillus paracasei* ST11 interfería en el riesgo de colonización con *H. pylori* en niños, se encontró una diferencia significativa del proceso inflamatorio como indicador de mejoría asociada al consumo de *L. johnsonii* La1 viables, pero no con *L. paracasei* ST11.

Por otra parte, un estudio *in vivo* donde se administró yogurt A-B (yogurt que contiene *L. acidophilus* La5 y *B. lactis* Bb 12 con 10^7 UFC/g de cada uno) a 55 adultos voluntarios infectados con *H. pylori* se observó que el tratamiento disminuyó significativamente la actividad ureásica del *H. pylori* después de seis semanas (Wang *et al*., 2004).

Los reportes del efecto de los probióticos sobre *H. pylori,* resultan alentadores, aunque en ninguno de ellos se confirmó con biopsias gástricas la erradicación del patógeno (Sullivan y Nord, 2002).

2.6.3.4. Enfermedades gastrointestinales por bacterias

Son diversas las bacterias que pueden causar gastroenteritis, entre las más frecuentes se encuentran *Escherichia coli* enteropatógena, diferentes especies de *Salmonella, Shigella disenteriae, Yersinia enterocolitica, Campilobacter, Vibrio cholerae, V. parahaemolyiticus, Staphylococcus aureus, Bacillus cereus y Clostridium perfringens.*

En estudios realizados en animales experimentales, Hudault (1997) observó que al administrar *Lactobacillus casei* GG en ratones libres de gérmenes aumentó significativamente la sobrevivencia a *Salmonella enterica* serovar Typhimurium C5, en comparación con el grupo control.

Entre las investigaciones realizadas en humanos se ha analizado el efecto en la prevención de la diarrea en especial de la diarrea del viajero así como el efecto de los probióticos como coadyuvante en el tratamiento de diarrea aguda.

De los primeros estudios doble ciego con placebo de la administración de probióticos en la prevención de diarrea del viajero esta el realizado por Oksanen y col. (1990) donde a 820 turistas que viajaban al sur de Turquía, se distribuyó en dos grupos, uno de ellos recibió *Lactobacillus* GG y el otro placebo, al regreso se les aplicó un cuestionario donde se indagaba la incidencia de diarrea y se encontró que el grupo con placebo la diarrea se presentó en un 46.5%, mientras que en el grupo con probióticos fue de 41.0%, donde se observa una protección de 11.8%. Otro estudió doble ciego con placebo desarrollado por Hilton y col. (1997) en turistas americanos encontraron que *Lactobacillus* GG disminuyó la incidencia de este padecimiento. Así mismo, en una revisión realizada por Marteau y col. (2001) de las investigaciones reportadas hasta el año 2000, encuentran ocho estudios donde se administran diferentes probióticos, aunque solamente en cuatro de ellos obtuvieron resultados positivos.

Para el tratamiento de diarrea aguda se ha probado la administración de *Lactobacillus* GG conjuntamente con la rehidratación oral en niños y se encontró que el porcentaje de persistencia de diarrea a las 48 horas era significativamente menor en el grupo con *Lactobacillus* con respecto al grupo control con 31% a 75%, respectivamente (Raza *et al*., 1995). Por otro lado, Guandalini y col. (2000) también realizaron un estudio doble ciego con placebo para evaluar el efecto de *Lactobacillus* GG en la reducción de la duración de la diarrea aguda y encontraron en el grupo con placebo 71.9 $\pm$ 35.8 horas de diarrea contra 58.3 $\pm$ 27.6 en el grupo con probióticos.

Una presentación comercial, Bioflorin, que contiene *Enterococcus* SF 68 fue evaluado en el tratamiento de diarrea aguda en adultos y se encontró un efecto altamente significativo en la disminución de la duración de la diarrea al compararlo con el grupo control con placebo. Al segundo día de tratamiento con el probiótico un 61% de los pacientes continuaban con diarrea en contraste con 96% del grupo control (Buydens y Debeuckelaere, 1996).

En un estudio realizado por Alm (1983) en personas sanas a las que se les administró al mismo tiempo *Lactobacillus acidophilus* en leche y *Salmonella*, y el consumo del probiótico fue *ad libitum,* y de manera continua hasta dar de 3 a 5 valores negativos en análisis de heces, se concluyó que con grandes volúmenes de leche con probióticos se acorta el tiempo que permanece el patógeno en el tracto gastrointestinal.

En una revisión realizada por Heyman (2000) sobre el efecto de las bacterias ácido lácticas sobre las enfermedades diarreicas concluyen que aun existen dudas sobre el efecto benéfico de estos microorganismos sobre las diarreas de origen bacteriano dada la diversidad de los resultados que se observan con las diferentes especies y cepas. Conclusiones similares son las expresadas por Isolauri (2003) y Vanderhoff y Young (2002) donde se hace hincapié en que los efectos son cepa dependiente debido a la considerable variabilidad genética de los diferentes organismos probióticos.

En un meta-análisis realizado por Van Niel y col. (2002) que incluyó 9 de los 26 trabajos realizados de 1966 al 2000 donde los probióticos son utilizados como terapia de diarreas en niños, encontraron que en forma significativa acortan la diarrea en 0.7 días, así como también inducen una reducción de 1.6 en el número de evacuaciones en el segundo día de tratamiento, y concluyen que los probióticos son seguros y efectivos en el tratamiento de la diarrea infecciosa en niños.

2.6.4. Otras infecciones

2.6.4.1. Influenza

Se han realizado estudios en ratones para determinar el efecto de la administración de probióticos sobre la respuesta a la infección con el virus de la influenza. En 1999, Yasui y col. encontraron que mediante la administración de *Bifidobacterium breve* YIT4064 se incrementó la producción de IgG contra varios antígenos, y se indujo protección contra varias infecciones virales. Por otra parte, Hori y col. (2001) encontraron que la administración por vía intranasal *L. casei* Shirota no viable, incrementaba la producción de interleucina 12 e interferón gama comparado con el control, además, se observó que al inocular el virus de la influenza en ambos grupos, se presenta un decremento de 1/10 en los títulos de virus y un decremento en la sobrevivencia de los ratones de un 69% en el control contra un 15% en los que recibieron el probiótico. Estudios posteriores de los mismos autores reportan que en ratones alimentados con dietas que contienen *L. casei* Shirota se produjo una inducción de interferón gamma y factor de necrosis tumoral alfa (TNF-α) en células de bazo y pulmón, esto sugiere que no solo se activa la inmunidad celular sistémica sino también la inmunidad local (Hori *et al.,* 2002). Yasui y col. (2004) describen resultados similares en un sistema inmune inmaduro de ratones neonatos.

2.6.4.2. Candidiasis

En ratas inmunodeficientes se encontró que probióticos como *Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus reuteri, Lactobacillus casei* GG y *Bifidobacterium animalis* no previenen completamente la candidiasis pero reducen la incidencia y la severidad de la enfermedad, además, modulan la respuesta inmune a *Candida albicans* (Wagner *et al.,* 1997b). Estudios posteriores del mismo grupo de trabajo demuestran que algunas cepas de *Lactobacillus* inducen una respuesta de protección contra la candidiasis, aun cuando fueron expuestas al calor. Esto es importante en pacientes inmunodeficientes donde el uso de organismos vivos implica un riesgo (Wagner *et al.,* 2000).

2.6.5. Enfermedades de base inmunológica

Entre las enfermedades de base inmunológica donde se ha reportado que los probióticos pueden tener un efecto positivo están: intestino irritable, enfermedad inflamatoria crónica (enfermedad de Crhon y colitis ulcerosa), alergias, artritis reumatoide.

2.6.5.1. Enfermedad inflamatoria y síndrome de intestino irritable

La enfermedad inflamatoria intestinal es una enfermedad crónica y recurrente; con este término se incluyen la enfermedad de Crhon y la colitis ulcerosa, ambas tienen síntomas similares pero afectan diferentes porciones del intestino. Se caracterizan por dolor abdominal y alteración de la función motora del intestino (Mayo y Delgado, 2003; Adolfsson *et al.,* 2004). La patogénesis de estas enfermedades no se conoce completamente, pero se sabe que involucra una alteración de la respuesta inmune de la mucosa a antígenos presentes en la flora bacteriana normal. Normalmente, una mucosa saludable es el primer mecanismo de defensa del intestino contra su flora intestinal y también contra los patógenos que pueden ingresar al organismo. En pacientes con enfermedad inflamatoria, la proporción de los diferentes microorganismos que conforman la flora se encuentra alterada; en biopsias se observa una baja cantidad de

Lactobacillus y *Bifidobacterium* lo que incrementa la oportunidad de colonización por microorganismos patógenos y da lugar a una respuesta proinflamatoria (Sartor, 2003; Adolfsson *et al.,* 2004).

El tratamiento de elección para estos padecimientos es la inmunosupresión y/o inmunomodulación con esteroides. Algunos investigadores sugieren el uso de probióticos como parte del tratamiento con la finalidad de controlar a los microorganismos de la flora que están producen la respuesta inmune en forma anormal; se sugiere que los probióticos actúan mediante un proceso de competencia bacteriana y restablecen las condiciones de la mucosa disminuyendo el proceso inflamatorio o a través de inmunomodulación (Shanahan, 2001).

2.6.5.2. Alergias

La alergia es una respuesta exagerada de nuestro organismo cuando entra en contacto con determinadas sustancias generalmente inocuas para el organismo y que habitualmente son toleradas por éste. La terapia con probióticos parece aliviar la inflamación alérgica ya que se observa una disminución de los síntomas como la reducción de algunos marcadores de la inflamación. En un estudio aleatorio, con infantes con eczema atópico se les administró suplementación con *Bifidobacterium lactis* Bb-12 y se encontró que el probiótico modifica la composición de la microbiota de la flora intestinal durante el destete y se logró contribuir a aliviar los síntomas de inflamación alérgica (Kirjavainen *et al.,* 2002). También se han realizado ensayos aleatorios, doble ciego, con placebo con *Lactobacillus rhamnosus* GG en mujeres embarazadas por cuatro semanas antes del nacimiento de bebes con alto riesgo de alergias; se encontró que el tratamiento con probióticos causó una reducción significativa en la aparición de enfermedad atópica temprana en los recién nacidos (Kalliomaki *et al.,* 2001). En otro estudio, Van de Water y col. (1999) encontraron que el consumo de yogurt se asocia con una disminución de síntomas de alergia tanto en adultos como en personas mayores.

2.6.5.3. Artritis reumatoide

Es probable que la artritis se deba, entre otras causas, a una disfunción de la barrera mucosa intestinal, esto se ha sugerido después de detectar en esos pacientes un incremento de actividad ureásica debida muy probablemente a desequilibrio en las poblaciones anaeróbicas intestinales. De tal forma que la administración de probióticos podría restablecer el equilibrio de la flora intestinal y por ende los niveles enzimáticos en las heces (Mayo y Delgado, 2003). En los casos de artritis crónica progresiva autionmune uno de los objetivos es reducir la inflamación. En un estudio realizado en modelos animales donde se indujo artritis y se probó el efecto de *Lactobacillus rhamnosus* GG, se encontró que el grupo tratado con yogur con probióticos (10^{11} UFC/L) presentó significativamente menor inflamación que los grupos controles con leche esterilizada y/o agua, concluyendo que el consumo de probióticos o yogurt que contienen *Lactobacillus rhamnosus* GG tienen un efecto positivo tanto preventivo como curativo (Baharav *et al.,* 2004).

2.6.6. Actividad antitumoral

El cáncer es sin duda una de las enfermedades más temibles, se define como un proceso de pasos múltiples en los que se acumula daño en el material genético que ocasiona una multiplicación descontrolada de las células afectadas (Greenwald *et al.,* 2001). Las causas del cáncer son muy diversas, entre los factores de riesgo se encuentran los de origen genético y los del medio ambiente; entre estos últimos destacan como papel central, la composición de la flora intestinal y la dieta (alto consumo de grasas y carnes rojas y bajo contenido de fibra) (Mayo y Delgado, 2003; Adolfsson, 2004).

Hay elementos para sugerir que los probióticos pueden participar en la reducción del cáncer de colon. En una revisión realizada por Roos y Katan (2000) se analiza la disminución de la recurrencia de cáncer en pacientes a los que se les extirparon tumores blandos y que consumieron *L. casei* en comparación con el grupo control. Las diferencias son significativas, del orden

de un 83% de recurrencia en el grupo control contra un 57% en los pacientes con el probiótico, mientras que en otro estudio fue de 45% contra 21% en los que se administró *L. casei.*

Moore y Moore (1995) compararon la flora intestinal diferentes poblaciones distribuidas en dos grupos según su incidencia de cáncer de colon, un grupo de bajo riesgo (población rural de Japón y África) y otro grupo de alto riesgo (hawaianos japoneses), encontraron cinco especies con estrecha asociación con un bajo riesgo de cáncer entre las que destacan *Lactobacillus* y *Eubacterium aerofaciens* microorganismos productores de ácido en colon, lo que lleva a pensar que la producción de ácido láctico pudiera ser uno de los factores protectores de este padecimiento.

Wollowski y col. en 1999 probaron que cepas de *Lactobacillus delbrueckii* ssp *bulgáricus* 191R y *Streptococcos salivarius* ssp *thermophilus* CH3 previenen el daño al DNA inducido por N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (MNNG) en células aisladas de colon de ratón; en ese mismo año, se perfilan los posibles mecanismos de acción de los probióticos en la prevención y crecimiento de tumores (Reddy, 1999). En una revisión de las investigaciones realizadas en animales de 1990 a 2000 por Brady y col. (2000) concluyen que el consumo de prebióticos y probióticos contribuye a atenuar el desarrollo de cáncer de colon.

Los factores implicados en la carcinogénesis son muy variados, esta involucrado el aumento de la respuesta inmune del hospedero, la disminución de flora intestinal dañina que produce enzimas que generan compuestos cancerígenos, la capacidad de secuestrar o eliminar compuestos potencialmente mutagénicos, la producción de compuestos anti-mutagénicos, alteración del pH del colon y de las condiciones fisiológicas del intestino (Rolfe, 2000; Adolfsson *et al.,* 2004). Los posibles mecanismos de acción se empiezan a dilucidar, tales como el aumento de la citotoxicidad de las células NK (Takagi *et al.,* 2001), incremento de la sobrevivencia de las células epiteliales del intestino en un ambiente de citocinas pro-apoptóticas inducidas por probióticos

(Yan y Polk, 2002) y el efecto de inhibir la translocación del núcleo del factor de necrosis tumoral en *L. reuteri* (Ma, 2004).

La búsqueda de microorganismos probióticos no ha terminado, actualmente son alrededor de 20 los microorganismos reconocidos como probióticos, cada uno de ellos posee diferente capacidad enzimática por lo que los efectos benéficos en el huésped pueden ser muy diversos; de igual manera, aunque varios microorganismos generen el mismo efecto como la inhibición de microorganismos patógenos o en la mejoría de las enfermedades de origen autoinmune, este efecto puede ser debido a diferentes mecanismos de acción.

2.7. MECANISMOS DE ACCIÓN DE LOS PROBIÓTICOS

Son diversas las formas en que los probióticos pueden ejercer los efectos benéficos ya descritos, entre las que se encuentran los efectos de barrera por competencia por los sitios de adhesión, la producción de sustancias antimicrobianas y la estimulación inmunológica (Guarner, 2002; Sanders, 2000; Marteau *et al.,* 2001).

2.7.1. Efecto barrera y competencia por sitios de adhesión

El efecto barrera es útil para el control de las enfermedades gastrointestinales; para que se presente el efecto barrera se requiere que los microorganismos de la flora intestinal, puedan adherirse y colonizar las células epiteliales del tracto digestivo, impidiendo así, que los microorganismos patógenos se adhieran y desarrollen las diferentes enfermedades (Guarner, 2000b). Los probióticos ingeridos deben ser capaces de sobrevivir las condiciones ácidas del estómago y en la presencia de bilis en el intestino; aunado a esto, se requiere además, de la adhesión de los probióticos en las células intestinales para impedir la misma de microorganismos patógenos y el desarrollo de la enfermedad

.

2.7.1.1. Adhesión de microorganismos probióticos

Desde hace varias décadas se comprobó que algunos microorganismos probióticos pueden ejercer el efecto barrera y por lo tanto, se considera una característica deseable en estos microorganismos, la capacidad de adherirse y colonizar en el intestino. Chauvière y col. (1992a) probaron la capacidad de adhesión en enterocitos humanos (células Caco-2) de 25 cepas de diferentes especies de *Lactobacillus* y encontraron ocho cepas con esa capacidad, cuatro de la especie *L. acidophilus* aisladas de humanos y de animales y cuatro *L. casei* aislados de productos lácteos. También se estudió esa variabilidad en la adhesión en estudios *in vivo* con ratones y *L. casei* mostró mayor capacidad de adhesión que *L. acidophilus, L. reuteri y Bifidobacterium animalis* (Wagner *et al.,* 1997a). Esta propiedad se analizó también en varias cepas de *Lactococcus;* nueve cepas de *Lactococcus* fueron comparadas con cepas de referencia de *L. johnsonii* La1 (control positivo de adhesión) y *L. acidophilus* JCM1132*,* (control negativo de adhesión) y se encontró una cepa de *Lactococcus lactis ssp lactis* NIAI 527 similar en adhesión a *L. johnsonii* mientras que *L. acidophilus* no presentó adhesión (Kimoto *et al.,* 1999).

Existen varios factores que influyen en la adhesión de los probióticos a las células intestinales. En la mayoría de las cepas de probióticos se ha encontrado que el pH influye en la adhesión; además, en *L. acidophilus* esta involucrada una proteína, ya que se presenta disminución en la adhesión con tratamiento con proteasas, mientras que en *L. gasseri* no se presenta este efecto (Greene y Klaenhammer, 1994). Granato y col. (1999) encontraron que en *L. johnsonii* están involucrados los ácidos teicoicos de la pared celular.

La sobrevivencia de los probióticos para llegar al intestino esta ligada a la tolerancia a pH bajos, a la capacidad de adhesión y a las propiedades antimicrobianas (Jacobsen *et al.,* 1999). Al analizar la adhesión en ratones, las bacterias probióticas mostraron discrepancias en la capacidad de adherirse a la superficie del epitelio intestinal, diseminarse a órganos internos y estimular

respuestas inmunes. En personas adultas los probióticos fueron inocuos, y se sugieren mas estudios en huéspedes inmunodeficientes o neonatos (Wagner *et al*., 1997a).

También se determinó que la adhesión depende del estado de salud del huésped y/o la presencia de patologías. Ouwehand y col. (2003) encontraron diferencia significativa en la adhesión de *L. rhamnosus* GG y *L. reuteri* en el colon de personas sanas y con patologías intestinales (diverticulitis, carcinoma rectal y enfermedad inflamatoria intestinal); los valores máximos de adhesión se presentaron en la enfermedad inflamatoria intestinal.

Se comparó la adhesión de los probióticos en las diferentes porciones del colon y se encontró que con *L. rhamnosus* GG, *L. bulgaricus* (ATCC 11842) y *Bifidobacterium lactis* Bb12 la adhesión es 10 veces mayor en el mucus que en las diferentes partes del tejido del colon; no así con *L. acidophilus* y *L. casei* cepa Shirota en donde el colon ascendente es donde se presenta menor adhesión y en el descendente los valores aumentaron (Ouwehand *et al.,* 2002).

Actualmente se estudia el efecto de los probióticos en la estimulación de la secreción de mucinas como otro aspecto del efecto barrera. Las mucinas son glicoproteínas sintetizadas y secretadas por las células epiteliales de muchos órganos incluyendo la mucosa del intestino y contribuyen al efecto barrera por impedimento estérico o a través de interacciones específicas mucina/bacteria. Aunque existen 12 genes de mucinas identificados, los más estudiados son mucina *MUC2* y mucina *MUC3*, el primero codifica para una proteína de secreción expresada principalmente en el colon y el segundo es una proteína unida a membrana en las células goblet y enterocitos. En el mismo trabajo se describe que *L. rhamnosus* GG y *L. plantarum* 299v inducen la expresión de mucina *MUC3*, no así *L. acidophilus* (Mack *et al.,* 2003).

2.7.1.2. Inhibición de la adhesión de microorganismos patógenos por probióticos

Desde hace más de 10 años se ha reportado que los microorganismos probióticos pueden inhibir las infecciones causadas por *Escherichia coli*. Chauvière y col. (1992b) encontraron que *Lactobacillus acidophilus* viable o muerto por calor produce un efecto de inhibición de la adhesión de *E. coli* enterotoxigénica (ETEC) sobre células Caco-2. El mecanismo propuesto para este efecto sugiere que el *L. acidophilus* bloquea los receptores de adhesión por impedimento estérico.

Lactobacillus plantarum 299 y *Lactobacillus rhamnosus* GG también inhiben la adherencia de *E. coli* enteropatógena a través de incrementar las mucinas intestinales MUC 2 y MUC 3 en las células epiteliales del intestino (Mack *et al.,* 1999).

Ouwehand y Conway (1996b) probaron que algunas cepas de *Lactobacillus* aisladas de cerdos y humanos secretan compuestos que tienen la capacidad de inhibir la adhesión de *E. coli* K88 enteropatógena. Los mismos autores purificaron y caracterizaron el compuesto activo y encontraron que es de naturaleza proteica por ser inactivado por lisozima, y es de aproximadamente 1700 kDa (Ouwehand y Conway, 1996a). Por otro lado, Jin y col. (2000) describen un efecto inhibitorio de la adhesión similar de *Enterococcus faecium* sobre el mismo patógeno.

Liévin y col. (2002) demostraron que la cepa de *Lactobacillus acidophilus* LB aislada de flora intestinal humana tiene la capacidad de proteger contra el daño causado por *E. coli* C1845 (enteropatógena) cuando a células Caco-2 infectadas con el patógeno se les adicionó el sobrenadante del probiótico, y se observó una reducción significativa de la adhesión de *E. coli*, así como también la disminución del daño estructural y funcional del enterocito medido por la concentración de actina F y la actividad de las enzimas de las células del epitelio, respectivamente.

Resta-Lenert y Barreto (2003) encontraron que cepas viables de *Lactobacillus acidophilus* LA y *Streptococcus thermophilus* interactúan con las células epiteliales del intestino y limitan la adhesión e invasión por *E. coli* enteroinvasiva. Estos probióticos, a través del efecto barrera, protegen a las células de la disfunción causada por la invasión el patógeno (incremento de resistencia transepitelial).

Posteriormente Gagnon y col. (2004) probaron 6 cepas de *Bifidobacterium* (5 aisladas de heces de infantes y una de colección ATCC) en su capacidad de inhibir *in vitro* la adhesión de *E. coli* O157:H7, se encontró que dos de las cepas de origen humano pueden inhibir la adhesión del patógeno en mejor grado que la cepa de colección y este efecto fue dependiente de la concentración del probiótico.

También se han realizado estudios *in vitro* de adhesión y colonización con otros microorganismos causantes de gastroenteritis. Se probó el efecto de probióticos *in vitro* sobre la adhesión de *Salmonella* en cultivo de células. Coconnier y col. (2000) encontraron que el sobrenadante de un cultivo de la cepa de *Lactobacillus acidophilus* LB inhibe la adhesión de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium SL 1344 en cultivo de células humanas (Caco-2 /TC-7) e inducen la producción de interleucina-8.

Liévin y col. (2000) investigaron el efecto de 14 cepas de *Bifidobacterium* aisladas de infantes sobre la inhibición de colonización de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium C5, y encontraron dos cepas con la capacidad de inhibir la colonización en células Caco-2 y proteger de la invasión de *Salmonella.*

Coconnier y col. (1993) realizaron pruebas con diferentes bacterias enteropatógenas y encontraron que *Lactobacillus acidophilus* LB viables o muertas por calor inhiben la adhesión de las bacterias enteropatógenas. La unión a las células Caco-2 es diferente, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium y *Escherichia coli* enteropatógena, se adhieren en la superficie de las células diferenciadas del borde de cepillo mientras que *Yersinia*

pseudotuberculosis y *Listeria monocytogenes* lo hacen en la periferia de las células no diferenciadas.

Se probó el efecto de *Lactobacillus rhamnosus* GG y *Lactobacillus casei* Shirota sobre ocho especies de *E. coli* y *Salmonella* y se observó que ambas cepas son capaces de competir y desplazar a las bacterias patógenas aunque en diferente grado (Lee *et al.,* 2003).

También se ha observado que *Bifidobacterium breve* y *B. infantis*, inhiben la invasión de cepas de *Escherichia coli* enteropatógena, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium y *Yersinia pseudotuberculosis* de manera dependiente de la dosis de probióticos (Bernet *et al.,* 1993).

Los probióticos también afectan la adhesión de parásitos. Perez y col. (2001) evaluaron el efecto del sobrenadante de cepas de *L. acidophilus* y *L. johnsonii* La1 *in vitro* sobre *Giardia intestinalis* y encontraron que 2 de las 7 cepas analizadas inhiben la proliferación de trofozoitos, y los probióticos modifican la capacidad de unirse a células Caco-2. La cepa con mejor efecto fue *L. johnsonii* La1.

Estos estudios realizados *in vitro*, tanto en medio de cultivo o en cultivo de células principalmente enterocitos, muestran no solo la capacidad de los probióticos de adherirse o colonizar la mucosa gastrointestinal sino también la capacidad de evitar la colonización de microorganismos patógenos, lo que sugiere la posibilidad de que tengan efecto *in vivo* evitando infecciones gastrointestinales.

2.7.2. Bacteriocinas y otros compuestos formados

La caracterización detallada de la actividad bacteriocinogénica de *Lactobacillus* fue reportada por primera vez en 1961, desde entonces la investigación ha continuado y se ha extendido sobre bacteriocinas de varias bacterias ácido lácticas, especialmente de nisina. La nisina es producida por *Lactococcus lactis*

subespecie lactis de origen lácteo; esta bacteriocina posee un espectro de actividad contra organismos Gram positivos incluyendo bacterias productoras de esporas, y es la única bacteriocina aceptada como un preservador de alimentos (Torres, 2002).

Existen numerosas bacteriocinas producidas por las bacterias ácido lácticas y cada una tiene espectros de inhibición particulares (Stiles, 1996). Tradicionalmente se considera a las bacteriocinas como péptidos biológicamente activos que tienen propiedades bactericidas contra otras especies estrechamente relacionadas con la cepa productora, sin embargo, recientemente este concepto se ha modificado ya que se han encontrado también acciones bactericidas contra cepas distanciadas filogenéticamente de la cepa productora (Sablon *et al.,* 2000).

Diversos investigadores han tratado de clasificar a las bacteriocina de acuerdo a sus características bioquímicas y genéticas (Klaenhammer, 1993; Nes *et al.,* 1996). La clasificación mas aceptada es la propuesta por Nes e incluye tres clases:

Clase I.- Lantibióticos.- Son péptidos pequeños activos a nivel de membrana y que contienen algunos aminoácidos poco comunes como lantionina, β-metil-lantionina y dihidroalanina que se forman debido a modificaciones posteriores al proceso de la traducción. La formación de aminoácidos no comunes se explica por la deshidratación de los aminoácidos serina y treonina, con la posterior adición de los átomos de azufre de la cisteína a los dobles enlaces de los deshidroaminoácidos. Un ejemplo bien conocido de estas bacteriocinas es la nisina.

Clase II.- No lantibióticos.- Son bacteriocinas de peso molecular variable, que contienen aminoácidos regulares. En este grupo se pueden identificar tres subclases:

- Clase IIa.- Son péptidos activos contra *Listeria*, tienen la secuencia consenso en la región N-terminal TGNGVXC y sus representantes característicos son la pediocina PA-1 y la sakacina P.
- Clase IIb.- Son formadores de complejos de poración que consisten de dos péptidos diferentes. Ambos péptidos son necesarios para una mejor actividad antimicrobiana. En este grupo se encuentran la lactococcina G y las plantaricinas EF y JK.
- Clase IIc.- péptidos pequeños, termoestables, no modificados y que se transportan mediante péptidos líder. En esta subclase solamente se reportan las bacteriocinas divergicina A y acidocina B.

Clase III.- Son péptidos grandes mayores de 30 kDa, en esta clase se encuentran las helveticinas J y V, acidofilicina A, lactacinas A y B.

El modo de acción de las bacteriocinas es complejo. La nisina en la clase I y la pediocina como representante de la clase II, son las más estudiadas en este concepto y comparten algunas características en común. Por lo general, actúan destruyendo la integridad de la membrana citoplasmática a través de la formación de poros, lo que provoca la salida de compuestos pequeños o altera la fuerza motriz de protones necesaria para la producción de energía y síntesis de proteinas o ácido nucléicos (Chikindas *et al.,* 1993; Montville y Chen, 1998 y Sablon *et al.,* 2000; González-Martínez *et al.,* 2003).

Es posible que las clases I y II de las bacteriocinas compartan mecanismos de acción semejantes (Montville y Chen, 1998). Al parecer, los péptidos se unen a la membrana citoplasmática a través de uniones electrostáticas con los fosfolípidos cargados negativamente, luego se insertan a la membrana con una reorientación que depende del potencial de membrana, el cual esta influenciado por el pH y la composición fosfolipídica. Los monómeros de bacteriocina forman agregados proteicos que resultan en la formación del poro con la consecuente salida de iones (principalmente potasio y magnesio), pérdida de la fuerza motriz de protones y la salida de ATP y aminoácidos. La fuerza motriz de protones

juega un papel central en la síntesis de ATP, en el transporte activo y el movimiento bacteriano, por lo tanto, se inhibe la síntesis de macromoléculas y la producción de energía dando como resultado la muerte celular.

Aunque es común la formación de poros y la disipación de la fuerza motriz de protones en el modo de acción de las bacteriocinas, existen algunas particularidades en cada clase. De la clase I, la nisina no requiere de un receptor unido a la membrana de la célula blanco ya que reconoce la composición fosfolipídica de la célula (Abee *et al.,* 1994b). En cambio, para la acción de la lactococina A y la lactoestrepcina se requiere de la unión a receptores membranales (Kok *et al.,* 1993). Para las bacteriocinas de la clase IIa se ha sugerido que la región consenso amino terminal tiene un papel importante en la capacidad de reconocimiento de la membrana de la célula blanco (Bruno y Montville, 1993; Eijsink *et al.,* 1998). En las de la clase IIb, las plantaricinas EF y JK, dependen de la acción de dos péptidos a y b para la formación de poros y consecuente disipación del potencial de membrana (Abee *et al.,* 1994a; Moll *et al.,* 1999). En la clase III, que son bacteriocinas de alto peso molecular, el mecanismo de acción se desconoce y deberá ser más estudiado.

Además de las bacteriocinas, los probióticos pueden producir otros metabolitos con la capacidad de inhibir a una gran cantidad de microorganismos, entre estos compuestos están los ácidos grasos de cadena corta y el peróxido de hidrogeno.

La mayoría de los probióticos pertenecen al grupo de bacterias ácido lácticas y por ende son formadoras de ácido láctico por fermentación de carbohidratos; algunas de las cepas son homofermentativas por lo que es el único ácido formado, mientras que otras son heterofermentativas y forman además ácido acético, propiónico y fórmico (Holzapfel *et al.,* 2001).

Brasheard y Durre (1999) analizaron la acción antagónica *in vitro* de *Lactobacillus lactis* contra *Salmonella* spp y *Escherichia coli* O157:H7 a 37º C,

encontraron en todos los experimentos una inhibición completa a las 24 horas, el efecto inhibitorio se debe a la disminución del pH ya que cuando se neutraliza a 6.3 no se presenta la inhibición.

El bajo pH en que actúa la molécula de los ácidos no disociada, afecta en varios aspectos el metabolismo celular y retarda el crecimiento de la flora asociada en los medios de cultivo. Los ácidos láctico y acético no disociados dañan la membrana celular (Torres, 2002).

En un modelo de infección con *E. coli* O157:H7 en ratones, se encontró que *Bifidobacterium breve* cepa Yakult y *B. pseudocatenulatum* DSM 20439 tienen actividad anti-infecciosa, no así otras especies de *Bifidobacterium;* el efecto inhibitorio se debió a la producción de ácidos orgánicos, en especial ácido acético, hasta alcanzar un pH en el intestino de 6.75 y de ese modo se inhibió la producción de la toxina Shiga, ésto fue comprobado mediante el crecimiento *in vitro* con condiciones de pH y ácido acético similares donde también fue inhibida la producción de la toxina Shiga (Asahara *et al.,* 2004).

Algunas cepas de probióticos tienen la capacidad de producir peróxido de hidrógeno. Villegas y Gilliland (1998) observaron que *L. delbrueckii* Subs. *lactis* forma peróxido de hidrogeno cuando utiliza como fuentes de carbono glucosa y lactato (D y/o L) a diferentes temperaturas (5 a 37º C).

El peróxido de hidrógeno producido por bacterias ácido lácticas se acumula en el medio y es inhibitorio para organismos Gram negativos como *Pseudomonas* sp. y Gram positivos como *Staphylococcus aureus,* pero no es dañino para la mayoría de las cepas de probióticos (Torres, 2002). Debido a que algunos probióticos poseen enzimas como la NADH oxidasa y NADH peroxidasa que desdoblan el peróxido de hidrógeno disminuyendo la sensibilidad a dicho compuesto y se previene así la muerte; Talwalkar y Kailasapathy (2003) encontraron que la producción de la enzima es dependiente de la cepa y se incrementa con la concentración de O_2 en el medio de cultivo.

2.7.3. Modulación del sistema inmune

Recientemente se ha investigado el efecto de probióticos sobre el sistema inmune y se determinó que principalmente se estimula la inmunidad innata que incluye componentes como los macrófagos, células NK, defensinas y la cascada de complemento así como el reconocimiento de los microorganismos por medio de receptores (Shanahan, 2000).

Los probióticos favorecen el rechazo de microorganismos infecciosos por medio de la modificación de parámetros inmunológicos tales como la producción de inmunoglobulinas específicas de tipo A (para defensa de las mucosas), incrementan la concentración de macrófagos, producción de interferón y otras citoquinas o mediante la activación de la fagocitosis. Kimura y col. en 1997 realizaron pruebas inmunológicas (transformación de linfocitos y títulos de anticuerpo en suero) en 10 personas, donde los resultados tan diversos del estudio enfatizan la complejidad de las relaciones que existen entre la microflora intestinal y el huésped.

Hay estudios que apoyan la hipótesis de que el consumo de yogurt puede aumentar la respuesta inmune e incrementar la resistencia a enfermedades a través de la producción de inmunoglobulinas A (Ig A) (Van de Water *et al.,*1999; Meydani y Ha, 2000) o mediante la producción de interferón α y γ, interleucina 1β y factor de necrosis tumoral (TNF) (Solís Pereyra *et al.,* 1997) aun a pesar de que las bacterias lácticas no sobreviven el transito intestinal (Adolfsson *et al.,* 2004).

Actualmente se busca definir con claridad la forma en que las bacterias ácido lácticas realizan la modulación del sistema inmune, un mecanismo de acción es mediante el incremento de las células secretoras de IgA observado en *Lactococcus lactis, Lactobacillus delbrueckii* ssp *bulgaricus*, *L. casei* y *L. plantarum*; en estos últimos dos, además se incrementan las células CD4 por interacción de estos probióticos con las placas de Peyer, *L. acidophilus* no fue capaz de incrementar las células secretoras de IgA de esta forma se demuestra

que las bacterias ácido lácticas pueden interactuar a diferentes niveles en el intestino delgado (Perdigon *et al.,* 1999).También se ha observado que los probióticos estimulan diferentes los tipos de células en las diversas porciones del intestino, en el intestino delgado se produce predominantemente IgA1, mientras que en el colon son mas frecuentes las células productoras de IgA2 (Isolauri *et al.,* 2001).

Perdigon y col. (1999) encontraron que las bacterias ácido lácticas son capaces de generar una inflamación mínima en el huésped lo que se traduce en un estado de alerta del epitelio intestinal para actuar contra diversos antígenos.También se ha probado que los probióticos pueden participar en los procesos antiinflamatorios (Isolauri *et al.,* 2002). Mientras que Madsen y col. (2001) encontraron que los probióticos actúan atenuando las citoquinas proinflamatorias (interleucina 10) en modelos de colitis en ratones, posiblemente este sea el modo de acción en la terapia con probióticos en patologías como el síndrome de colon irritable, enfermedad de Crohn y pouchitis (Shanahan, 2001; Isolauri *et al*., 2002).

Ghosh y col. (2004) encontraron una disminución en la inflamación mediante una sincronización de las células T cooperadoras (T_1 y T_2), mientras que Ménard y col. (2004) encontraron que algunos microorganismos probióticos liberan compuestos capaces de cruzar la barrera intestinal y tienen efecto sobre el TNFα.

El sistema inmune intestinal puede discriminar entre las bacterias patógenas, comensales y probióticas que interactúan con las células intestinales y desencadenar una serie de reacciones diferentes (producción de anticuerpos, citoquinas inflamatorias o antiinflamatorias, interferón γ y TNFα) ejerciendo así el efecto inmunomodulador; para que esto se lleve a cabo es necesario que la célula epitelial exprese diferentes receptores transmembranales (TLR) que pueden reconocer diversos fragmentos de bacterias y virus como

lipopolisacaridos, peptidoglicana, RNA, flagelina y DNA (Shanahan, 2000; Jijon *et al.,* 2004).

Se ha comprobado que los probióticos durante su tránsito por el intestino liberan metabolitos activos o fragmentos de componentes que pueden cruzar la barrera intestinal y llegar a tejido mesentérico o a las placas de Peyer y ejercer la inmunomodulación (Ménard *et al.*, 2004)

Jijon y col. (2004) demostraron que el DNA de las bacterias es uno de los compuestos en los cuales se basa esta discriminación, el DNA de las especies probióticas (producto farmacéutico VSL3) es capaz de suprimir la respuesta inflamatoria en células inmunes y epiteliales. Los autores proponen que la clave en la discriminación del DNA bacteriano con respecto al DNA de mamíferos es la hipometilación en los motivos CpG, pero falta dilucidar los mecanismos que generan la diferencia entre las especies bacterianas.

También se ha investigado el efecto de los probióticos sobre las infecciones causadas por las verotoxinas de *Escherichia coli* entero hemorrágica (Kim *et al.,* 2001). Para que se presente la enfermedad, la subunidad B de la verotoxina se une a un receptor Gb_3 en el epitelio y genera una inhibición de la síntesis de citocinas proinflamatorias, TNFα e interleucina 1β en las células blanco, también incrementa la expresión de Gb_3 y aumentan la acción de las verotoxinas y la intensidad de la enfermedad. Kim y col. (2001) estudiaron el efecto de una sustancia producida por *Bifidobacterium longum* que tiene actividad inhibitoria de la expresión de Gb_3 y/o de la interacción de éste con la verotoxina, estos hallazgos sugieren que *Bifidobacterium longum* podría ser usada en el tratamiento de la enfermedad causada por *E. coli* entero hemorrágica.

Se ha comprobado que el efecto inmnomodulador no es igual con todas las cepas probióticas. Hart y col. (2004) probaron 8 cepas presentes en un formulado farmacéutico y encontraron una mayor respuesta antiinflamatoria con

las cepas de *Bifidobacterium longum, B. infantis* y *B. breve* en especial en la producción de IL10, disminución de CD80 y de interferón γ producido por las células T. También difieren en la rapidez de la presentación de los antígenos por las células dendríticas.

2.8. PRODUCTOS CON PROBIÓTICOS

Las bacterias ácido lácticas y probióticas han estado presentes en la alimentación del hombre desde hace siglos ya que se encuentran en productos fermentados a base de leche como yogurt, jocoque, quesos madurados, así como en diversos productos cárnicos y en algunas hortalizas. Las bacterias ácido lácticas se utilizan por su capacidad de proporcionar sabor y textura además de incrementar el valor nutricional de los alimentos (Mateos, 2002).

Desde hace siglos el hombre ha consumido alimentos fermentados elaborados con técnicas artesanales; los procesos evolucionaron hasta lograr productos industrializados, sin embargo, fue hasta el siglo pasado que se introducen microorganismos específicos a los alimentos fermentados para obtener mayores beneficios a la salud. En los alimentos fermentados que contienen probióticos, es necesario considerar que los microorganismos probióticos van a interactuar con los cultivos iniciadores de fermentación y con los componentes de la matriz del alimento, por lo que es necesario estudiar estos efectos con cada una de las cepas probióticas para asegurar productos con calidad sensorial y adecuado aporte de probióticos (Séller, 2001). Mediante el estudio de cinéticas de crecimiento se han descrito cuatro diferentes tipos de interacciones entre los probióticos y los microorganismos iniciadores de la fermentación, estas son: la estimulación del crecimiento, la inhibición completa del crecimiento, la inhibición parcial (observada como retraso en el crecimiento) y ningún efecto (Vinderola *et al.,* 2002).

En algunos países europeos y en Japón, el consumo de probióticos es común y se han utilizado como profilácticos de enfermedades diarreicas desde hace muchos años. Sin embargo, en occidente el consumo de estos productos es

reciente y los probióticos llegaron del viejo continente en forma de yogurt, leches fermentadas, quesos, fórmulas infantiles, bebidas a base de jugos, entre otros. Los primeros alimentos con probióticos fueron desarrollados en productos lácteos principalmente leches fermentadas (Torres, 2002).

2.8.1. Leches fermentadas y yogurt

Las leches fermentadas se han consumido desde hace miles de años, caracterizándose por ser productos con sabor agradable, ligeramente ácido, textura cremosa y con un período mayor de conservación comparado con la leche de la que procede. Desde la época de Hipócrates estas leches se usaban en el tratamiento de malestares estomacales. Metchnikoff hace un siglo relacionó el consumo de leches fermentadas con un efecto benéfico en la salud y la longevidad de los habitantes de los Balcanes (Macedo, 2002). En otros lugares del mundo también se tienen registros ancestrales de la elaboración de leches fermentadas, en la antigua URSS se consume una leche de yegua fermentada denominada koumiss y en los países árabes se elabora el labne, producto de leche de vaca, cabra o borrega fermentado y concentrado de consistencia untosa, producto que en México, la comunidad libanesa lo consume con el nombre de jocoque árabe.

La primera leche con probióticos en forma industrial se desarrolló en Japón en 1935 como resultado de una cuidadosa selección de cepas de *Lactobacillus* que sobrevivieran a las condiciones extremas de pH del aparato digestivo, este producto es conocido como yakult y contiene *Lactobacillus casei* cepa Shirota, la empresa que desarrolló este producto permanece como una de las empresas líderes en el ramo con una distribución en varios continentes (García-Garibay, 2000).

Otras compañías transnacionales también han generado leches con probióticos. Nestlé desarrolló el producto Chamito que contiene *L. johnsonii* y *L. helveticus* y en 1996 lanzó en Suiza un producto denominado LC1 de gran aceptación en Europa que contiene *Lactobacillus acidophilus cepa* La1 (Richardson, 1996),

este producto llegó a México hasta el año 2001. Por su parte, Danone desarrolla dos productos Activia y Actimel, el primero contiene *Lactobacillus casei defensis*® y *L. delbrueckii* subs. *bulgaricus* mientras que el segundo presenta *Bifidobacterium bifidum, Lactococus lactis* y *L.delbrueckii* subs. *bulgaricus* (Revista del consumidor, 2004).

La presencia de diferentes cepas de microorganismos en los productos hace que se generen características organolépticas diversas, así como diferentes efectos benéficos. Ostile y col. (2003) evaluaron el crecimiento y metabolismo de cinco diferentes cepas de probióticos en la fermentación de leches (*Lactobacillus acidophilus La5, L. acidophilus* 1748, *L. rhamnosus* GG*, L. reuteri* SD 2112 y *Bifidobacterium animalis* BB12), encontraron que cada una de las cepas muestran diferentes perfiles metabólicos durante la fermentación, que dan como resultado características sensoriales diferentes en los productos.

En la actualidad la demanda de leches fermentadas se ha incrementado a nivel mundial y en México se presenta la misma tendencia, en el año 2000 se comercializaban cuatro marcas (Yakult, Chamito, Kul tai y Bonacult) (García-Garibay, 2000; Campos, 2002) y cuatro años después se encuentran 11 productos con microorganismos y cantidad de probiótico diferentes (Yakult, Chamito, Kul tai, Bonacult, Activia, Activia para beber, Actimel, Bio 4, LC1, Sofúl y Yolact) (Revista del consumidor, 2004).

En la Unión Europea el consumo de probióticos aumentó un 1.2% del año 2000 a 2001. España es uno de los países con mayor crecimiento, reporta un aumento de un 17% en las ventas de probióticos lo que representa un 22.4% con respecto del total de ventas del yogurt, el consumo per cápita de probióticos en España fue de 3.5 kg/pc/año ese año y la empresa líder en el mercado es la transnacional Danone con un 82% de las ventas totales del mercado (Aranceta *et al.,* 2002).

Cada vez, es más popular la presencia de *Bifidobacterium* spp. en yogurt, en Japón una tercera parte del yogurt contiene especies de este género, mientras

que en Francia, los productos con *Bifidobacterium* alcanzaron un incremento del 300% y actualmente representan el 11% del total del yogurt. También se comercializa yogurt con *Bifidobacterium* en Alemania, Dinamarca, Canadá, Italia, Polonia, Reino Unido, Checoslovaquia y Australia, entre otros (Hughes y Hoover, 1991).

Comentario [LBE1]: De que?

El yogurt es elaborado por una fermentación láctica desarrollada por *L. delbrueckii* subs. *bulgaricus* y *Streptococcus termophilus*, con un sabor ácido y aroma característico, el ácido formado coagula la leche y le da una consistencia semisólida. El producto final debe contener entre 100 millones hasta un billón de bacterias viables por gramo (Macedo, 2002). Pero estos microorganismos no se consideran como probióticos por no sobrevivir a las condiciones normales del estómago e intestino y por lo tanto son incapaces de colonizar la mucosa intestinal y aportar la mayoría de los beneficios ya descritos. Sin embargo, el yogurt consumido de forma regular demostró tener efecto positivo en la intolerancia a la lactosa, el estreñimiento y actualmente se estudian los potenciales efectos en otras patologías (Adolfsson *et al.,* 2004).

El yogurt es uno de los principales productos utilizados como vehículo en la adición de probióticos. Lourens-Hattingh y Viljoen en 2001 realizaron una revisión de la eficiencia del yogurt AB (*Lactobacillus acidophilus* y *Bifidobacterium*) en la capacidad de sobrevivir de los probióticos. Davidson y col. (2000) elaboraron un yogurt con *B. longum* y *L. acidophilus* con una buena recuperación de los probióticos hasta por 11 semanas y con muy buenas propiedades organolépticas, se encontró que un valor de pH superior a 5.6 es un factor clave para la aceptación del producto.

En Estados Unidos, Shin y col. (2000) evaluaron la sobrevivencia de probióticos en varios productos y encontraron que en la fecha de caducidad, los valores de microorganismos viables superaron los valores de 10^6 UFC/g. Para los *Lactobacillus* esta concentración mínima recomendada se mantenía hasta 9 días después de la fecha señalada, mientras que con *Bifidobacterium* los

valores eran inferiores a la cantidad recomendada a los 6 días después de la fecha establecida.

Se ha evaluado el efecto de la suplementación con cisteína y diferentes proteínas sobre el pH, acidez, potencial redox y viabilidad de microorganismos en yogurt; Dave y Shah (1998) encontraron que en yogurt con *Lactobacillus acidophilus, Bifidobacterium sp.* y *Streptococcus termophilus* la suplementación afecta el tiempo de incubación necesario para alcanzar el pH 4.5 que se requiere para la coagulación, y que a ese valor de pH se reduce la cuenta de *Bifidobacterium sp.* hasta en tres ciclos logarítmicos.

Otro ingrediente que se utiliza en la elaboración de productos lácteos fermentados es el hidrolizado de caseína empleado con la finalidad de reducir el tiempo de fermentación y aumentar la estabilidad (viabilidad) de los probióticos, pero este aditivos afecta negativamente la viscosidad y proporciona un sabor amargo al alimento final, una opción es utilizar el hidrolizado de proteína de suero de leche con menos efectos negativos pero tiene un mayor costo (Sodini *et al*., 2002).

Para disminuir la mortalidad de probióticos por el bajo pH del yogurt se realizaron pruebas de encapsulamiento de los microorganismos. Adhikari y col. (2000) utilizaron *k*-carragenina y observaron un aumento en la sobrevivencia de un 70 a 78%, sin embargo, la adición de la carragenina disminuyó la aceptación del yogurt.

También Gardiner y col. (2000) desarrollaron una leche descremada en polvo que contiene las cepas probióticas derivadas de humanos *Lactobacillus paracasei* NFBC 338 y *Lactobacillus salivarius* UCC 118. La deshidratación se realizó con un método de aspersión y se encontró que este proceso no afecta la viabilidad de los microorganismos ni la producción de la bacteriocina de *Lactobacillus salivarius*, y se demostró así que la liofilización puede ser utilizada para producir grandes cantidades de probióticos para uso industrial. Posteriormente, Carvalho y col. 2004 establecen las ventajas que poseen los

cultivos liofilizados en la conservación con respecto a otros métodos de preparación.

Por otra parte, Ustunol y Gandhi (2001) observaron que el crecimiento y la viabilidad de *Bifidobacterium* spp se aumenta cuando la leche se endulza con miel al 5%, no así cuando se endulza con sacarosa, fructosa o glucosa. Desmond y col. (2002) demostraron que *Lactobacillus paracasei* NFBC 338 puede desarrollar una termotolerancia de 300 a 700 veces por calentamiento previo a nivel subletal. Además, la misma cepa sometida a estrés con sal produce una protección cruzada; es importante comprender a profundidad estos procesos para determinar si un pretratamiento a las cepas, permitirá mejorar la viabilidad de los probióticos liofilizados.

La leche de soya también se ha evaluado como vehículo de probióticos. Shimakawa y col. (2003) agregaron *Bifidobacterium breve* cepa yakult en concentración de 10^9 UFC/ml sin cambios por 20 días a 10º C.

2.8.2. Quesos

En 1998, Gardiner y col. desarrollaron un queso cheddar, que contenía una cepa probiótica de *Lactobacillus paracasei* y *L. salivarius*, y demostraron que este producto puede ser un vehículo efectivo para que los probióticos puedan ser consumidos. El mismo grupo de investigadores realizó un queso cheddar a escala piloto con cepas liofilizadas de *Lactobacillus paracasei* NFBC338 (Rif^r), la cepa liofilizada contenía 10^9 UFC/g y el queso un día después de elaborado presentó 10^7 UFC/g, esta concentración se mantuvo hasta después de tres meses, la adición de probióticos no afectó la calidad sensorial del queso (Gardiner *et al.,* 2002).

En Argentina se probaron 14 combinaciones diferentes de 2 ó 3 microorganismos probióticos en la elaboración de un queso fresco que además contenía *Streptococcus termophilus* y *Lactococcus lactis* como cultivo iniciador. La mejor mezcla de probióticos fue *L. acidophilus*, *L. casei* y *Bifidobacterium*

con una excelente viabilidad hasta por 60 días con una reducción menor de 1 ciclo logarítmico de UFC/g (Vinderola *et al.,* 2000).

En Turquía Kasimoglu y col. (2004) elaboraron un queso blanco con *Lactobacillus acidophilus* y encontraron que los microorganismos sobreviven en cantidades superiores a 10^7 UFC/g en empaques a vacío, por los 90 días necesarios para la maduración.

Corbo y col. (2001) elaboraron un queso duro tipo Canestrato Pugliese con *Bifidobacterium bifidum* Bb02*, B. longum* Bb 46 o ambos y observaron una buena sobrevivencia de los probióticos (en especial *B. bifidum* con reducción de 1 ciclo logarítmico en 90 días de almacenamiento). No se observaron diferencias significativas en la evaluación sensorial y en la composición química a excepción del ácido acético con una mayor concentración en el queso con probióticos, así como también una mayor actividad de β-galactosidasa. Resultados muy similares fueron reportados por Daigle y col. (1999) al elaborar un queso tipo cheddar suplementado con *B. infantis* donde tampoco se observó reducción significativa en el contenido del probiótico en 12 semanas. Rogelj y col. (2002) también desarrollaron un queso con *L. acidophilus* con una buena viabilidad hasta por seis semanas.

Brearty y col. (2001) elaboraron un queso cheddar a escala piloto con dos cepas diferentes de *Bifidobacterium* (*B. lactis* Bb12 y *B. longum* BB536) con igual cantidad de inóculo y encontraron que con la adición de *B. longum* BB536 no se afecta la composición química del queso, pero se observó una pobre sobrevivencia del probiótico (10^5 UFC/g), mientras que, *B. lactis* Bb12 presentó mayor sobrevivencia (10^8 UFC/g) pero con un contenido de humedad mayor al permitido en la normatividad.

Por otro lado, Gardiner y col. en 1999 elaboraron un queso cheddar como vehículo de *Enterococcus faecium*, Este queso se analizó *in vitro* con jugo gástrico porcino y se encontró una sobrevivencia muy favorable del probiótico

durante la maduración hasta por 15 meses, se observó que el queso ofrece un efecto de amortiguador de pH que proporciona al probiótico una protección aun mejor que cuando se incorpora en yogurt.

Boylston y col. (2004) analizaron que los quesos reúnen las condiciones del medio ambiente necesarias para la sobrevivencia de *Bifidobacterium* (pH y anaerobiosis), sin embargo, en el desarrollo de los diferentes productos se requiere que los probióticos no generen características sensoriales adversas.

Comentario [LBE2]: ¿O 2004 ?

En la elaboración de un queso "Pikantne" típico de Estonia, se probó si la forma de incorporación de *Lactobacillus fermentum* ME-3 influía en las características finales del producto, el probiótico fue incorporado añadiéndolo a la leche simultáneamente con los cultivos iniciadores y después del desuerado, se observaron mejores propiedades sensoriales en el queso con los probióticos inoculados desde el inicio aunque con una ligera disminución de la cantidad de células viables (Songisepp *et al.,* 2004).

2.8.3. Otros alimentos

Se ha demostrado que otros alimentos poseen las características para permitir el crecimiento de bacterias ácido lácticas y probióticas al ser adicionados sin ser afectados sensorialmente.

Se han desarrollados helados con probióticos; por ejemplo, López y col. (1998) desarrollaron helado de yogurt y observaron la sobrevivencia de los microorganismos por un período mayor a 1 año. Mientras que Alamprese y col. en el 2002 elaboraron un helado con *Lactobacillus johnsonii* encontrando una sobrevivencia del probiótico por mas de ocho meses.

En Brasil, se desarrolló una bebida con suero de queso de búfalo (35%), leche de soya (30%) y leche de oveja (35%) con *Bifidobacterium adolescentis,* el producto tuvo una buena aceptación y sobrevivencia del probiótico y no se

observaron cambios en las características sensoriales con respecto al control sin probióticos (Macedo *et al.,* 1999).

Khalil y Mansour (1998) elaboraron una mayonesa que contiene *Bifidobacterium bifidum* y *B. infantis* logrando una sobrevivencia de 8 y 12 semanas respectivamente, al encapsular las cepas con polisacáridos. Mientras que Tharmaraj y Shah (2004) desarrollaron un dip (de cebolla y queso francés) con diferentes microorganismos probióticos (*Lactobacillus acidophilus, L. paracasei* subsp. *paracasei*, *Bifidobacterium animalis* y *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii),* observaron que al adicionarlos juntos se generó antagonismo entre las cepas, aunque es factible obtener buenos resultados con cepas individuales.

También se han desarrollado productos de cereales con probióticos y algunos de ellos ya están a la venta en algunos países europeos. Molin, en el 2001, reporta la elaboración de un producto a base avena fermentada con *Lactobacillus plantarum* 299v mezclada con bebida de frutas que fue probada en humanos con resultados positivos en pacientes de colon irritable.

En México, se comercializan alimentos con probióticos en presentaciones de bebidas lácteas, yogurt y leches en polvo para lactantes. Es importante señalar que debe darse conjuntamente la investigación sobre los efectos benéficos de los probióticos con el desarrollo tecnológico de los productos que contienen estos microorganismos, Así mismo es necesario que las declaraciones sobre salud que proponen los productores, estén avaladas por estudios serios y confiables, contribuyendo a que la población disponga de mejores alimentos que le permitan mantener o recuperar la salud.

2.9. INOCUIDAD DE PROBIÓTICOS

Un requisito indispensable en la elaboración de alimentos con probióticos es la certeza de que los microorganismos adicionados son inocuos. La inocuidad de los probióticos se investiga tradicionalmente mediante experimentos de

consumo a largo plazo; algunas especies de los géneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc* y *Pediococus* han sido utilizados en el procesado de alimentos desde hace siglos sin reportes de efectos negativos, por lo que la FDA (Administración de alimentos y medicamentos de los Estados Unidos de Norteamérica) los ha considerado como productos GRAS (Generally Recognized As Safe) (Ishibashi y Yamazaki, 2001).

Entre los estudios a largo plazo donde se analiza la inocuidad del consumo de probióticos se encuentra el de Hatakka y col. (2001). Es un experimento doble ciego, con placebo, aleatorio, que incluyó 571 niños saludables de 1 a 6 años con el objetivo de probar si *Lactobacillus GG* reduce las infecciones gastrointestinales y respiratorias; el estudio se realizó durante siete meses, en ese tiempo no se observaron efectos negativos por el consumo de 10^8 UFC/día y se observó una reducción de 16% en los días de fiebre, reducción de complicaciones de las infecciones respiratorias así como las debidas al tratamiento con antibióticos en el grupo que consumió el probiótico.

Otro estudio a largo plazo fue desarrollado por Saavedra y col. en el 2004 quienes en un experimento doble ciego, con placebo, aleatorio, que incluyó 311 niños saludables de 3 a 24 meses a los cuales se les administró *Bifidobacterium lactis* y *Streptococcus termophilus* por 18 meses; se observó que el probiótico no afectó el crecimiento, ni los índices de talla/edad, peso/edad, peso/talla, y tampoco se reportaron diarreas ni gases, el efecto que se encontró fue una mejoría significativa en la irritabilidad por cólicos y una disminución significativa en el uso de antibióticos.

Otros investigadores como Tannock y col. 2000, investigaron la flora microbiana en sujetos sanos por un período de tiempo de 6 meses de control, seguido por 6 meses de prueba donde ingirieron diariamente productos lácteos con $1.6X10^9$ UFC de *Lactobacillus rhamnosus* DR20 y un período posterior de 3 meses; concluyeron que el probiótico ingerido alteró el contenido de *Lactobacillus* y *Enterococos* sin afectar otros factores bioquímicos, bacteriológicos o de salud.

Ishibashi y Yamazaki (2001) recomiendan que para evaluar la inocuidad de los probióticos se investiguen aspectos de patogenicidad, infectividad, virulencia, toxicidad y actividad metabólica, debido a que se han reportado casos de bacterias ácido lácticas aisladas de pacientes con bacteremia, endocarditis e infecciones tópicas, donde existe la posibilidad de que ocurriera translocación (invasión) de estos microorganismos y llegaran a diversos órganos, éste aspecto adquiere mayor relevancia en personas debilitadas o inmunocomprometidas.

Duffy, en el año 2000, analizó las interacciones que se presentan en la translocación en el intestino inmaduro, destacando la poca frecuencia con la que se observa translocación de bacterias anaerobias, al eliminar éstas mediante tratamientos antimicrobianos se facilita la translocación de bacterias intestinales facultativas como algunas enteropatógenas, por lo tanto, concluye que el consumo de bifidobacterias pudiera tener un efecto preventivo.

Pavan y col. (2003) evaluaron la seguridad de dos especies de *Lactobacillus plantarum* y *L salivarius* en ratones saludables y un modelo de colitis inducido por 2,4,6-trinitrobenceno (TNBS), encontraron que *L. plantarum* NCIMB8826 no induce efectos negativos como pérdida de peso, inflamación intestinal en los animales sanos ni en los tratados con TNBS, tampoco se modifican los niveles de citocinas, además, se presenta una reducción de la translocación de la flora endógena en los ratones tratados con TNBS después de la administración del probiótico.

Actualmente, para asegurar la inocuidad también debe tomarse en cuenta el aspecto de la carga genética que los probióticos pueden transferir a otras especies o géneros como los genes de resistencia a antibióticos. Ya desde 1998 Salminen y col. indican la importancia de investigar la resistencia a antibióticos de las cepas probióticas que se incorporan a los diferentes productos, en especial la resistencia a antibióticos asociada a plásmidos. Años después, Temmerman y col. (2003) analizaron 268 cepas de productos

europeos (bebidas y suplementos) que declaraban contener probióticos y encontraron que el 69.7% de las cepas presentan resistencia a antibióticos, los resultados mas elevados son para kanamicina (79%), vancomicina (65%), tetraciclina (26%) y penicilina G (23%), un 68.4% presentó resistencia múltiple. Por otra parte, Danielsen y Wind (2003) analizaron 62 cepas de *Lactobacillus* spp. y también encontraron resistencia principalmente a antibióticos como vancomicina, teicoplanina, tetraciclina, norfloxacina, ciprofloxacina y sugieren que a todas las cepas de probióticos usados comercialmente se les determine la concentración mínima inhibitoria a los diferentes antibióticos.

En el grado en que se cumplan las guías para la evaluación de probióticos en alimentos, propuestas por expertos de la FAO y la OMS en el 2002 se obtendrá una mayor certeza de la inocuidad de los productos con probióticos, y en la medida de que las declaraciones en las etiquetas se redacten con mayor claridad en los productos, se obtendrán mayores beneficios a la salud de la población.

2.10. EFECTO DE LOS PROBIÓTICOS EN ALIMENTOS

Los efectos de los probióticos sobre diversas poblaciones microbianas *in vitro* y a nivel intestinal están bien documentados, por lo que se ha investigado si es posible también lograr un margen interesante de inhibición de las bacterias patógenas eventualmente presentes en los alimentos, sin provocar cambios negativos que se reflejen en la calidad comercial del alimento (Torres, 2002).

Se ha descrito la presencia de bacteriocinas en diversos alimentos, y se han realizado investigaciones para determinar las condiciones necesarias para la producción de los diversos compuestos antimicrobianos en los alimentos y la eficiencia de éstos.

2.10.1. Bacteriocinas en alimentos

Existen numerosas bacteriocinas producidas por las bacterias ácido lácticas y cada una tiene espectros de inhibición particulares, esta característica es

aprovechada en la industria de los alimentos. Algunas bacteriocinas se utilizan en procesos que requieren la inhibición del crecimiento de bacterias indeseables específicas relacionadas estrechamente con la cepa productora de la bacteriocina, y, en otros casos se aplican para inhibir el crecimiento de microorganismos degradadores de alimentos o de patógenos como algunas especies de *Staphylococcus* y *Listeria* (Stiles,1996).

La Nisina, descrita en 1928, fue la primer bacteriocina aislada a partir de la bacteria ácido láctica *Lactococcus lactis* subsp *lactis*. Es la bacteriocina mejor caracterizada y es utilizada como conservador de alimentos (Delves-Broughton, 1990; Delves-Broughton *et al.,* 1996); su uso en alimentos fue aprobado por la Organización Mundial de la Salud en 1969, por la Unión Europea en 1983 y por la FDA en 1987, es la única reconocida por la FDA con la categoría GRAS, para el año 1999 su uso estaba permitido en 52 países (Garduño, 1999). La nisina se produce de forma natural en algunos productos lácteos y se utiliza como un aditivo en la producción de alimentos para prevenir la descomposición ocasionada por bacterias Gram positivas, especialmente de los géneros *Clostridium*, *Staphylococcus*, *Bacillus* y *Listeria*. No presenta toxicidad hasta niveles de 3.3×10^6 UI/kg de peso y es metabolizada por enzimas intestinales, es estable al calor y no confiere sabor cuando se adiciona a los alimentos (Delves-Broughton, 1990; Garduño, 1999).

Maoz y col. (2003) analizaron la diversidad y el potencial antilisterial de dos consorcios utilizados en la elaboración de quesos tipo Munster producidos independientemente. En ambos quesos fueron aisladas e identificadas aproximadamente 400 cepas diferentes, los consorcios fueron diferentes en cada queso en el tipo de microorganismos, estabilidad de los mismos, y en capacidad antilisterial, lo que indica la complejidad de las interacciones entre los diferentes microorganismos.

Ryan y col. (1996) utilizaron cultivos iniciadores comerciales de fermentación de elaboración de queso Cheddar de *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* DPC4268

con un gen incorporado de *L. lactis* DPC3147, que codifica para lactacina 3147; encontraron que las cepas transconjugadas son adecuadas para la producción de queso cheddar, de manera similar a los iniciadores no transconjugados; la cepa desarrollada produjo bacteriocina en el queso que fue detectada por mas de seis meses. La bacteriocina producida redujo la cantidad de bacterias lácticas no iniciadoras lo que sugirere que podría ser un factor para controlar la microflora del queso en el proceso de maduración. El mismo grupo de investigadores en el año 2001, diseñaron una estrategia para manipular la flora del queso cheddar, con *Lactococcus lactis* DPC3147 productor de lactacina 3147, y la cepa *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* DPC5336 aislada de queso y responsable del buen sabor, de esta última se desarrolló una variante (DPC5337) 32 veces menos sensible a la lactacina que la cepa original, esto permitió que durante la maduración del queso esta cepa, al ser menos sensible a la bacteriocina, se desarrollara de 100 a 1000 veces mas, dando como resultado un queso con mejor sabor (Ryan *et al.,* 2001).

Se probó la cepa de *L. lactis* subsp. lactis biovar diacetylactis UL719 en combinación con un cultivo comercial en su capacidad de producir ácido y nisina en queso Gouda. Se encontró que la proporción mas eficiente era de 0.6 del probióticos y 1.4 de las cepas de iniciadores de fermentación; con esta mezcla de microorganismos se detectó la presencia de nisina en glóbulos de grasa, micelas de caseína y en la interfase grasa-caseina, no así cuando se utilizó una menor concentración del probiótico (Bouksaim *et al.,* 2000).

Una estrategia para el control de los microorganismos en alimentos es utilizar de manera conjunta distintas bacteriocinas con diferente espectro de acción. Mulet-Powel y col. (1998) mezclaron diferentes bacteriocinas y encontraron que se presentan cuatro diferentes interacciones, de sinergia, de adición, de no interacción y el de antagonismo. De las bacteriocinas analizadas, la pediocina AcH presentó mayores efectos sinérgicos, considerándola como un buen candidato bioprotector.

También se estudió la capacidad de sobrevivencia y de producir bacteriocinas en cepas de probióticos después de un proceso de liofilización al utilizar diferentes matrices (leche descremada y suero de leche) así como diferentes temperaturas y velocidades de aire; no se encontró diferencia entre las matrices usadas, en todas las cepas se conservó la capacidad antagónica después de la liofilización; sin embargo, se observó una reducción significativa de la viabilidad en los productos liofilizados a los dos meses de almacenamiento (Mauriello *et al*., 1999).

Se ha observado otro efecto benéfico de los probióticos en los quesos, algunas bacterias ácido lácticas durante el proceso de maduración, pueden producir la descarboxilación de tirosina con la consecuente producción de histamina, cuando se alcanzan concentraciones de 500 a 1000 mg/kg se presenta intoxicación por histamina; los cultivos iniciadores productores de bacteriocinas pueden inhibir las cepas de microorganismos responsables de la formación de la histamina y disminuir el riesgo de intoxicación (Joosten y Nuñez, 1996).

Fimland y col. (1996) lograron producir bacteriocinas sintéticas más estables que las aisladas de manera natural, presumiblemente por la ausencia de proteasas contaminantes, pero estas bacteriocinas pierden actividad después de varios meses de almacenamiento.

En estudios genéticos realizados por Allison y col. (1995) se introdujo el operon de lactacina F en *Carnobacterium piscicola* LV17 y se logró la producción simultánea de lactacina F y carnobacteriocinas.

También Horn y col. (1999) realizaron estudios para introducir los genes necesarios para la producción de pediocina PA-1 en cepas de *L. lactis* F15876 y se produjo de manera simultánea pediocina PA-1 y nisina A.

Johnsen y col. en el año 2000 encontraron que la pediocina PA-1 pierde actividad durante el almacenamiento a temperatura ambiente y a 4º C; esta reducción puede ser prevenida mediante ingeniería genética por la sustitución

de la metionina en la posición 31 por alanina, isoleucina o leucina.

También con el empleo de bifidobacterias fue posible prolongar la frescura de filetes de pescado bajo refrigeración hasta por tres días, con respecto a los controles no adicionados del probiótico (Torres, 2002).

2.10.2. Efectos de los probióticos sobre microorganismos patógenos en alimentos

Desde hace décadas las bacterias ácido lácticas se utilizan en la industria alimenticia como bioconservadores debido a la producción de bacteriocinas y otras sustancias que ejercen acción antibacteriana que contribuyen a la prevención de la descomposición de los alimentos (Campos, 2002).

La actividad antimicrobiana de las bacteriocinas representa un gran potencial para la industria alimenticia ya que al utilizarlos como conservadores biológicos puros en un momento dado podrían reemplazar a los conservadores químicos ya que tienen la ventaja de ser proteínas que se pueden metabolizar.

Las investigaciones en este campo muestran resultados contradictorias por las diferentes cepas empleadas y en diseños experimentales muy diversos. Berrocal y col. (2002) evaluaron la actividad de cultivos probióticos sobre *Listeria monocytogenes* durante la producción de yogurt adicionados con una mezcla de *Bifidobacterium longum*, *B. bifidum*, *B. infantis* y *Lactobacillus acidophilus*, sin resultados positivos con inóculos del patógeno de 0 a 10^6 UFC/ml. Mientras que Barrantes y col. (2004) evaluaron el efecto de *Lactobacillus casei* y *L. acidophilus* adicionados a yogurt comercial sobre *Listeria monocytogenes* y *E. coli* O157:H7, observaron que el contenido de Listeria se detectó en el yogurt con y sin probióticos hasta los ocho y veinte días, respectivamente, mientras que para *E. coli* O157:H7 los tiempos fueron mayores 16 y 32 días respectivamente. El mismo yogurt fue evaluado en la inhibición de *Staphylococcus aureus* a 10^9 y 10^7 UFC/g, se encontró que la población de *S. aureus* en ambas concentraciones se reducía hasta a niveles

indetectables en ocho días, sin embargo la termonucleasa fue detectada durante los 28 días que duró el experimento (Salvatierra *et al.,* 2004).

Benkerroum y col. en 2002 aislaron de levadura de panadería una cepa de *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* B productora de bacteriocina activa contra *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus;* la bacteriocina fue parcialmente purificada y probada en yogurt inoculado con los microorganismos patógenos y se encontró que la bacteriocina producida *in situ* fue mas efectiva contra *Listeria* ya que la inhibió hasta niveles inferiores al de detección en las primeras 24 horas de procesado, no así con *S. aureus* que logró ser inhibida hasta el décimo día, la bacteriocina también alargó la vida de anaquel del yogurt por cinco días.

Se ha investigado el efecto combinado de las variaciones en temperatura, pH y concentración de NaCl sobre el efecto inhibitorio de la nisina en *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus* encontrándose que las bajas temperaturas y las altas concentraciones de NaCl potencian el efecto antagonista de la nisina sobre estos microorganismos (Thomas y Wimpenny, 1996).

En queso tipo Munster elaborado por Eppert y col. (1997) con un consorcio comercial de microorganismos utilizados para la maduración que contenía una cepa de *Brevibacterium linens* productora de linocin M1 (lin^+) se observó inhibición de *Listeria* spp, en 1 a 2 unidades logarítmicas, en algunos casos hasta se logró la inhibición completa, mientras que con otro consorcio no productor de linocin M18 (lin^-) no se presentó la inhibición.

Ennahar y col. (1996) aislaron 1962 cepas de queso tipo Munster y seleccionaron una con actividad contra *Listeria*. La cepa fue identificada como *Lactobacillus plantarum* WHE92, el compuesto activo contra *Listeria* de naturaleza proteica, fue purificado y secuenciado y se encontró una estructura idéntica a la pediocina AcH producida por *Pediococcus acidilactici.* Siendo éste el primer reporte de que diferentes especies de probióticos producen la misma

bacteriocina. Asimismo encontraron que *L. plantarum* WHE92 genera mayor cantidad de bacteriocina y en un rango mas amplio de pH. Así mismo se consiguió una inhibición casi completa de *Listeria monocytogenes* en el mismo tipo de queso con la adición de una cepa de *Lactobacillus plantarum* productor de pediocina, aunque se encontró que se pueden generar mutantes de *Listeria* resistentes a la pediocina, por lo que esta forma de control del patógeno no podría ser usado en la industria de quesos por largos períodos de tiempo (Loessner *et al*., 2003).

La contaminación de *Listeria monocytogenes* en queso tipo Munster puede ser prevenida por la aspersión de una suspensión de células de *Lactobacillus plantarum* WHE92 a una concentración de 10^5 UFC/ml (Ennahar *et al.,* 1998), con este tratamiento el microorganismo patógeno fue detectado a concentraciones menos de 0.5 x 10^1UFC/g a siete días después de su elaboración y no fue capaz de crecer en el queso, la adición del microorganismo probiótico no afectó negativamente la evolución del proceso de maduración.

Buyong y col. (1998) estudiaron el efecto sobre *Listeria monocytogenes* en un queso cheddar preparado con un cultivo iniciador con *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* MM217 que contenía un plásmido que codifica para pediocina PA-1. La *Listeria* fue inoculada a la leche en una concentración de 10^3 UFC/ml, en el queso control (sin el plásmido) las cuentas del patógeno se incrementaron hasta 10^7 UFC/g en las primeras dos semanas y luego disminuyeron hasta 10^2 UFC/g a los seis meses de maduración, mientras que el queso elaborado con el plásmido a una semana de elaboración contenía 10^2 UFC/g y decreció hasta 10 UFC/g a los tres meses de maduración, se comprobó el efecto antilisterial por la inserción del plásmido; además, se encontró que las propiedades organolépticas, el valor de pH, los niveles de NaCl y humedad en los dos quesos fueron similares.

Benech y col. (2002) compararon el efecto de inhibición sobre *Listeria innocua* con la adición de nisina Z encapsulada en liposomas y la producida *in situ* en

queso cheddar. Se elaboró el producto con una mezcla de iniciadores que contenía *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar diacetylactis UL719,y se agregó la *Listeria* a concentraciónes de 10^5 a 10^6 UFC/ml; el efecto de reducción de *Listeria* fue inmediato de 1.5 a 3 unidades logarítmicas en ambos quesos (con producción *in situ* y con adición de liposomas con nisina Z), pero a seis meses de maduración el queso con nisina encapsulada y con producción *in situ* tuvieron menos de 10 y 10^4 UFC/g de *Listeria,* respectivamente, concluyendo que la encapsulación de la nisina aumenta su estabilidad y por lo tanto el efecto inhibitorio contra el patógeno.

La influencia de las bacterias ácido lácticas y probióticas (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* y *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*) también ha sido evaluadas sobre *Escherichia coli* O157:H7 en queso Minas (queso fresco típico de Brasil) donde se encontró que las bacterias lácticas usadas disminuyen significativamente la cantidad de *E. coli* O157:H7, por lo que esta práctica puede ser efectiva para disminuir los riesgos en quesos frescos, que por sus características, son muy vulnerables de contaminarse (Saad *et al.,* 2001).

También se han presentado resultados de inhibición de patógenos por bacteriocinas en sistemas de carne. En un estudio realizado por Winkowski y col. (1993) se encontró que *L. bavaricus* MN puede inhibir a la *Listeria monocytogenes* de manera dependiente de la concentración y de forma más eficiente a 4º C, lo que se confirma el potencial conservador biológico de los probióticos en diversos alimentos.

En carne de cerdo Senne y Gilliland (2003) estudiaron el efecto antagónico de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* contra *Salmonella enteritidis* var. Typhimurium, *E. coli* O157:H7 y microorganismos causantes de deterioro; se encontró diferencia significativa en el contenido de los patógenos con la adición del probiótico en la superficie de la carne, asi como también una reducción en el contenido de microorganismos psicrotrofos, lo que sugiere que los cultivos

lácticos pueden ser usados en el control de patógenos y para aumentar la vida útil del producto.

De productos cárnicos listos para consumir (jamón y salchicha frankfurt) se aislaron 49 cepas de bacterias ácido lácticas y se revisaron en su capacidad para inhibir el crecimiento de *Listeria monocytogenes* a temperatura de refrigeración; las cepas con mejores resultados fueron *Pediococcus acidilactici, Lactobacillus casei y L. paracasei,* el efecto fue bactericida en las salchichas y bacteriostatico en el jamon, en los *Lactobacillus* se presentó una disminución significativa del pH no así en *P. acidilactici*, y se concluye que estos probióticos pueden contribuir en la inocuidad de los productos por la disminución del crecimiento de *L. monocytogenes* por debajo de niveles infectantes (Amézquita y Brashears, 2002).

De acuerdo a todo lo anterior, es importante resaltar, que solo ciertos microorganismos han demostrado poseer las características necesarias para ser considerados probióticos, y es difícil encontrar uno que reúna todas estas características (probiótico ideal), así mismo, no todos tienen los mismos efectos benéficos debido a la diversidad genética entre las diferentes especies y hasta entre las cepas de la misma especie. Por otro lado, la cantidad de microorganismos que se requiere ingerir no es igual para conseguir un efecto específico y se ha encontrado que los efectos son cepa dependiente. También se ha reportado por algunos investigadores que en algunos productos los microorganismos declarados en la etiqueta no son los que se encuentran en el producto, y por lo tanto existe la posibilidad de no generar un efecto positivo esperado, sino también, que algunos de los microorganismos pudieran ser un riesgo para los consumidores. Debido a eso surgen diversas pregunta: ¿los productos que se comercializan en nuestra región en realidad contienen probióticos?, ¿se encuentran en las cantidades necesarias para generar un efecto positivo?, ¿los microorganismos probióticos adicionados sobreviven a las condiciones en las que permanece el producto hasta que es consumido o hasta la fecha de caducidad?, ¿son seguros microbiologicamente?

Por otra parte, se ha puesto de manifiesto que algunos microorganismos probióticos poseen la capacidad de generar compuestos que inhiben a microorganismos estrechamente (filogenéticamente) relacionados y aun hasta microorganismos patógenos, esta propiedad podría ser un valor agregado si los probióticos generaran estos compuestos en los alimentos utilizados como vehículo y contrarrestan la presencia de otros microorganismos causantes de deterioro y tal vez también de microorganismos patógenos lo que sería de mucha utilidad ya que en nuestro país existe un alto índice de enfermedades infecciosas en especial las causantes de gastroenteritis, sin embargo se desconoce si los microorganismos que se consumen poseen esa capacidad, y si los probióticos añadidos son igualmente efectivos contra los microorganismos patógenos mas comunes o si existe un microorganismo o alimento que los contenga con mejor potencial inhibitorio.

Una estrategia para que los efectos benéficos de los probióticos lleguen a mayor cantidad de personas es producir más alimentos o presentaciones que los contengan. En la actualidad, los productos que se comercializan están enfocados principalmente a la alimentación de infantes (leches en polvo para lactantes y bebidas lácteas) por lo que es conveniente desarrollar alimentos con probióticos de consumo familiar. Dentro de los reportes de investigación se encuentran buenos resultados en la elaboración de quesos, en especial quesos madurados. Sin embargo, en México se consumen principalmente quesos frescos y de ellos el queso panela por su bajo costo llega a un mayor número de familias pudiendo contribuir a mejorar la salud de más población.

Por lo que se pretende evaluar si el queso panela puede ser utilizado como un vehículo acarreador de probióticos a través de analisar si los microorganismos añadidos sobreviven en este producto, el efecto en la calidad microbiológica y vida de anaquel del producto; así como la influencia de los probióticos en las propiedades sensoriales que determinan la aceptabilidad del producto.

En este trabajo se busca para confirmar si la adición de los probióticos puede inhibir el crecimiento de *S. enteritidis* var. Typhimurium lo que podría contribuir a disminuir el riesgo de gastroenteritis y mejorar la inocuidad del producto.

2.11. HIPÓTESIS

El queso fresco es un vehículo adecuado para transportar microorganismos probióticos que son capaces de inhibir el crecimiento de *Salmonella enteritiris* var. Typhimurium

2.12. OBJETIVOS

2.12.1. Objetivo general

Desarrollar un queso con probióticos y probar su eficiencia en la inhibición del crecimiento de *Salmonella enteritiris* var. Typhimurium.

2.12.2. Objetivos específicos

1. Analizar los productos con probióticos existentes en el mercado, identificar los microorganismos probióticos que contienen y su cantidad, así como la sobrevivencia de los mismos en las condiciones de manejo para su uso y la calidad microbiológica de los productos.
2. Determinar la acción antagónica *in vitro* de los probióticos contra microorganismos patógenos.
3. Elaborar queso fresco con probióticos, y evaluar la calidad microbiológica, la viabilidad de los microorganismos y la aceptabilidad del producto.
4. Determinar el efecto inhibitorio de los microorganismos probióticos sobre *Salmonella enteritiris* var. Typhimurium en quesos frescos.

CAPITULO 3

MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 ESTRATEGIA GENERAL DE ANÁLISIS

La estrategia general para el logro de los objetivos que se plantearon se esquematiza en la figura 1. En primer lugar, se buscó analizar los productos con probióticos que se comercializan, posteriormente se elaboró un queso fresco tipo panela con probióticos y se evaluó su capacidad de inhibir el crecimiento de *Salmonella enteritidis var.* Typhimurium.

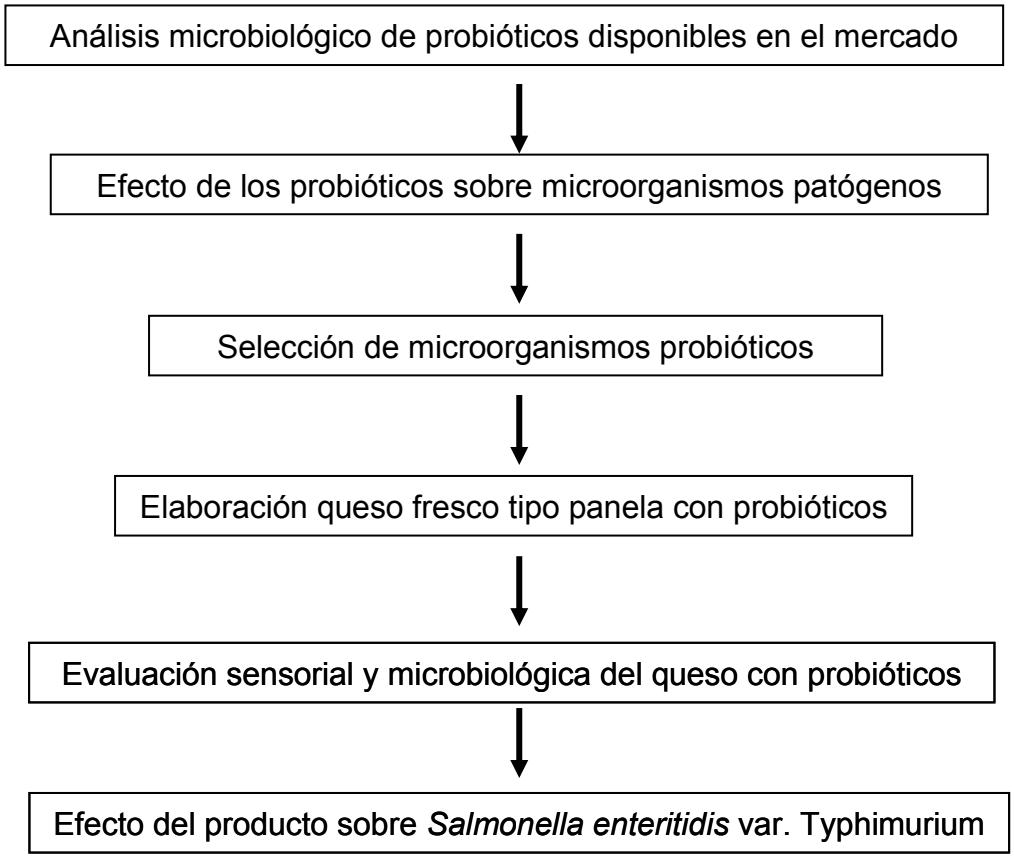


Figura 1. Estrategia general para obtener un queso fresco con probióticos con un efecto positivo demostrado sobre *Salmonella enteritidis var.* Typhimurium.

3.2. MATERIAL BIOLÓGICO, ACTIVACIÓN Y MANTENIMIENTO DE CEPAS

3.2.1. Productos con probióticos

Se trabajó con tres tipos de productos con diferentes características, 3 bebidas lácteas, 3 leches en polvo para lactantes y 4 suplementos. Todos los productos fueron procedentes de la zona metropolitana de Monterrey, N. L. México. El almacenamiento se realizó según las recomendaciones de los fabricantes las bebidas y uno de los suplementos a temperatura de refrigeración, mientras que las leches en polvo para lactantes y los demás suplementos en lugares secos y a temperatura ambiente.

3.2.2. Microorganismos

En esta investigación se utilizaron microorganismos patógenos y probióticos.

3.2.2.1. Microorganismos patógenos

Se utilizaron cepas de referencia de los siguientes microorganismos patógenos: *Salmonella enteritidis var.* Typhimurium (ATTC 13311), *S. enteritidis var. P*arathyphi Gpo A (ATCC 9150), *S. enteritidis var.* Enteritidis Gpo D (ATCC 13076), *Bacillus cereus* (ATCC 13061), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Listeria monocytogenes* (ATCC 7644), *Escherichia coli O157:H7* (ATCC 4350), *Escherichia coli O157* (LMS-FCB- UANL) y *Yersinia enterocolitica* (LMG-FCB-UANL). Las cepas fueron mantenidas a 4ºC, en agar soya tripticasa (AST) (Difco Laboratorios. Detroit, Mich).

3.2.2.2. Microorganismos probióticos

Se utilizaron 7 cepas: 4 cepas de *Lactobacillus casei rhamnosus,* una de *L. acidophilus,* una de *L. plantarum,* y una de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* (Bifido 2) proporcionadas por la compañía Lactilab de México. Las cepas liofilizadas fueron activadas y mantenidas a 4º C en agar Man-Rogosa-Sharp (MRS) (Difco Laboratorios. Detroit, Mich).

3.3 EVALUACIÓN DE LA CALIDAD DE LOS PRODUCTOS CON PROBIÓTICOS

La evaluación de los productos con probióticos se llevó a cabo de acuerdo al diagrama de la figura 2. Enseguida se describen cada uno de los apartados que se analizaron.

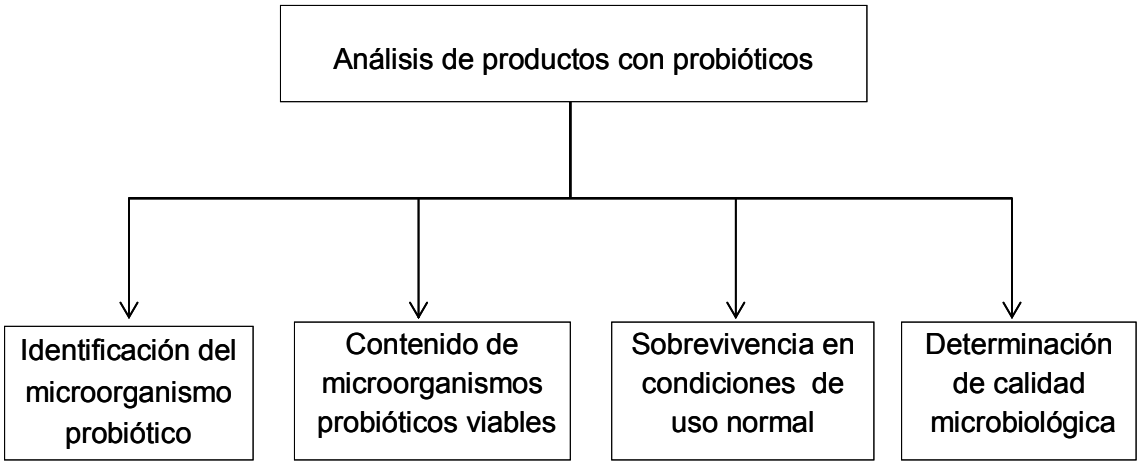


Figura 2. Aspectos a evaluar en los productos con probióticos.

3.3.1. Identificación de probióticos

Para la identificación de los probióticos primeramente se aislaron cepas cultivables de los diferentes productos y se resembraron en agar MRS hasta obtener cultivos puros, a estos se les realizó la tinción de Gram y se examinó su morfología celular, se buscó la presencia de la enzima fructosa 6 fosfato fosfocetolasa característica del género *Bifidobacterium.* Todas las cepas de

Lactobacillus y *Bifidobacterium* se identificaron hasta especie con el sistema API (bioMériux l' Etoile France).

3.3.1.1. Aislamiento

Los microorganismos probióticos de los diferentes productos se aislaron mediante su cultivo en agar MRS previas diluciones en buffer de fosfatos 0.3 mM, pH 7.2 y se incubaron a 37º C por 48 horas en condiciones de anaerobiosis, se tomaron colonias con diferente morfología y se resembraron por estría en tres campos nuevamente en agar MRS en iguales condiciones, las colonias que se aislaron se transfirieron a tubos con el mismo medio de cultivo para su identificación.

3.3.1.2. Gram y morfología celular

A las cepas aisladas se les realizó una tinción de Gram para confirmar que los microorganismos provenientes de los diferentes productos correspondieron a bacilos grampositivos característicos de los géneros *Lactobacillus*, *Lactococcus* y *Bifidobacterium*.

La tinción de Gram se realizó al colocar un frotis de la colonia sobre un portaobjetos y se fijó al calor, se tiñó con cristal violeta por 1 min; inmediatamente se lavó y tiñó con yodo de Gram por 1 min, se lavó y se le agregó alcohol-acetona y finalmente se le adicionó safranina durante 30 segundos, y se observaron al microscopio a 100X con aceite de inmersión.

3.3.1.3. Identificación del género Bifidobacterium

A las diferentes cepas que se aislaron se les realizó la prueba de fructosa 6 fosfato fosfocetolasa (F6PPK) para identificar a las que pertenecen al género *Bifidobacterium*. Esta determinación se llevó a cabo como se describe en el manual de Bergey (Scardovi, 1986) y a continuación se detalla.

Se cosecharon las células probióticas de 10 ml de caldo TPY cultivadas por 48 horas en condiciones anaerobias, se lavaron 2 veces con buffer de fosfatos 0.3 mM, pH 7.2 con cisteína, se resuspendieron en 1 ml de buffer y se sonicaron en frío (de 6 a 12 rms) por tres veces de 20 segundos cada uno. A la suspensión se le agregó 0.25 ml de NaF (6 mg/ml) y yodoacetato de sodio (10mg/ml), se le agregó 0.25 ml de fructosa 6 fosfato (80 mg/ml en agua), se incubó por 30 minutos a 37º C y se detuvo la reacción con la adición de 1.5 ml de hidroxilamina (1.39 g/ml) (recién ajustado a pH 6.5), después de 10 minutos a temperatura ambiente se añadió 1 ml de ácido tricloroácetico (15%), 1 ml de HCl 4M y 1ml de $FeCl_3.6\ H_2O$ (5 %) se mezcló por inversión y se dejó a temperatura ambiente de 1 a 2 minutos para el desarrollo de un anillo rojo violeta que indicó la presencia de la enzima y la inclusión al género *Bifidobacterium.*

3.3.1.4. Identificación de especies de probióticos

Las cepas de *Lactobacillus* se identificaron a partir de un cultivo puro mediante sistema API (bioMériux l' Etoile France); se utilizó medio CHL y galerías API 50 CH según las recomendaciones del fabricante. Para identificar los microorganismos del género *Bifidobacterium* se utilizó la galería API 20 A para anaerobios y los resultados se contrastaron manualmente con las pruebas bioquímicas reportadas en el Manual de Bergey (Scardovi, 1986).

3.3.2. Contenido de microorganismos probióticos viables

Se analizó la cantidad de probióticos viables mediante la cuenta en placa en Agar MRS a 35^{o} C por 72 horas en jarras de anaerobiosis con Gas Pak Plus System (BBL), y diluciones de 10^{-1} hasta 10^{-7} (Hamilton-Miller, *et al.,* 1999).

3.3.3. Sobrevivencia de microorganismos probióticos

La sobrevivencia de los microorganismos probióticos en las diferentes presentaciones se analizó mediante la cuenta en placa en agar MRS a intervalos seleccionados.

Para las bebidas lácteas se tomó una muestra mantenida a 4^{o} C cada tercer día y se analizó su cuenta de probióticos viables como se describió anteriormente (Torres, 2002).

Las leches en polvo para lactantes con probióticos se analizaron al tomar una muestra cada 10 días por 5 meses de una lata que se mantuvo a temperatura ambiente con el recipiente cerrado.

Los suplementos se analizaron cada semana durante 8 semanas y posteriormente cada mes hasta los 5 meses. Los productos se almacenaron según las indicaciones del fabricante (un producto a 4º C y los tres restantes a temperatura ambiente).

3.3.4. Calidad microbiológica de los productos con probióticos

La calidad de los productos con probióticos se determinó por medio de análisis microbiológicos de los diferentes microorganismos y su contrastación con la normatividad vigente en nuestro país.

3.3.4.1. Normatividad vigente

La calidad microbiológica de los productos se realizó de acuerdo a las especificaciones de las Normas Oficiales de Análisis emitidas por la Secretaría de Salud.

3.3.4.2. Normatividad de alimentos

Para las bebidas lácteas se tomó como referencia la NOM 185-SSA1 2002 Productos y Servicios. Mantequilla, crema, productos lácteos condensado azucarado, productos lácteos fermentados y acidificados, dulces a base de leche. Especificaciones sanitarias. Los análisis que se realizaron fueron: coliformes totales, cuenta en placa, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella*, hongos y levaduras.

Para leches en polvo para lactantes la referencia fue la NOM 131-SSA1 1995 Bienes y servicios. Alimentos para lactantes y niños de corta edad. Disposiciones y especificaciones sanitarias y nutrimentales. Los análisis que se realizaron fueron: Cuenta de bacterias aeróbicas en placa, coliformes totales, Número mas probable (NMP), *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* y *Escherichia coli*.

Para suplementos no existe una NOM por lo que se realizaron los mismos análisis que para los otros productos, estos análisis fueron: Coliformes totales, cuenta en placa, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella*, hongos y levaduras.

3.3.4.3. Técnicas de análisis microbiológicos oficiales

Para el análisis microbiológico de los productos con probióticos se siguieron las técnicas oficiales aprobadas y publicadas como NOM. A continuación se enlistan las utilizadas en la presente investigación.

La cuenta de bacterias mesófilas aerobias. Se realizó como se describe en la NOM 092-SSA1 1994. Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa.

La cuenta en placa de coliformes totales se realizó como se describe en la NOM 113-SSA1 1994. Método para la cuenta de microorganismos coliformes totales en placa.

La determinación de coliformes totales (NMP) se realizó como se describe en la NOM 112-SSA1 1994. Determinación de bacterias coliformes. Técnica de número más probable, y la determinación de coliformes fecales (NMP) se realizó como se describe en la NOM-000-SSA1-1996. Determinación de cuenta de organismos coliformes fecales por el número más probable (presuntiva de *E.coli*) en alimentos.

La cuenta de *Staphylococcus aureus* se realizó como se describe en la NOM 115-SSA1 1994. Método para determinación de *Staphylococcus aureus* en alimentos, mientras que el aislamiento de *Salmonella* se realizó como se describe en la NOM 114-SSA1 1994. Método para la determinación de *Salmonella* en alimentos, por último la cuenta de hongos y levaduras se realizó como se describe en la NOM 111-SSA1 1994. Método para la cuenta de mohos y levaduras en alimentos.

3.4. INHIBICIÓN DE PATÓGENOS POR MICROORGANISMOS PROBIÓTICOS

A las cepas de probióticos aisladas de los diferentes productos se les evaluó su capacidad de inhibir *in vitro* el crecimiento de diferentes microorganismos patógenos. Primero se realizó una prueba de actividad antimicrobiana y a las cepas positivas se les determinó la concentración mínima inhibitoria.

3.4.1. Actividad antimicrobiana

La actividad antimicrobiana se evaluó al medir los halos de inhibición que generaron los sobrenadantes de los diferentes probióticos que se aislaron (12 cepas de bebidas, 9 cepas de leches en polvo, 4 cepas de suplementos y 7 cultivos comerciales grado alimenticio liofilizados) en placas de agar Luria (Difco Laboratorios. Detroit, Mich.) que contenían los microorganismos patógenos de prueba (*Salmonella enteritidis var.* Typhimurium*, S. enteritidis var*. Parathyphi*, S. enteritidis var.* Enteritidis*, Bacillus cereus, Staphylococcus aureus, Listeria*

monocytogenes, Escherichia coli O157*, E. coli* O157:H7 y *Yersinia enterocolitica)* (Tagg, 1971).

Los microorganismos probióticos se cultivaron en caldo MRS en condiciones de anaerobiosis por 24 horas, posteriormente se ajustó el cultivo a una densidad óptica de 1.0 a 600 nm (4 de Mc Farland) (se utilizó un espectrofotómetro Beckman Coulter DU 640) y se centrifugó para obtener el sobrenadante. Por otro lado, se cultivaron los microorganismos patógenos en caldo soya tripticasa (Difco Laboratorios. Detroit, Mich) por 24 horas, los cultivos se ajustaron a una densidad óptica de 0.1 a 600 nm (1 de Mc Farland). Una muestra de 100 μl de ese cultivo ajustado fue colocado en placas de petri estériles y mezclado con agar Luria, una vez solidificado el agar se realizaron perforaciones de 5 mm de diámetro. En cada orificio se colocaron 30 μl del sobrenadante de los probióticos, y se permitió que el sobrenadante se difundiera en el agar. Se utilizaron cloranfenicol como control positivo y caldo MRS estéril como control negativo. Las placas fueron incubadas en posición invertida por 24 horas a 37º C y revisadas posteriormente para determinar la inhibición del crecimiento de los microorganismos patógenos. Las cepas se consideraron positivas cuando se observó un halo de inhibición de al menos 2 mm medido a partir del borde del orificio.

3.4.2. Cuantificación de la inhibición

Esta prueba se realizó solamente a las cepas de probióticos que demostraron actividad antimicrobiana. La obtención del sobrenadante y la elaboración de las placas con los patógenos de prueba se realizaron de manera similar que en el apartado 4.1, solo que para determinar el grado de inhibición se colocaron 5 volúmenes diferentes de sobrenadante (10, 15, 20, 25 y 30 μl). Se incubaron a 37º C por 24 horas y se determinó el volumen mínimo con el que se observó inhibición, se calcularon las Unidades de Actividad (UA) expresadas como el recíproco de la mayor dilución donde se presenta una zona de inhibición.

De igual manera, se utilizaron cloranfenicol como control positivo y caldo MRS estéril como control negativo, y se consideraron como positivas las cepas cuando se observó un halo de inhibición de mínimo 2 mm medido a partir del borde del orificio (Barefoot, 1994).

3.5. SELECCIÓN DE CEPAS PROBIÓTICAS

Para la selección de cepas de probióticos a utilizar en la elaboración del queso, se consideró en forma prioritaria las cepas liofilizadas con mejores resultados de actividad antimicrobiana sobre los microorganismos patógenos *in vitro*. A estas cepas se les realizaron pruebas de sobrevivencia en queso panela y se determinó la ausencia de alteraciones de las propiedades organolépticas en los quesos elaborados.

La sobrevivencia de los probióticos en queso se analizó al tomar una muestra mantenida a 4º C cada semana hasta los 14 días y determinar la cuenta de probióticos viables como se describió anteriormente.

En las propiedades organolépticas se consideraron las modificaciones en aroma, textura y sabor del queso con probióticos.

3.6. ELABORACIÓN Y EVALUACIÓN DE QUESO FRESCO CON PROBIÓTICOS

Se elaboró un queso panela a partir de leche pasteurizada y se le agregaron los microorganismos probióticos, el queso fue evaluado en aspectos como el contenido y la sobrevivencia de los probióticos, la calidad microbiológica, la vida de anaquel del producto y las características organolépticas.

3.6.1. Elaboración de queso con probióticos

Se elaboró un queso tipo panela de forma convencional, a partir de leche entera pasteurizada, con la adición de renina microbiana (Formase 46) para la coagulación de la caseína. Después de la operación de separación del suero y

salado la masa cuajada se distribuyó en dos porciones. A una de las porciones se le adicionó una mezcla de probióticos en proporciones iguales (*Lactobacillus casei rhamnosus*, *Lactobacillus plantarum* y *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*), previamente cultivados en caldo MRS y cosechados por centrifugación, a una concentración inicial de $1x10^{10}$ UFC/ml, al adicionar los probióticos el queso quedó con una concentración de $1.6x10^{8}$ UFC/g. La porción restante fue utilizada para elaborar el queso control, posteriormente el queso fue moldeado y prensado hasta obtener la consistencia deseada.

3.6.2. Evaluación de queso con probióticos

La evaluación de los productos con probióticos se llevó a cabo de manera similar a lo descrito en apartado 3.3 de esta metodología, incluyó la cuenta de microorganismos probióticos y sobrevivencia de los mismos en el queso, la evaluación microbiológica, análisis de vida de anaquel del queso y la evaluación sensorial del mismo.

3.6.2.1. Cuenta de microorganismos probióticos

Se realizó como se describe en el apartado 3.3.2 de esta sección.

3.6.2.2. Sobrevivencia de microorganismos probióticos

La sobrevivencia de los probióticos en quesos se realizó al tomar una muestra almacenada a 4^{o} C el día de su elaboración y los días 7, 14 y 21 y se analizó la cuenta de probióticos viables como se describió anteriormente.

3.6.2.3. Calidad microbiológica de queso con probióticos

La calidad microbiológica del queso con probióticos se realizó como se establece en la NOM 121-SSA1-1994 Quesos frescos, madurados y procesados. Especificaciones sanitarias, en sus especificaciones de coliformes fecales por NMP, cuenta de *Staphylococcus aureus,* cuenta de hongos, levaduras e investigación de *Salmonella y Listeria monocytogenes* con las

técnicas que se especifican en el apartado 3.3.4.3 y la NOM 143-SSA. Método de prueba microbiológica para alimentos. Determinación de *Listeria monocytogenes*.

3.6.3. Vida de anaquel de queso con probióticos

El queso con probióticos y el queso control se almacenaron de 2 a 6º C y cada 4 días se evaluaron los atributos de apariencia física, consistencia, aroma y sabor. Para el atributo de apariencia se buscó signos evidentes de manchas, viscosidad superficial, presencia de suero en abundancia, etc. En el atributo de consistencia se revisó la suavidad y la cohesión de la masa. En el aroma y sabor se buscaron cambios en estos atributos con respecto a lo que se considera *sui generis* o que mostraran indicios de alteración. Se realizaron tres experimentos para determinar la vida de anaquel.

3.6.4. Evaluación sensorial de queso con probióticos

La aceptabilidad del queso elaborado con probióticos fue realizada a través de dos pruebas, una analítica de diferenciación triangular para determinar si existe diferencia sensorialmente perceptible entre dos muestras y otra afectiva hedonista con la finalidad de conocer el nivel de agrado-desagrado de una muestra. Para realizar estas evaluaciones se elaboró queso con y sin probióticos como se describió en el punto 3.6.1 de este apartado de metodología.

3.6.4.1. Sujetos

Los sujetos que participaron en la evaluación sensorial fueron voluntarios de ambos sexos entre 18 y 45 años. Los participantes de la prueba de diferenciación triangular recibieron información clara y precisa del objetivo del estudio y permanecieron sin comer ni fumar al menos 4 horas antes de la evaluación.

3.6.4.2. Prueba analítica de diferenciación (Prueba triangular)

Se utilizó la prueba descrita por Pedrero y Pangbron (1989). Para esta prueba se contó con 55 estudiantes voluntarios de 4º semestre de la Licenciatura en Nutrición a los que se les capacitó como jueces analíticos, y se les dio a conocer el objetivo del estudio así mismo permanecieron sin fumar y sin alimento 4 horas antes del estudio.

A cada participante se le presentaron 3 muestras de 30 gramos cada una codificadas con letras (dos sin probióticos y una con probióticos) y se les proporcionó una hoja con instrucciones claras para emitir las respuestas (Apéndice 1). Cada participante contestó de manera individual cual, a su juicio, era la muestra diferente en los atributos de aroma, sabor, color y textura de las muestras que se le presentaron.

3.6.4.3. Prueba del nivel de agrado (Hedonista)

En esta prueba se contó con 63 voluntarios estudiantes de la Licenciatura en Nutrición y personal de la misma dependencia (jueces afectivos), sin entrenamiento o capacitación quienes emitieron su opinión sobre el queso con probióticos a degustar. Se utilizó el método descrito por Sancho *et al.,* (2002).

A cada participante se les distribuyó una muestra de 30 gramos de queso con probióticos y se les proporcionó una hoja con instrucciones claras para emitir sus respuestas. La evaluación del nivel de agrado consistió en una escala hedónica estructurada de 9 rangos, donde se eligió una respuesta entre “me gusta extremadamente” con un valor de 9, hasta “me disgusta extremadamente” con un valor de 1 para los atributos de aroma, sabor, color y textura (Apéndice 2).

3.7. EFECTO INHIBITORIO DE MICROORGANISMOS PROBIÓTICOS SOBRE *Salmonella enteritidis* var. Typhimurium EN QUESO FRESECO

El esquema de la figura 3 presenta la estrategia empleada para lograr este objetivo. Para comprobar el efecto inhibitorio de los probióticos sobre *S. enteritidis var.* Typhimurium se elaboró un queso tipo panela con probióticos y un control sin ellos, como se describió en el apartado 3.6.1 de esta metodología. Varias porciones se inocularon con diferentes concentraciones de *Salmonella* y se analizaron a diferentes tiempos, en cada período se tomó una alícuota y se determinó la presencia del patógeno. Se comparó la presencia de *Salmonella* en el queso con y sin probióticos.

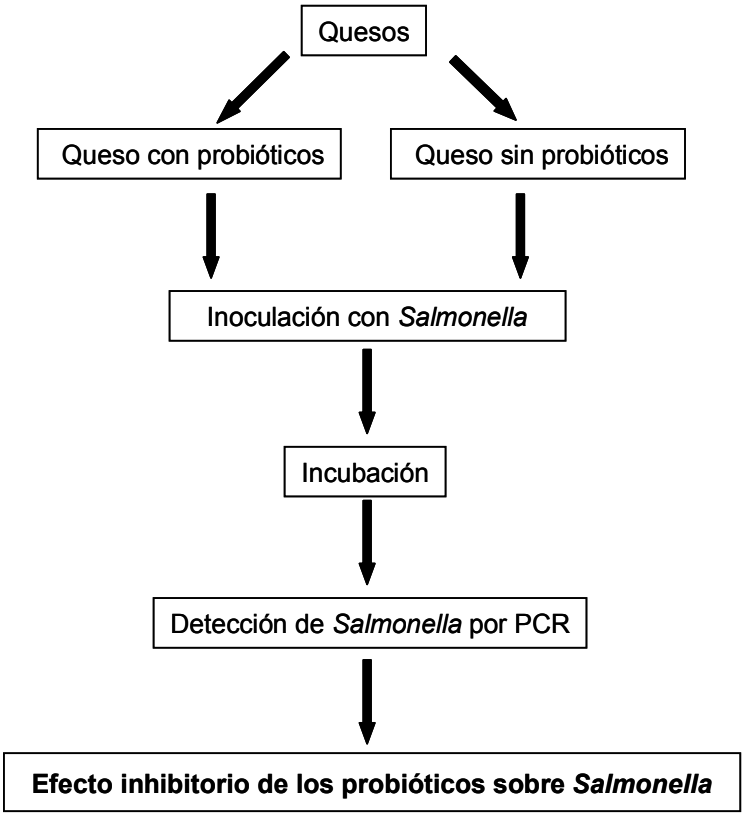


Figura 3. Esquema para demostrar el efecto de los probióticos sobre *S. enteritidis var.* Typhimurium en quesos.

3.7.1. Estandarización de la técnica de PCR para la detección de *Salmonella enteritidis* var. Typhimurium con cepas de referencia

La detección de *S. enteritidis* var. Typhimurium se realizó por medio de PCR, se detectó un fragmento del gen inv A en muestras de DNA extraído por el método de DNAzol®, para lo cual fue necesario seleccionar los iniciadores para la amplificación, obtención del DNA de las cepas, estandarización de la técnica de PCR y la elecroforesis en gel de agarosa.

Se revisaron diferentes iniciadores para determinar el más adecuado y específico para la detección de *Salmonella* y se seleccionaron los iniciadores 139 y 141, que amplifican un fragmento de 287 pb del gen inv A reportado por Rahn *et al.,* (1992) para la detección del género *Salmonella* y cuyas secuencias se describen a continuación:

Gen	**Iniciador**	**Secuencia**
Inv A	139	5' GTGAAATTATCGCCACGTTCGGGCAA 3'
	141	5' TCATCGCACCGTCAAAGGAACC 3'

3.7.2. Extracción de DNA de cepas de referencia

Para la obtención del DNA de cepas de referencia de *Salmonella enteritidis* var. Typhimurium, *S. enteritidis* var. Parathyphi y *S. enteritidis* var. Enteritidis se utilizó el kit comercial DNAzol® (Molecular Research Center). A continuación se describe brevemente el procedimiento:

Se tomó 1 ml de suspensiones bacterianas de las diferentes especies de *Salmonella* cultivadas por 24 horas en caldo soya tripticasa y fueron centrifugadas a 5000 g/5 min., se decantaron los tubos y los precipitados se resuspendieron en 400 μl de buffer TE 1X a pH 8, se agitaron en vortex y se colocaron en inmersión en agua hirviendo por 5 min, después de que se enfriaron a temperatura ambiente se les agregó 50 μl de lisozima (5 mg/ml), se

incubaron a 50ºC por 60 min, transcurrido ese tiempo se les agregó 400 μl de DNAzol®, y se agitaron manualmente de 15 a 20 segundos, se incubaron a temperatura ambiente de 5 a 15 min. Se agregó 0.6 volúmenes de etanol absoluto, mezclándolo por inversión. Se dejó reposar de 2 a 5 min a temperatura ambiente y se procedió a centrifugar a 3000g por 4 min; se decantó y se eliminó el líquido residual con una pipeta, se lavó por 2 veces el DNA con 1 ml de etanol al 75%, se dejó sedimentar el DNA (o mediante un pulso de centrifuga), se decantó el tubo dejándolo en posición invertida de 1 a 2 min hasta sequedad completa y se resuspendió en DNA con 50 μl de agua ultrapura. El DNA extraído fue almacenado a -20º C.

3.7.3. Estandarización de las condiciones de la técnica de PCR

Para la estandarización de las condiciones de PCR para la amplificación del segmento gen inv A se utilizaron las concentraciones de la mezcla de reacción reportadas por Mata (2003). El volumen final de la mezcla de reacción fue de 25 μl. La mezcla consistía en 25 pmoles de cada iniciador, 200 mM de cada uno de los dNTPs, 1.5 mM de $MgCl_2$, Buffer 1X (200 mM Tris-HCl pH 8.0 + 500 mM KCl), 1 unidad de Taq-DNA polimerasa (Biolase TM, Bioline) y de 10 a 100 mg de DNA templado.

Para la amplificación del fragmento seleccionado se utilizó un termociclador (Eppendorf, Mastercycler personal) con el programa descrito por Rahn y col. (1992). Se probaron diferentes temperaturas de alineamiento de 50 a 65º C.

3.7.4. Electroforesis en geles de agarosa

Los productos de PCR se visualizaron mediante electroforesis en geles de agarosa (Bio-Rad) al 2% (en buffer TAE al 1X) corridos a 100 volts por 20 min (Mini-SubR Cel GT), y se tiñeron con bromuro de etidio (Bio-Rad) (0.5 mg/ml) y se visualizaron en un transiluminador de luz ultravioleta. Se fotografiaron y analizaron mediante el Fotodocumentador DigiDoc (Bio-Rad) (Sambrook y Russell, 2003).

3.8. PRUEBAS DE ESPECIFICIDAD DE LOS INICIADORES PARA EL GEN inv A

Se probó la especificidad del par de iniciadores al utilizar los 9 diferentes microorganismos patógenos descritos en la metodología, y 35 cepas de bacterias lácticas y probióticas, previamente caracterizados por su perfil bioquímico (datos no mostrados), el DNA de estas cepas fue obtenido con el método de DNAzol®, la PCR y la electroforesis se llevó a cabo de forma similar al utilizado para de *S. enteritidis* var. Typhimurium y descrito anteriormente.

3.9. DETECCIÓN DE *Salmonella enteritidis* var. Typhimurium EN QUESO FRESCO TIPO PANELA

Para la detección de *Salmonella* en quesos por la técnica de PCR, el microorganismo fue inoculado a concentraciones conocidas, el DNA bacteriano obtenido después de un pre-enriquecimiento. Con el DNA se desarrolló la PCR y los resultados fueron analisados mediante una electroforesis.

3.9.1. Inoculación de *S. enteritidis* var. Typhimurium en queso tipo panela

La cepa de *S. enteritidis* var. Typhimurium se inoculó en caldo soya tripticasa y se incubó a 37º C por 24 horas; transcurrida la incubación se tomó una alícuota para ajustar la suspensión a 0.1 de absorbancia (600 nm), de esta suspensión se realizaron diluciones decimales hasta 10^{-7}; para determinar la cantidad de células presentes se realizó una cuenta en placa en agar soya tripticasa, y se seleccionaron las diluciones adecuadas. Se inoculó *Salmonella* en concentraciones de 100,10, 1 y 0.1 UFC/g de queso, los cuales se colocaron en recipientes estériles y se almacenaron en refrigeración.

Para la detección de *Salmonella* inoculada en quesos con y sin probióticos, se tomaron los recipientes que contenían 25 g de queso a las 0, 24, 48, 72 y 96 h de cada una de las diferentes concentraciones de inóculo de *Salmonella*, y se colocaron en agua peptonada tamponada para pre-enriquecimiento a 37º C por

16 horas con agitación a 100 rpm. Posteriormente, se tomó una alícuota de 3 ml para realizar la extracción de DNA.

3.9.2. Extracción de DNA a partir de muestras de queso

Para la extracción de DNA proveniente de muestras de quesos, se utilizó una modificación del método de CTAB (Bromuro de N-Cetil-N,N,N-trimetil amonio) (Edwards K. *et al*., 1991), que a continuación se describe:

De 3 ml de suspensión de bacterias en agua peptonada tamponada se obtuvo un paquete de células por centrifugación a 5000 rpm/5 min, este paquete fue resuspendido en 400 μl de buffer TE 1X a pH 8, se agitaron y colocaron en inmersión en agua hirviendo por 5 min, y luego se enfriaron a temperatura ambiente, después se le agregó 50 μl de lisozima (5 mg/ml), se incubaron a 37º C por 1 hora; se le adicionaron 70 μl de SDS al 10% y 5 μl de proteinasa K (10mg/ml), se agitó y se incubó a 65º C por 10 min, después de ese tiempo se le agregaron 100 μl de NaCl 5 M y 200 μl de CTAB/NaCl (CTAB 2%, NaCl 1.4 M, Tris-HCl 10 mM a pH 8, EDTA 20 mM) precalentados a 65º C, se agitó por inversión y se incubó a 65º C por 10 min, posteriormente se sumergió el tubo en agua hirviendo por 5 min, después de enfriar se le adicionó 750 μl de solución de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1), se agitó y se centrifugó a 10,000 rpm/6 min. Se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo y se repitió la adición de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1) y la centrifugación. Con el sobrenadante en un tubo nuevo se le adicionaron 0.6 volúmenes de alcohol isopropílico y se colocó el tubo a -20º C por 30 min y se centrifugó a 10,000 rpm/15 min se eliminó el sobrenadante con una pipeta y se adicionó 1 ml de etanol helado al 70 % y se agitó muy suavemente el tubo, se centrifugó a 10,000 rpm/15 min, y se eliminó el sobrenadante con una pipeta y se centrifugó nuevamente a 10,000 rpm7 1.5 min y se eliminó el alcohol por decantación y el DNA se llevó a sequedad utilizando un concentrador centri-vap (Labconco) a 45º C. El DNA se resuspendió con 20 μl de buffer TE 1X y se almacenó a -20 º C.

Se corroboró la presencia de DNA bacteriano mediante electroforesis en geles de agarosa. Se cuantificó el DNA obtenido al medir la absorbancia a 200 nm en un espectrofotómetro Shimadzu UV mini 1240, así mismo se determinó la pureza del DNA mediante la relación de absorbancia 260/280 nm (Apéndice).

3.9.3. PCR y electroforesis para la detección de *Salmonella enteritidis* var. Typhimurium en queso

La técnica de PCR y la electroforesis para detectar la presencia de *Salmonella* se realizaron con la misma metodología empleada con las cepas de referencia descritas anteriormente en un termociclador PCR Sprint Thermo Hybaid modelo HBSPO2.

3.9.4. Límites de detección de *Salmonella* en queso por la técnica de PCR

Se determinó el límite de detección en esta técnica al inocular *S. enteritidis* var. Typhimurium en 25 g de queso en concentraciones de 10^5 hasta 10^{-2} UFC/g de queso (0.2 UFC en 25 g) y posteriormente se incubaron 16 horas en pre-enriquecimiento, se extrajo el DNA y se realizó la PCR y electroforesis.

3.9.5. Efecto inhibitorio de microorganismos probióticos sobre *Salmonella enteritidis* var. Typhimurium

El efecto de los probióticos sobre el desarrollo de *Salmonella* se evaluó comparando la presencia - ausencia del patógeno en los quesos con y sin probióticos a diferentes concentraciones de inóculo y días del experimento. La presencia de *Salmonella* se determinó mediante la amplificación por PCR del gen inv A.

3.10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

A continuación se presentan los diferentes análisis estadísticos que se realizaron en cada una de las etapas.

3.10.1. Evaluación de la calidad de los productos con probióticos

3.10.1.1. Cuenta de probióticos

Para determinar la diferencia del contenido de probióticos entre marcas estudiadas se realizó un análisis de varianza y la comparación múltiple de medias de Tukey.

3.10.1.2. Calidad microbiológica de productos con probióticos

Para determinar la diferencia del contenido de microorganismos coliformes, levaduras y hongos entre marcas estudiadas se realizó un análisis de varianza y la comparación múltiple de medias de Tukey.

Para determinar la diferencia entre las muestras con resultados fuera de la norma se realizó un análisis de proporciones por Ji cuadrada.

3.10.2. Inhibición de patógenos por microorganismos probióticos. Cuantificación de la inhibición. Unidades de Actividad (UA)

En este punto se realizaron diferentes análisis de varianza, se compararon las UA entre:

Los diferentes géneros que se encontraron (*Lactobacillus* y *Bifidobacterium*),

El origen de las muestras (bebidas lácteas, leches en polvo para lactantes y cepas liofilizadas),

Los diferentes microorganismos patógenos y

Las diferentes cepas de probióticos agrupadas por origen.

3.10.3. Evaluación de quesos con probióticos

3.10.3.1. Calidad microbiológica

Para comparar entre el queso con y sin probióticos en cada uno de los microorganismos que se especifican en la NOM de quesos, cada semana se realizó un análisis de varianza.

3.10.3.2. Vida de anaquel

Los parámetros de vida de anaquel del los quesos con probióticos fueron analizados por medio de la prueba de Mann Whitney.

3.10.3.3. Evaluación sensorial

La prueba de discriminación fue analizada por Ji cuadrada para determinar diferencias en la percepción de los jueces en los atributos que se evaluaron.

3.10.3.4. Inhibición de Salmonella en quesos con probióticos

La comparación de la presencia de *Salmonella* en quesos con y sin probióticos se realizó mediante una prueba de Mann-Whitney a diferentes días y concentraciones de inóculo del patógeno.

Se analizó la frecuencia de la presencia/inhibición de *Salmonella* por concentración y días con respecto a cada tratamiento (con y sin probióticos) por Ji cuadrada.

Todos los análisis estadísticos se realizaron con el programa SPSS v10.0 para Windows, con un nivel de significancia de 0.05 o menos.

CAPITULO 4

RESULTADOS

4.1. EVALUACIÓN DE PRODUCTOS CON PROBIÓTICOS

Se encontraron disponibles en el mercado del área metropolitana diversas presentaciones de productos con probióticos como bebidas lácteas, leches en polvo para lactantes y suplementos; estos productos se evaluaron en el contenido y sobrevivencia de probióticos, la identificación de las especies de microorganismos probióticos que contienen y su calidad microbiológica.

4.1.1. Identificación de los microorganismos probióticos

Seis de los 10 productos analizados especifican en la etiqueta el género y la especie de los microorganismos probióticos que contienen, en 2 productos se encuentra solo el género y en los otros 2 productos la información es muy imprecisa como “bacilos lácticos” o “productos lácteos fermentados”.

Comparando los hallazgos de los microorganismos aislados e identificados con la información contenida en las etiquetas y demás información promocional se encuentra que solo 3 de los productos coinciden con lo declarado en el género y la especie y 2 más, solo en el género. En 4 productos se encontraron mas especies de los mismos géneros de las declaradas en la etiqueta y en una muestra de suplementos no se logró aislar microorganismos del género *Bifidobacterium* que estaban especificados.

De los productos con probióticos analizados se aislaron 6 cepas de bebidas lácteas, 9 de leches en polvo para lactantes y 10 de suplementos. Los microorganismos que se encontraron pertenecen a los géneros *Lactobacillus* (6 especies) y *Bifidobacterium* (4 especies), y fueron identificadas las especies *L. casei, L. paracasei, L. plantarum, L. acidophilus, L. rhamnosus, L. delbrueckii, B. bifidum, B. longum, B. animalis y B. adolescentis* como se muestra en la tabla

1. Cabe indicar que *B. lactis* es sinónimo de *B. animalis* subsp. *lactis* y que por métodos bioquímicos no es posible diferenciarlo de *B. adolescentis.*

Los microorganismos que se encontraron en los diferentes productos ya han sido reportados en alimentos con probióticos y se han documentado sus efectos benéficos y ausencia de efectos negativos en el organismo.

Tabla 1. Información de las etiquetas de productos con probióticos y hallazgos microbiológicos.

Producto	Origen	Información de etiqueta		Microorganismos detectados	
		Microorganismo declarado	UFC/g declarado	Nombre	UFC/g encontrado
1	Bebida láctea	*Lactobacillus casei* Shirota	$1x10^8$	*L. paracasei*	$9x10^7$
2	Bebida láctea	Producto lácteo fermentado	No declarado	*L. acidophilus* *L. delbrueckii* *L. paracasei* *L. casei*	$5.5x10^8$
3	Bebida láctea	*Lactobacillus*	No declarado	*L. acidophilus* *L. paracasei*	$1.8x10^6$
4	Leche en polvo	*Bifidobacterium lactis* *Streptococcus thermophilus*	No declarado	*B. bifidum* *Streptococcus sp.* *B. adolescentis y/o B. animalis*	$1.1x10^7$
5	Leche en polvo	*Bifidobacterium lactis*	No declarado	*B. adolescentis y/o B. animalis*	$1.8x10^6$
6	Leche en polvo	*Lactobacillus* *Bifidobacterium*	No declarado	*B. longum* *B. adolescentis y/o B. animalis* *acidophilus* *L. plantarum*	$2.3x10^6$
7	Suplementos	*Lactobacillus acidophilus* *Bifidobacterium longum*	$4.3 x10^7$ $> 4.3 x10^7$	*L. acidophilus* *B. longum* *B. adolescentis y/o B. animalis*	$1.5x10^6$
8	Suplementos	*Lactobacillus acidophilus*	$> 1x10^6$ *	*L. acidophilus* *L. rhamnosus*	$1.6x10^3$
9	Suplementos	*acidophilus* *L. bulgaricus* *B. bifidum*	$> 1.5x10^9$ *	*L. acidophilus* *L. delbrueckii*	$1.9x10^5$
10	Suplementos	Bacilos lácticos acidófilos y búlgaros	No declarado	*L. acidophilus*	$3.5x10^3$

*UFC/capsula

También fueron identificadas por los mismos métodos siete cepas liofilizadas de uso alimentario, (las cepas identificadas corresponden a las declaradas en el empaque). Las cepas liofilizadas correspondieron a: 4 cepas de *Lactobacillus casei rhamnosus*, una de *L. acidophilus,* una de *L. plantarum* y una mas de *Bifidobacterium animalis* subsp*. lactis.*

4.1.2. Contenido de Probióticos

Los resultados del contenido de probióticos en los diferentes productos se muestran en la tabla 1 donde se contrasta con la información proporcionada en las etiquetas. Solo 4 productos especifican en su etiqueta la cantidad de microorganismos que contienen (1 bebida láctea y 3 suplementos). De ellos, solo en la bebida se encontró un número ligeramente inferior de lo que declaran. En los suplementos el contenido es menor a lo declarado de 1 ciclo logarítmico en el producto 7, hasta cantidades muy pobres de microorganismos (3 a 4 ciclos logarítmicos menor a lo declarado en los productos 8 y 9).

Al analizar el consumo por día de acuerdo a las especificaciones de los productores se observaron 3 productos (2 bebidas lácteas y 1 leches en polvo) con una aportación superior a 10^9 UFC/día.

En bebidas lácteas la cantidad de probióticos varía de $1.8x10^6$ en el producto tres, el cual es significativamente menor que los productos 1 y 2 que contienen $9x10^7$ y $5.5x10^8$ UFC/g como se muestra en la figura 4.

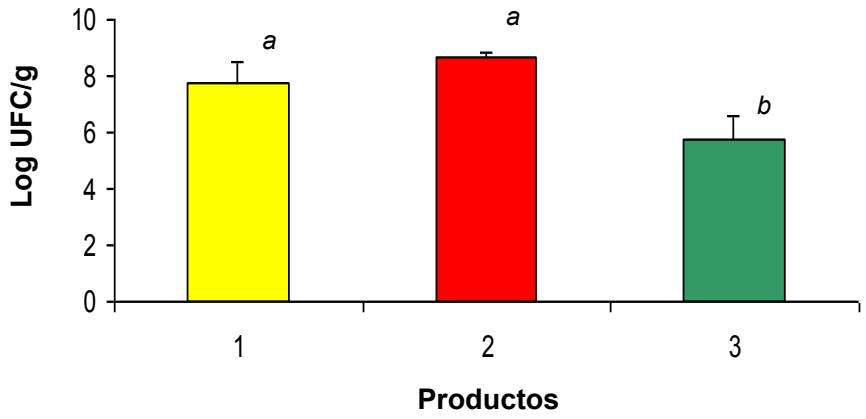


Figura 4. Contenido de probióticos en bebidas lácteas. Los valores en la gráfica son el promedio de 6 determinaciones. [a,b] Las barras con diferente notación alfabética difieren significativamente ($F = 38.8$, $p < 0.01$).

En la figura 5 se muestra el contenido de probióticos de las leches en polvo para lactantes donde varió de $1.8x10^6$ hasta $1.1x10^7$ UFC/g. En el producto 4 es significativamente mayor que los productos 5 y 6.

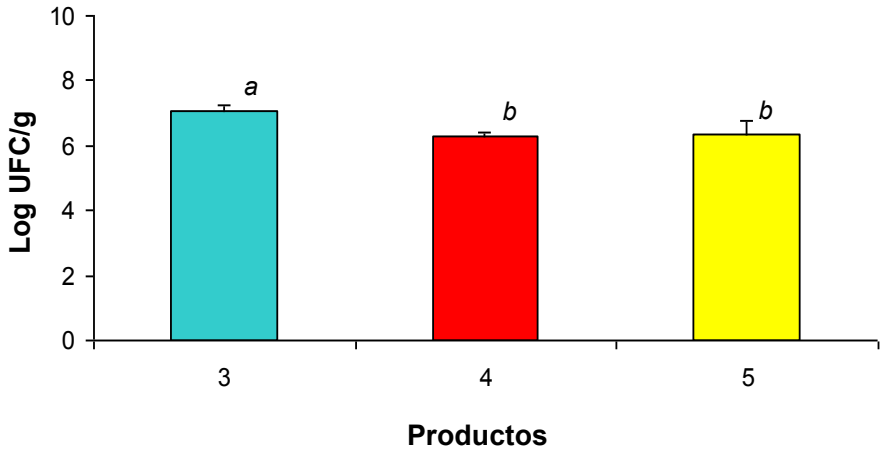


Figura 5. Contenido de probióticos en leches en polvo para lactantes. Los valores de la gráfica son el promedio de 6 determinaciones. [a,b] Las barras con diferente notación alfabética difieren significativamente ($F = 16.1$, $p < 0.01$).

De las leches en polvo para lactantes que se analizaron, una marca es fórmula de inicio (para bebes de 0 a 6 meses) y dos marcas son de continuación (para mayores de 6 meses) por lo que la cantidad de producto a utilizar por día es

diferente de acuerdo al consumo del lactante; en todos los casos la cantidad de organismos probióticos supera los 10^8 UFC/día.

En los suplementos se encontraron valores bajos de probióticos y con variaciones muy grandes que van desde $2x10^2$ hasta $1.64x10^7$ UFC/g como se muestran en la tabla1; existe diferencia estadística entre las marcas analizadas y la prueba de Tukey (post-ANOVA) distribuye 3 grupos. El grupo con mayor contenido de probióticos constituido por los productos 7 y 8, donde este último no es diferente al 10 y este a su vez no difiere del 9. Estos resultados se muestran en la figura 6.

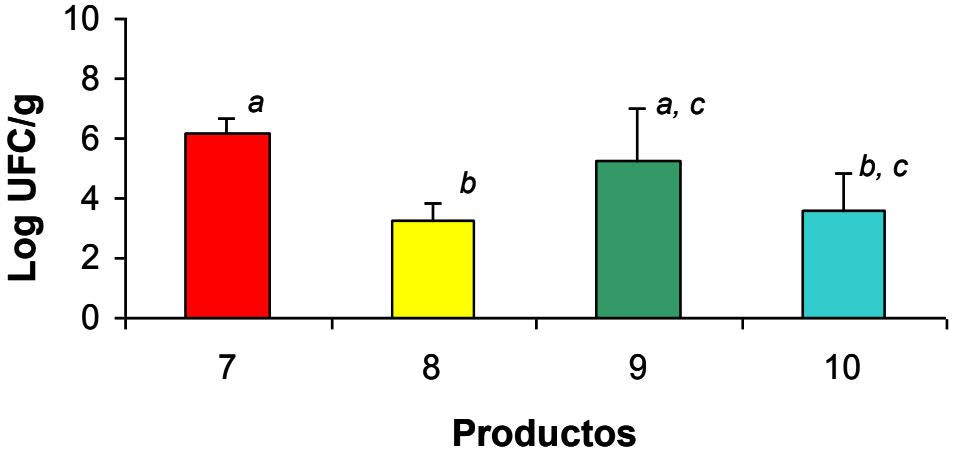


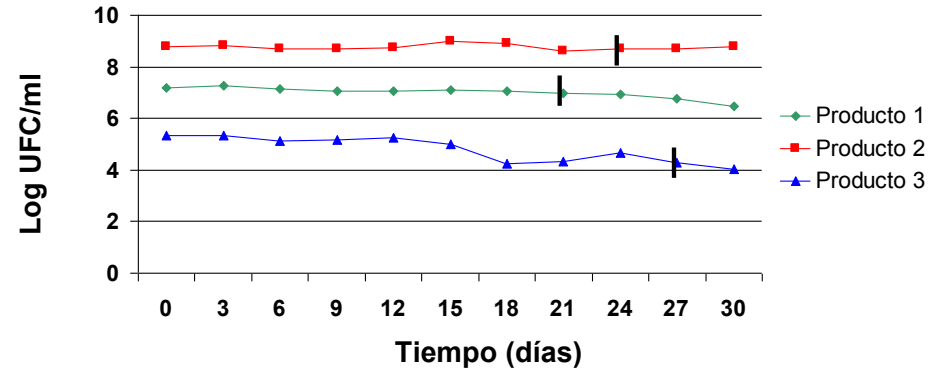
Figura 6. Contenido de probióticos en suplementos. Los valores de la gráfica son el promedio de 6 determinaciones. ^{a,b,c} Las barras con diferente notación alfabética difieren significativamente ($F = 9.07$, $p < 0.01$).

En algunos productos el aporte de probióticos es insuficiente de acuerdo a las recomendaciones del fabricante (generalmente 2 tabletas por día).

4.1.3. Sobrevivencia de probióticos

En la Figura 7 se muestra la sobrevivencia de los probióticos en las bebidas almacenadas a 4º C. Se encontró una reducción de 0.3 hasta 1.5 unidades logarítmicas a un mes de iniciado el estudio, además en dos de los productos no se redujo el contenido de microorganismos a lo largo de un mes, tiempo

mayor al de su fecha de caducidad y solo el producto tres presentó una disminución de más de un ciclo logarítmico con respecto a la concentración inicial.



Productos almacenados a 4°C

| Fecha de caducidad del producto.

Figura 7. Sobrevivencia de probióticos de bebidas lácteas a temperatura de 4º C. Los valores de la gráfica son el promedio de dos determinaciones. Las barras obscuras indican la fecha de caducidad del producto.

La sobrevivencia de los probióticos en las leches en polvo analizadas se muestra en la Figura 8, los diferentes productos no mostraron disminución del contenido de probióticos de más de un ciclo logarítmico durante los primeros tres meses de almacenamiento.

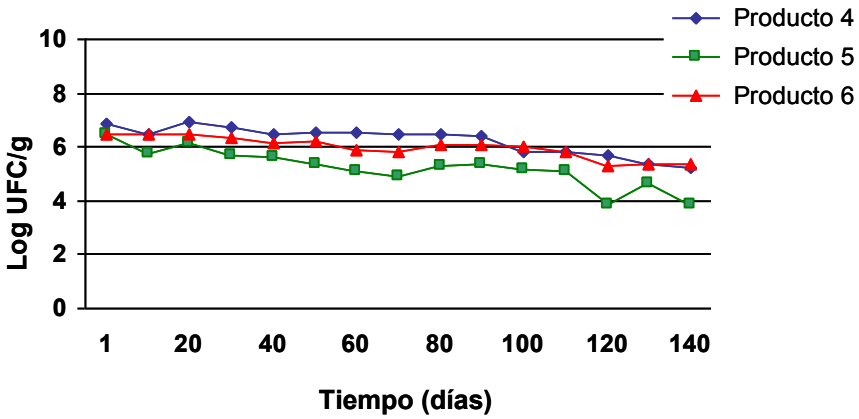
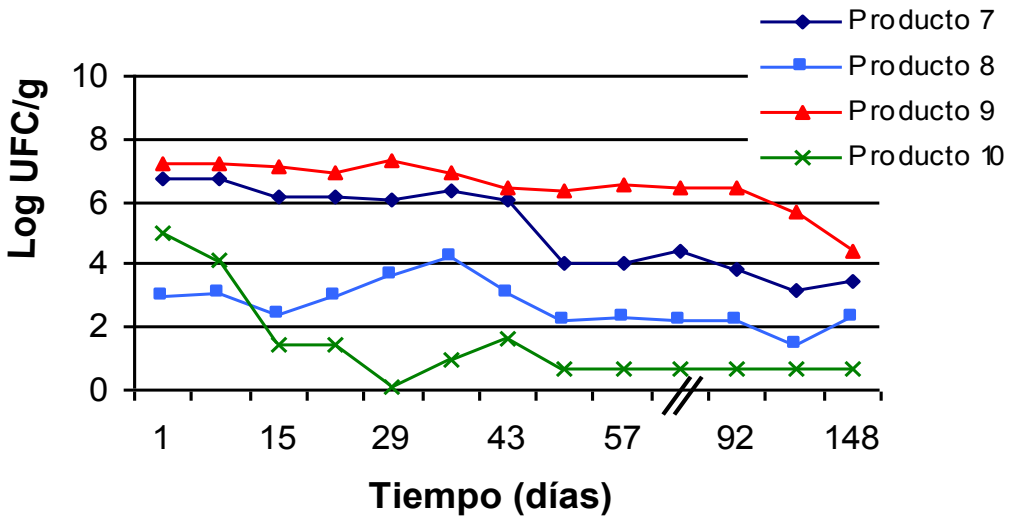


Figura 8. Sobrevivencia de microorganismos probióticos de leches en polvo. Los productos permanecieron a temperatura ambiente y se analizaron cada 10 días. Los valores en la gráfica son el promedio de dos determinaciones.

En los suplementos, la sobrevivencia de los probióticos fue menor y con mucha variación entre las marcas como se muestra en la Figura 9. Mientras la muestra número 4 presenta disminución de tres unidades logarítmicas en el primer mes del estudio, las demás exhiben reducciones inferiores a una unidad logarítmica**.** Es importante señalar que todos los productos estaban dentro del tiempo especificado para su consumo (antes de la fecha de caducidad).



Productos almacenados a temperatura ambiente.

Figura 9. Sobrevivencia de microorganismos probióticos de suplementos, las marcas 1,2 y 3 se almacenaron a temperatura ambiente y la 4 a 4º C. Los valores de la gráfica son el promedio de dos determinaciones.

4.1.4. Calidad microbiológica

La calidad microbiológica de los productos con probióticos fue analizada tomando como base las especificaciones de las Normas Oficiales Mexicanas. En la tabla 2 se muestra la calidad microbiológica de tres marcas comerciales diferentes de bebidas lácteas.

Tabla 2. Calidad microbiológica de bebidas lácteas.

Producto	Coliformes Totales UFC/ml	*S. aureus* UFC/ml	*Salmonella* UFC en 25 ml	Levaduras UFC/ml	Hongos UFC/ml
1	<1 *	<10	Ausente	<1 **	<1
2	<1*	<10	Ausente	18.33**	<1
3	44.16 *	<10	Ausente	766.66**	<1
Límite máximo en NOM 185	<10	<100	Ausente	<10	<10

Nota. Los valores representan la media de 6 muestras.
* No hay diferencia significativa entre los productos.
** No hay diferencia significativa entre los productos.

En las muestras analizadas no se encontraron microorganismos patógenos como *S. aureus* y *Salmonella,* ni la presencia de hongos, solo se encontraron organismos coliformes y levaduras en el producto 3, además se detectaron levaduras en el producto 2.

El contenido de coliformes totales y levaduras se analizó estadísticamente con ANOVA y no se encontró diferencia significativa entre las marcas estudiadas.

También se determinó la frecuencia con la que las diferentes marcas exceden las especificaciones microbiológicas establecidas en la NOM-185-SSA. Para coliformes se encontró que 2 de 6 muestras de la marca 3 presentaron cantidades superiores a las permitidas, mientras que para levaduras las marcas 2 y 3 también presentaron 2 de 6 muestras con valores superiores a lo establecido en la NOM. No se encontró diferencia significativa entre las marcas en un análisis de proporciones.

En la tabla 3 se muestran los resultados de la calidad microbiológica de tres marcas de leches en polvo para lactantes con probióticos.

Tabla 3. Calidad microbiológica de leches en polvo para lactantes con probióticos.

Producto	Mesofílicos aerobios UFC/g	Coliformes Totales NMP/g	*S. aureus* UFC/g	*Salmonella* UFC en 25 g	*E. coli* UFC/g
4	$1.13x10^4$	<0.03	Negativo	Ausente	Ausente
5	$1.79x10^5$	<0.03	Negativo	Ausente	Ausente
6	$1.60x10^6$	<0.03	Negativo	Ausente	Ausente
Límite máximo en NOM 131	$2.5x10^3$	20	Negativo	Ausente	Ausente

Nota. Los valores representan la media de 6 muestras.

En las leches en polvo no se encontraron organismos coliformes, ni patógenos como *Salmonella, Escherichia coli* y *S. aureus* (límite de detección de <100 UFC/g para *S. aureus*).

En estos productos se presentó diferencia entre las marcas solamente en el contenido de mesofílicos aerobios donde se encuentran valores superiores a los que indica la NOM 131 SSA. Los altos valores que se encontraron se deben a que algunos de los microorganismos probióticos pueden crecer bajo esas condiciones y medio de cultivo.

Entre los suplementos que se consideraron en la presente investigación se encontraban presentaciones como: polvo suelto en la marca 1, tabletas en la marca 4 y cápsulas en las marcas 2 y 3.

En los suplementos no se encontraron organismos coliformes, levaduras, ni patógenos como *Salmonella* y *S. aureus,* solo se detectaron hongos en dos de los productos con valores máximos de 30 UFC/g sin encontrar diferencia significativa entre las marcas analizadas por ANOVA o análisis de proporciones (tabla 4).

Tabla 4. Calidad microbiológica de suplementos con probióticos.

Producto	Coliformes Totales UFC/g	*S. aureus* UFC/g	*Salmonella* UFC en 25 g	Levaduras UFC/g	Hongos UFC/g
7	<10	<100	Ausente	<10	50 *
8	<10	<100	Ausente	<10	<10 *
9	<10	<100	Ausente	<10	<10 *
10	<10	<100	Ausente	<10	16.6 *

Nota. Los valores representan la media de 6 muestras.
No hay diferencia significativa entre los productos.

4.2. ACCIÓN ANTAGÓNICA *IN VITRO* DE LOS PROBIÓTICOS CONTRA MICROORGANISMOS PATÓGENOS.

Este aspecto fue evaluado por medio de la detección de la actividad antimicrobiana y posteriormente, se determinaron las Unidades de Actividad (UA) de las cepas que mostraron un resultado positivo.

4.2.1. Actividad antimicrobiana

Se probó la actividad antimicrobiana de 25 cepas de probióticos aisladas de alimentos y suplementos y 7 cepas comerciales liofilizadas para uso alimentario (tabla 5). De las 32 cepas analizadas, 25 mostraron actividad antimicrobiana (halos de inhibición) contra alguno de los patógenos de prueba. De las 12 cepas aisladas de bebidas 11 mostraron actividad antimicrobiana, de las 9 aisladas de leche en polvo solo 7, y de las 4 de suplementos ninguna produjo inhibición. Los 7 liofilizados comerciales que se analizaron mostraron efecto antimicrobiano.

Tabla 5. Distribución de cepas con actividad antimicrobiana de acuerdo a su origen. *

Microorganismo patógeno de prueba	Bebidas n =12 (%)	Leches en polvo n=9 (%)	Suplementos n=4 (%)	Cepas Liofilizadas n=7 (%)
Salmonella enteritidis var. Typhimurium	10 (83)	6 (67)	0 (0)	7 (100)
S. enteritidis var. Parathyphi	10 (83)	5 (56)	0 (0)	7 (100)
S. enteritidis var. Enteritidis	9 (75)	7 (78)	0 (0)	7 (100)
Bacillus cereus	10 (83)	6 (67)	0 (0)	7 (100)
Staphylococcus aureus	9(75)	5 (56)	0 (0)	7 (100)
Listeria monocytogenes	10 (83)	3 (33)	0 (0)	7 (100)
Escherichia coli O157:H7	10 (83)	4 (44)	0 (0)	7 (100)
Escherichia coli O157	10 (83)	3 (33)	0 (0)	7 (100)
Yersinia enterocolitica	10 (83)	7 (78)	0 (0)	7 (100)

* Cantidad de cepas que formaron halos de inhibición (>2 mm) por patógeno.

Las cepas con actividad antimicrobiana correspondieron 19 al género *Lactobacillus* y 6 a *Bifidobacterium*.

4.2.2. Cuantificación de la inhibición

Para cuantificar el grado de inhibición de las cepas probióticas sobre los diferentes patógenos se calcularon las Unidades de Actividad (UA) expresadas como el recíproco de la mayor dilución donde se presenta una zona de inhibición.

En las tablas 6 y 7 se presentan los valores de UA de cepas aisladas de bebidas y leches en polvo para lactantes y las cepas liofilizadas respectivamente, los valores son el promedio de tres experimentos independientes.

Tabla 6. Grado de inhibición de cepas de probióticos aislados de alimentos y suplementos expresado como Unidades de Actividad (UA/ml)

Producto	Cepa	*Salmonella enteritidis* var.Typhimurium	*S. enteritidis* var. Paratyphi	*S. enteritidis* var. Enteritidis	*Bacillus cereus*	*Staphylococcus aureus*	*Listeria monocytogenes*	*Escherichia coli O157:H7*	*Escherichia coli 0157*	*Yersinia enterocolítica*
Bebidas	I	2139 ± 1214.3	1439 ± 293.6	1556 ± 336.7	1000 ± 0.0	1056 ± 96.2	1000 ± 0.0	1133 ±230.9	1000 ± 0.0	1517 ± 202.0
	J	2139 ± 1214.3	1556 ± 336.7	1439 ± 293.6	1056 ± 96.2	1244 ±134.7	1000 ± 0.0	1250 ±433.0	1000 ± 0.0	1750 ± 0.0
	L	1267 ± 230.9	1322 ± 134.7	1322 ± 134.7	1000 ± 0.0	1056 ± 96.2	1000 ± 0.0	1056 ± 96.2	1056 ± 96.2	1244 ± 134.7
	N	1111 ± 96.2	1167 ± 0.0	1633 ± 202.0	1111 ± 96.2	1056 ± 96.2	1056 ± 96.2	1056 ± 96.2	1056 ± 96.2	1244 ± 134.7
	O	1267 ± 230.9	1633 ± 202.0	1322 ± 134.7	1056 ± 96.2	1167 ± 0.0	1000 ± 0.0	1000 ± 0.0	1000 ± 0.0	1633 ± 202.0
	P	1267 ± 230.9	1633 ± 202.0	1244 ±134.7	1111 ± 96.2	1361 ±336.7	1000 ± 0.0	1189 ±200.9	1000 ± 0.0	1517 ± 202.0
	Q	2139 ± 1214.3	2217 ±1125.0	1383 ±375.2	1111 ± 96.2	1267 ±230.9	1056 ± 96.2	1267 ±230.9	1000 ± 0.0	1633 ± 202.0
	R	1439 ± 293.6	1633 ± 202.0	1361 ± 336.7	1111 ± 96.2	1189 ±200.9	1056 ± 96.2	1111 ± 96.2	1000 ± 0.0	1633 ± 202.0
	S	1439 ± 293.6	1361 ± 336.7	1517 ±202.0	1000 ± 0.0	1111 ± 96.2	1000 ± 0.0	1000 ± 0.0	1056 ± 96.2	1244 ± 134.7
	T	1439 ± 293.6	1633 ± 202.0	1517 ± 202.0	1056 ± 96.2	1056 ± 96.2	1000 ± 0.0	1000 ± 0.0	1056 ± 96.2	1189 ± 200.9
	U	1167 ± 0.0	1383 ± 375.2	1400 ± 0.0	1244 ±134.7	1244 ±134.7	1400 ± 0.0	1000 ± 0.0	1000 ± 0.0	1633 ± 202.0
Leches en polvo para lactantes	F	1633 ± 202.0	1500 ± 433.0	1306 ± 393.8	1056 ± 96.2	1000 ± 0.0	1000 ± 0.0	1000 ± 0.0	1000 ± 0.0	1111 ± 96.2
	G	1244 ± 134.7	1633 ± 202.0	1167 ± 0.0	1056 ± 96.2	1000 ± 0.0	1000 ± 0.0	1000 ± 0.0	1056 ± 96.2	1383 ± 375.2
	H	1556 ± 336.7	1750 ± 0.0	1556 ± 336.7	1250 ± 433.0	1361 ±336.7	1000 ± 0.0	1250 ±433.0	1056 ± 96.2	1383 ± 375.2
	M	1189 ± 200.9	1244 ± 134.7	1556 ± 336.7	1056 ± 96.2	1056 ± 96.2	1133 ± 230.9	1056 ± 96.2	1133 ±230.9	1439 ± 293.6
	W	1056 ± 96.2	1306 ± 393.8	1244 ± 134.7	1383 ± 375.2	1189 ±200.9	1056 ± 96.2	1056 ± 96.2	1000 ± 0.0	1306 ± 393.8
	Y	1306 ± 393.8	1000 ± 0.0	2139 ±1214.3	1133 ± 230.9	1189 ±200.9	1056 ± 96.2	1000 ± 0.0	1000 ± 0.0	1267 ± 230.9
	Z	1111 ± 96.2	1056 ± 96.2	1267 ± 230.9	1000 ± 0.0	1322 ±134.7	1000 ± 0.0	1056 ± 96.2	1000 ± 0.0	1267 ± 230.9

Nota. Los cultivos para la obtención de sobrenadante se ajustaron a una densidad de 4 en la escala de Mc Farland (aprox. 10^8 cel /ml).

Tabla 7. Grado de inhibición de las cepas probióticas liofilizadas expresado como Unidades de Actividad (UA/ml)

Cepa	*Salmonella enteritidis* var.Typhimurium	*S. enteritidis* var. Paratyphi	*S. enteritidis* var. Enteritidis	*Bacillus cereus*	*Staphylococcus aureus*	*Listeria monocytogenes*	*Escherichia coli O157:H7*	*Escherichia coli 0157*	*Yersinia enterocolítica*
A	1400 ± 0.0	1633 ± 202.0	1633 ±202.0	1111 ± 96.2	1000 ± 0.0	1361 ± 336.7	1383 ± 375.2	1000 ± 0.0	1517 ± 202.0
B	1750 ± 0.0	1750 ± 0.0	1633 ±202.0	1189 ± 200.9	1306 ± 393.8	1361 ± 336.7	1383 ± 375.2	1000 ± 0.0	1556 ± 336.7
C	1244 ± 134.7	1322 ± 134.7	1517 ±202.0	1439 ± 293.6	1244 ± 134.7	1189 ± 200.9	1111 ± 96.2	1000 ± 0.0	1556 ± 336.7
D	1244 ± 134.7	1322 ± 134.7	1750 ± 0.0	1189 ± 200.9	1244 ±134.7	1322 ± 134.7	1244 ± 134.7	1000 ± 0.0	1633 ± 202.0
E	1244 ± 134.7	1383 ± 375.2	1306 ± 393.8	1000 ± 0.0	1000 ± 0.0	1056 ± 96.2	1000 ± 0.0	1000 ± 0.0	1267 ± 230.9
K	1500 ± 433.0	1439 ± 293.6	1361 ±336.7	1133 ± 230.9	1056 ± 96.2	1000 ± 0.0	1889 ±1397.7	1111 ± 96.2	1439 ± 293.6
V	1167 ± 0.0	1439 ± 293.6	1439 ±293.6	1383 ± 375.2	1167 ± 0.0	1111 ± 96.2	1111 ± 96.2	1000 ± 0.0	1361 ± 336.7

Nota. Los cultivos para la obtención de sobrenadante se ajustaron a una densidad de 4 en la escala de Mc Farland (aprox. 10^8 cel /ml).

Cuando se comparó el grado de inhibición de las cepas de probióticos en base a su origen (bebidas lácteas, leches en polvo para lactantes y cepas liofilizadas) se encontró diferencia significativa. Los patógenos son más sensibles a la acción de las cepas liofilizadas y a las aisladas de bebidas que a las provenientes de leches en polvo, aunque no se encontró diferencia entre los grupos de bebidas y leches en polvo (Figura 10).

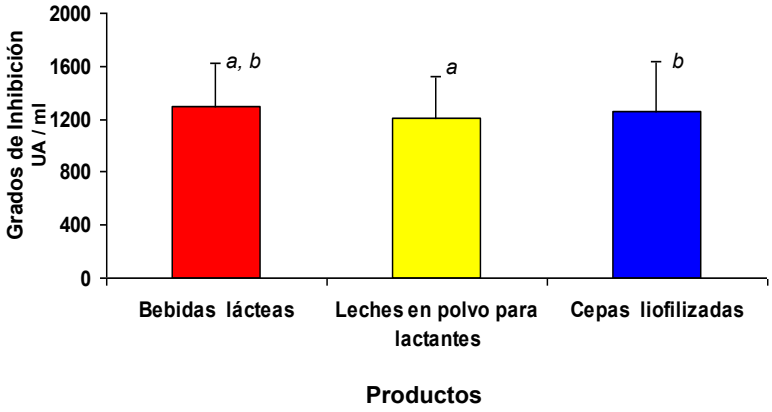


Figura 10. Comparación de promedios de UA de cultivos probióticos de diferentes orígenes. [a,b] Las barras con diferente notación alfabética difieren significativamente (F = 3.77, p = 0.023).

En la Figura 11 se muestra el grado de inhibición (UA) de los patógenos hacia los diferentes probióticos, independientemente del origen del aislamiento de los probióticos. Se encontró que los patógenos más sensibles fueron *Salmonella enteritidis* var. Parathyphi*, S. enteritidis* var. Typhimurium*, S. enteritidis* var. Enteritidis y *Yersinia enterocolitica*, con diferencia significativa entre ellos y los demás patógenos.

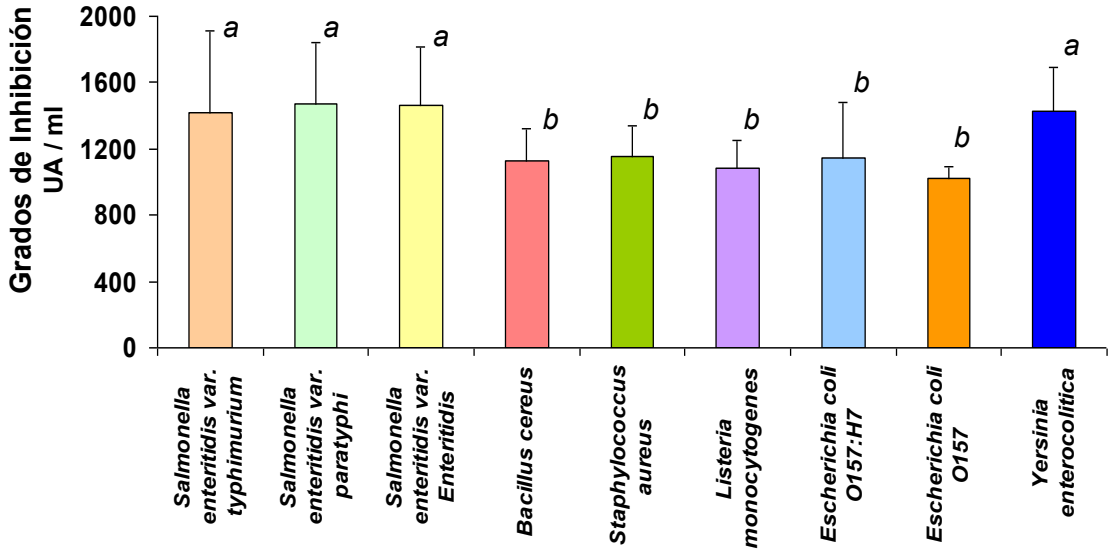


Figura 11. Sensibilidad de patógenos a compuestos difusibles de probióticos. Los valores de UA en la gráfica corresponden a la media de 25 probióticos diferentes con tres ensayos independientes (n = 75). [a,b] Las barras con diferente notación alfabética difieren significativamente (F = 28.15, p < 0.01).

Se determinó si hay diferencia significativa en la sensibilidad de los patógenos con respecto a los géneros de probióticos, y solo se encontró en *S. enteritidis* var. Parathyphi, donde se observó que el sobrenadante de los *Lactobacillus* es más eficiente que el de los *Bifidobacterium* (F = 5.427 y p = 0.023). En los otros microorganismos patógenos la sensibilidad es igual con ambos géneros estudiados.

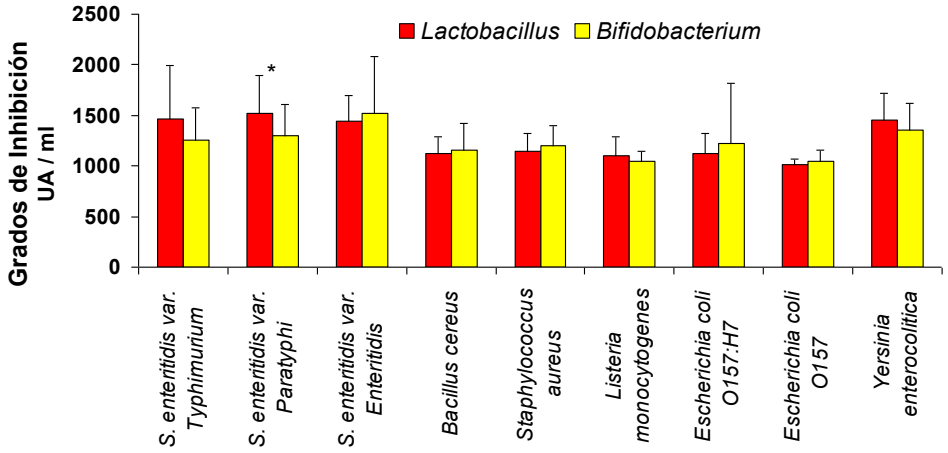


Figura 12. Sensibilidad de los patógenos a los a compuestos difusibles de los diferentes géneros de probióticos. De las 25 cepas 19 fueron del género *Lactobacillus* y 6 de *Bifidobacterium* (n = 75). El * indica diferencia significativa (P<0.05).

Cuando se comparó la sensibilidad de cada patógeno a los compuestos difusibles que generaron los probióticos al agruparlos por origen, se encontró diferencia significativa para tres patógenos, *Listeria monocytogenes, E. coli O157:H7* y *Yersinia enterocolitica,* en los primeros dos las cepas liofilizadas probaron ser mas eficientes a las cepas aisladas de bebidas y leches en polvo; mientras que para *Yersinia enterocolitica*, las cepas liofilizadas y las aisladas de bebidas son mas eficientes que las cepas aisladas de leche en polvo, estos resultados se muestran en la Figura 13.

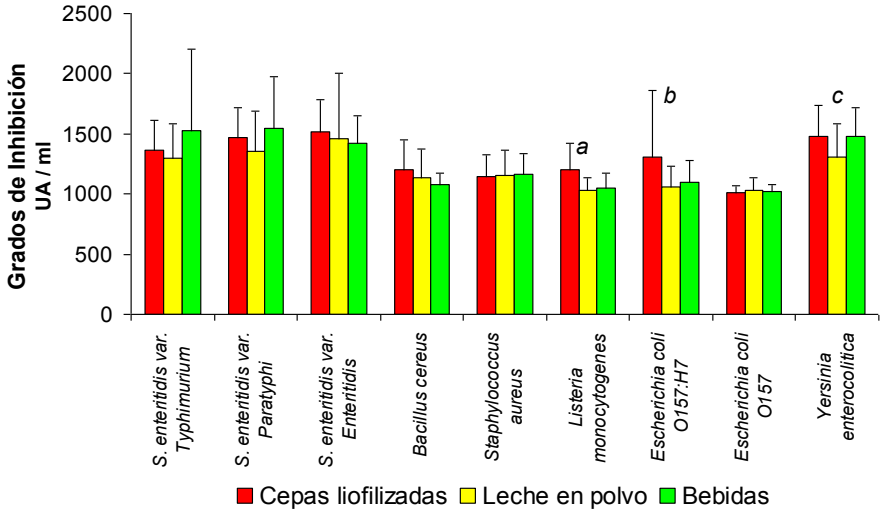


Figura 13. Sensibilidad de los patógenos a los compuestos difusibles de los diferentes probióticos agrupados por origen (7 cepas liofilizadas, 11 aisladas de bebidas y 7 de leches en polvo (n = 75). Los incisos marcan las cepas donde se encontró diferencia significativa entre los orígenes. a) F = 7.85 y p = 0.01, b) F = 3.53 y p = 0.035 y c) F = 3.17 y p = 0.048.

También se comparó el efecto inhibitorio de los probióticos contra los patógenos considerando el origen de la cepa probiótica y se encontró que no existe diferencia en la eficiencia de las cepas de los probióticos que se aislaron de bebidas, como se observa en la Figura 14.

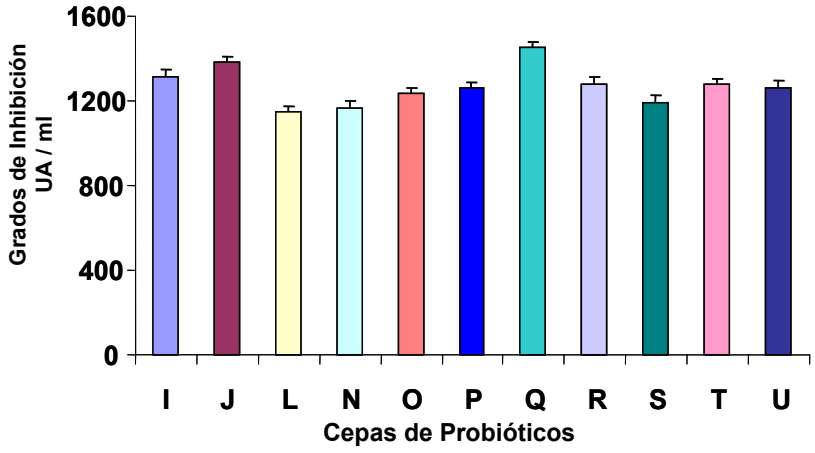


Figura 14. Promedios de UA de cultivos probióticos que se aislaron de bebidas lácteas. n = 27 (9 con 3 repeticiones). No hay diferencia significativa entre las cepas.

Para las cepas de leches en polvo para lactantes se observaron resultados similares, no se encontró diferencia entre las medias de los valores de UA de las 7 cepas como se muestra en la Figura 15.

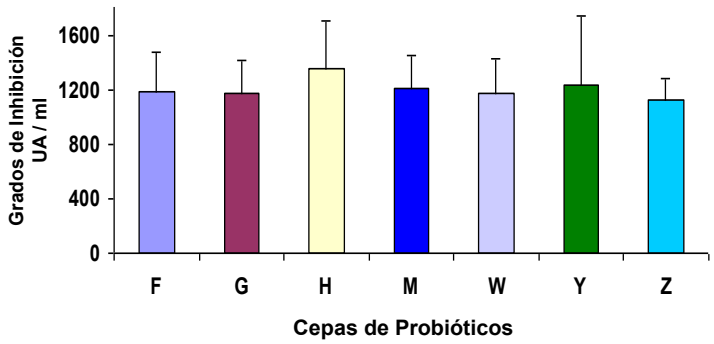


Figura 15. Promedios de UA de cultivos probióticos que se aislaron de leches en polvo para lactantes. n =21 (9 con 3 repeticiones). No hay diferencia significativa entre las cepas.

En un análisis similar para las cepas de uso alimentario liofilizadas se encontró diferencia entre ellas. De las cepa A a la D corresponden a *Lactobacillus casei rhamnosus* y mostraron una mayor eficiencia sin encontrar diferencia entre ellas, ni entre *L. acidophilus* (V) y *Bifidobacterium* (K), mientras que la menos eficiente es *L. plantarum* (E) como se observa en la Figura 16.

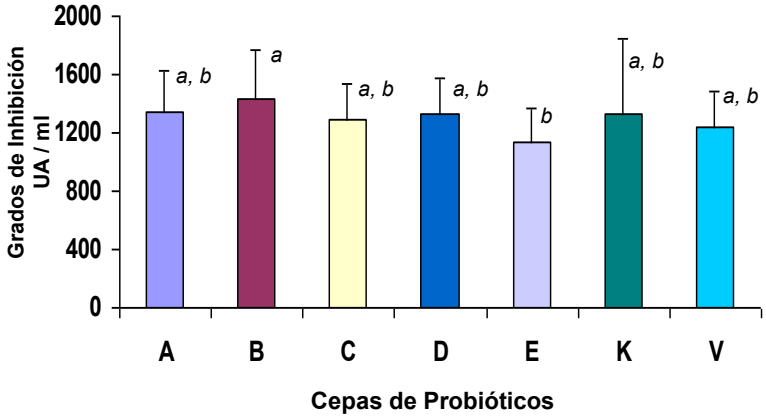


Figura 16. Promedios de UA de cultivos probióticos comerciales liofilizados de uso alimentario. n =21 (9 con 3 repeticiones). [a,b] Las barras con diferente notación alfabética difieren significativamente (F = 2.3, p = 0.036).

4.3. SELECCIÓN DE LAS CEPAS PROBIÓTICAS PARA ELABORACIÓN DE QUESO FRESCO

Como primera instancia se seleccionaron las cepas liofilizadas por la eficiencia en los resultados de las pruebas de actividad antimicrobiana contra patógenos *in vitro*. Con estas cepas se realizaron pruebas preliminares en queso. Se observó que la cepa de *Lactobacillus acidophilus* generó cambios en aroma y presentó una menor sobrevivencia en el queso, con una pérdida de 1.5 ciclos logarítmicos en dos semanas, los demás microorganismos probióticos en forma individual (*L. casei rhamnosus, L. plantarum* y *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*) presentaron reducciones de 0.5 a 1 ciclo logarítmico y cuando estos probióticos se agregaron en forma conjunta, la sobrevivencia fue mayor (solo reducción de 0.1 de ciclo logarítmico). Los resultados se muestran en la tabla 8. Con base a estos resultados se seleccionó a *L. casei, L. plantarum y Bifidobacterium* para adicionar una mezcla de microorganismos en la elaboración de quesos.

Tabla 8. Resultados de parámetros que se evaluaron para la selección de cepas probióticas*

Probiótico	Reducción de probióticos	Propiedades organolépticas
L. acidophilus	1.5	Sabor ácido
L. casei rhamnosus	0.6	Sin cambio
L. plantarum	1.0	Sin cambio
Bifidobacterium animalis	0.5	Sin cambio
Mezcla de probióticos	0.1	Sin cambio

*Pruebas realizadas por duplicado.
** Ciclos logarítmicos

4.3. ELABORACIÓN Y EVALUACIÓN DE QUESOS FRESCO CON PROBIÓTICOS

Se elaboró un queso fresco tipo panela como se describe en el apartado de metodología, la adición de la mezcla de probióticos fue después de la operación de salado y antes del formado (moldeado) y prensado. A este queso se le determinó su contenido y sobrevivencia de probióticos, su calidad microbiológica, su vida de anaquel y sus propiedades organolépticas.

4.4.1. Contenido de probióticos en quesos

El contenido promedio de probióticos en la masa cuajada fue de $3x10^8$ UFC/g, una cantidad se perdió durante la eliminación del suero, el producto terminado conservó una concentración de $1.6x10^8$ UFC/g.

4.4.2. Sobrevivencia de probióticos en queso fresco

Los microorganismos probióticos no solo sobrevivieron en el queso elaborado sino que además aumentaron en cantidad (un ciclo logarítmico) durante las tres semanas siguientes hasta llegar a una concentración de $1.4\ x10^9$ UFC/g, como se muestra en la Figura 17.

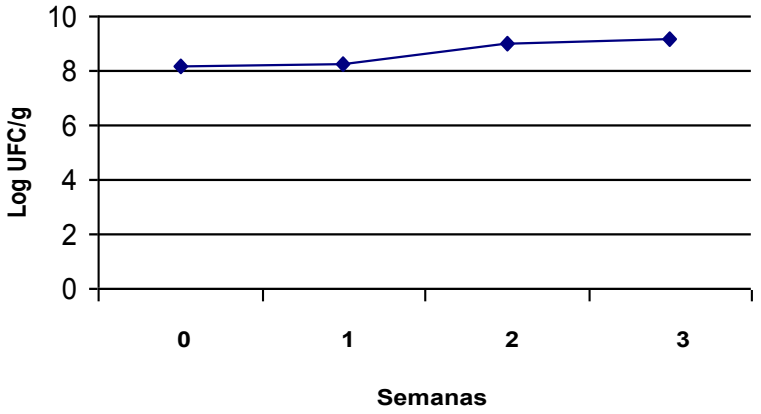


Figura 17. Sobrevivencia de microorganismos probióticos en queso fresco tipo panela mantenido a 4º C. Los valores son la media de tres repeticiones.

4.4.3. Calidad microbiológica

Los quesos con y sin probióticos se analizaron el primer día de su elaboración (semana 0) y las siguientes 3 semanas. En ninguna de las cuatro evaluaciones se encontraron microorganismos patógenos como *Salmonella* spp y *Listeria monocytogenes* en las tres replicas realizadas; tampoco se observó la presencia de levaduras. Los contenidos de organismos coliformes, hongos y *Staphylococcus aureus* en los quesos con probióticos y su control sin probióticos en las diferentes semanas evaluadas se indican en la tabla 9.

Tabla 9. Contenidos promedio de los microorganismos investigados en los quesos con y sin probióticos en los diferentes días.

Día	Coliformes (NMP/g) Límite máximo permitido = 100		Hongos (Log UFC/g) Límite máximo permitido = 500		*S. aureus* (UFC/g) Límite máximo permitido = 1000	
	Con Probióticos	Sin Probióticos	Con Probióticos	Sin Probióticos	Con Probióticos	Sin Probióticos
1	<0.03	0.154	3.45	3.40	50.66	417.3
8	0.102	<0.03	3.14	3.06	1.0	1.0
15	<0.03	<0.03	2.92	3.24	1.0	1.0
22	<0.03	<0.03	2.54	2.90	1.0*	2.5*

* Diferencia significativa

No hubo diferencia significativa entre el queso con probióticos y su control en los parámetros de coliformes totales, hongos y *S. aureus*.

La presencia de organismos coliformes y *S. aureus* no sobrepasó en ninguno de los análisis las especificaciones de la NOM-121-SSA (Quesos: frescos, madurados y procesados), sin embargo, la cantidad de hongos en las muestras de quesos con y sin probióticos sobrepasa la establecida en la NOM. Se observa una tendencia a la disminución del contenido de hongos al paso de los días, la cual es más evidente en el queso con probióticos.

Al comparar el contenido de microorganismos en el queso con probióticos con su control (sin probióticos) no se encontró diferencia significativa en ninguno de los días en coliformes, hongos y sólo en el día 22 se encontró diferencia significativa para de *S. aureus*.

4.4.4. Vida de anaquel

En tres experimentos por separado, los quesos con probióticos no presentaron signos de alteración ni cambios en sus propiedades organolépticas en los 21 días de almacenamiento, mientras que en los quesos sin probióticos hubo evidentes signos de alteración alrededor del día 17 en aroma y sabor, y para el día 20 se observaron coloraciones anormales en la superficie del queso.

4.4.5. Evaluación sensorial

La evaluación sensorial del queso consistió en dos pruebas, una analítica de diferenciación triangular y otra afectiva hedonista.

4.4.5.1. Prueba analítica de diferenciación triangular

En esta prueba se evaluaron cuatro parámetros del queso, el sabor, textura, aroma y color. Los panelistas degustaron las muestras (2 quesos sin probióticos y 1 con probióticos, codificadas con letras) con la finalidad de discriminar la que contenía probióticos.

Para el atributo de sabor y aroma solo 20 personas (38%) pudieron identificar la muestra B con probióticos, mientras que el 62% eligieron otra muestra como diferente (Figura 18). Los resultados indican que los panelistas no pueden diferenciar el sabor y aroma del queso que contiene probióticos del que no lo contiene ($p > 0.05$).

a) b)

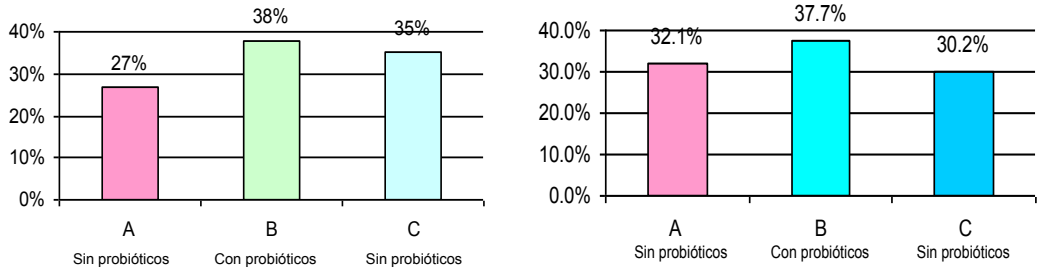


Figura 18. Resultados de la prueba de diferenciación triangular. a) sabor (n = 55), b) aroma (n = 54).

Los resultados para los atributos de color y textura se muestran en la Figura 19; solo un 29% y 39% respectivamente eligieron con precisión el queso con probióticos en estos atributos, los valores indican que no hay diferencia significativa entre el queso con probióticos y su control (p > 0.05).

a) b)

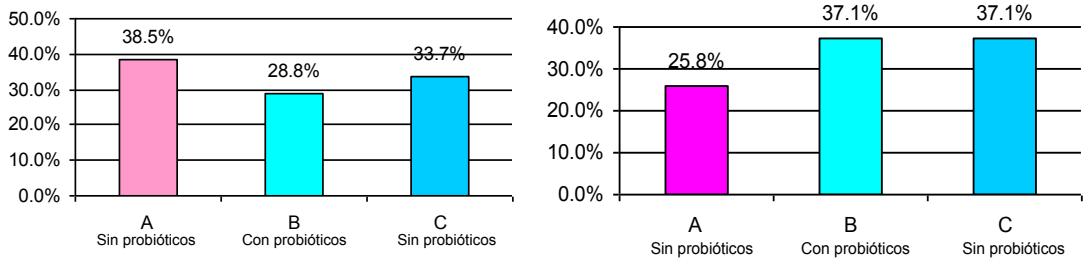


Figura 19. Resultados de la prueba de diferenciación triangular. a) color (n = 53), b) textura (n = 52).

La prueba de evaluación sensorial mostró que no se logró discriminar entre el queso con y sin probióticos en los diferentes atributos que se analizaron (p > 0.05), lo que lleva a asegurar que es posible incorporar microorganismos probióticos en este alimento sin afectar sus propiedades organolépticas.

4.4.5.2. Prueba afectiva hedonista

Las pruebas hedónicas permitieron conocer el nivel de agrado de un queso con probióticos, se realizó para los mismos atributos que la prueba de diferenciación (sabor, aroma, color y textura). Las respuestas de la escala estructurada (apéndice 3) se agruparon en 3 niveles (agrado, desagrado e indiferencia). Los resultados para sabor y aroma se muestran en la Figura 20. Con respecto al sabor del queso con probióticos el 84% de los jueces mostraron agrado hacia el producto mientras que solo un 43% para la característica de aroma, valor muy cercano al de indiferencia con un 38% en contraste con un 19% que expresó desagrado.

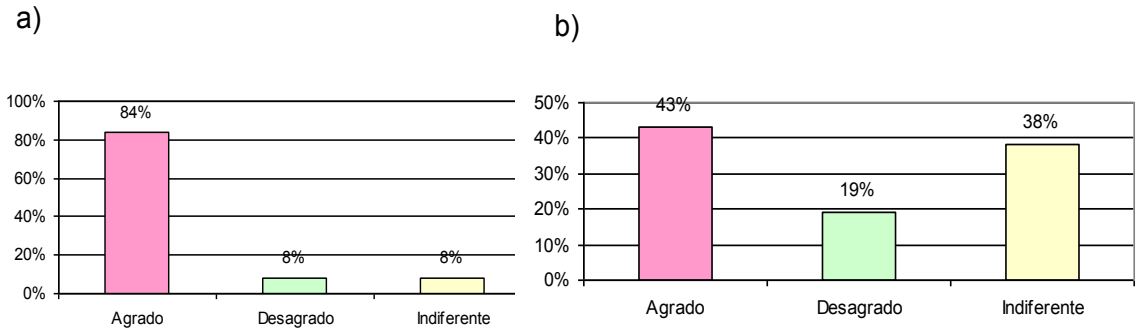


Figura 20. Resultados de la prueba afectiva hedónica a)sabor b)aroma (n = 63).

Para las características de color el 81% manifestó agrado y solo un 2% desagrado mientras que para la característica de textura el 89 % expresó agrado y un 9 % de desagrado como se observa en la Figura 21.

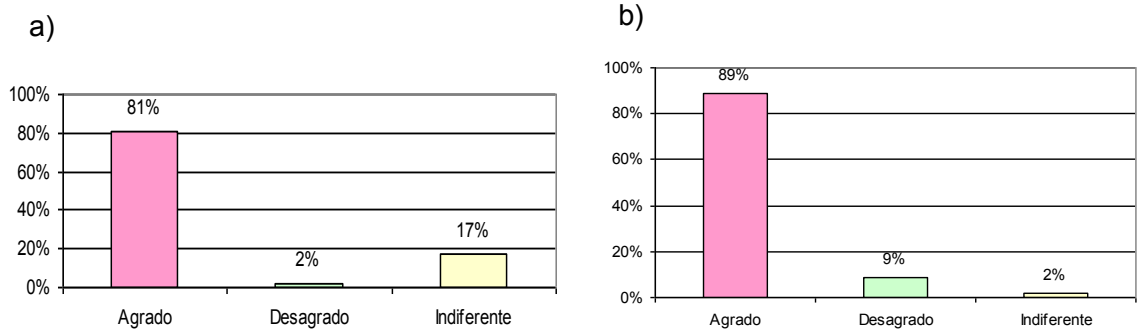


Figura 21. Resultados de la prueba afectiva hedónica a)color b)textura (n = 63).

Cuando a los jueces se les solicitó una valoración integral que incluyera todos los atributos se encontró con un 74% de agrado, 10% de desagrado y un 16% de indiferencia, lo que indica una buena aceptabilidad del producto.

4.5. EFECTO INHIBITORIO DE PROBIÓTICOS SOBRE Salmonella enteritidis *var. Typhimurium INOCULADA EN QUESOS FRESCOS TIPO PANELA*

Para determinar el efecto de los probióticos en el crecimiento de *Salmonella enteritidis* var. Typhimurium en quesos con probióticos se estandarizaron las técnicas de extracción del DNA y de la PCR, se realizaron pruebas de especificidad de los iniciadores y se determinó la presencia de *Salmonella* en quesos con y sin probióticos previamente inoculados con el patógeno.

4.5.1. Estandarización de la técnica de PCR para la detección de *Salmonella enteritidis* var. Typhimurium con cepas de referencia

Se seleccionó el gen *inv A* con los iniciadores 139 y 141 que amplifican un fragmento de 287 pb. En la técnica de PCR se determinó la temperatura óptima de alineamiento en 64º C, dando como resultado el siguiente programa: 1 ciclo a 94º C por 1 min, 35 ciclos de 94º C por 30 s seguido de 64º C por 30 s y 72º C por 30 s y finalmente 1 ciclo a 72º C por 4 min.

4.5.2. Pruebas de especificidad

Se probó la especificidad del par de iniciadores al utilizar 9 diferentes microorganismos patógenos ya descritos en la metodología, y 35 cepas de bacterias lácticas y probióticas, éstos fueron previamente caracterizados con un perfil bioquímico (datos no mostrados). No se generaron falsos positivos con los patógenos diferentes a *Salmonella* ni con las bacterias

lácticas y probióticas, tampoco se visualizaron bandas inespecíficas. En la Figura 22 se observan los resultados de una electroforesis de productos de PCR de gen *inv* A para detección de *Salmonella*. En la tabla 10 se presentan los resultados de las pruebas de especificidad con las diferentes cepas probadas.

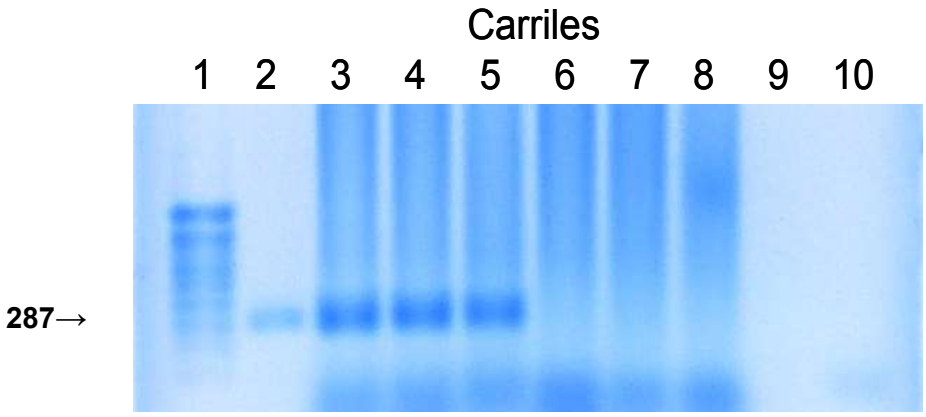


Figura 22. Pruebas de especificidad de los iniciadores para el gen i*nv* A. Carril 1, Marcador de pb; 2, Control (+); 3, *S. enteritidis* var.Typhimurium*;* 4, *S. enteritidis* var. Parathyphi*;* 5, *S. enteritidis* var. Enteritidis; 6, *Listeria monocytogenes;* 7, *Escherichia coli* O157:H7; 8, *Staphylococcus aureus;* 9, vacío y 10, Control (–) (sin DNA).

Tabla 10. Pruebas de especificidad de los iniciadores para el gen *inv* A para identificar *Salmonella.*

Origen	Microorganismos	# de cepas	Resultado
Cepa de referencia	*S. enteritidis* var. Typhimurium (ATTC 13311)	1	+
	S. enteritidis var. Parathyphi Gpo A (ATCC 9150)	1	+
	S. enteritidis var. Enteritidis Gpo D (ATCC 13076)	1	+
	Bacillus cereus (ATCC 13061)	1	-
	Staphylococcus aureus (ATCC 6538)	1	-
	Listeria monocytogenes (ATCC 7644)	1	-
	Escherichia coli O157:H7 (ATCC 4350)	1	-
	Escherichia coli O157 (LMS- FCB, UANL)	1	-
	Yersinia enterocolitica (LMG-FCB-UANL)	1	-
Bebidas	*Lactobacillus casei*	2	-
	L. acidophilus	2	-
	L. paracasei	2	-
Leche en polvo	*Bifidobacterium bifidus*	1	-
	Bifidobacterium	5	-
	B. longum	1	-
	L. acidophilus	1	-
	L. plantarum	1	-
	Streptococcus termophilus	1	-
Suplementos	*Bifidobacterium*	2	-
	B. longum	1	-
	L. acidophilus	5	-
	L. rhamnosus	1	-
	L. delbrueckii	1	-
Liofilizados	*L. rhamnosus*	4	-
	L. plantarum	2	-
	L. acidophilus	2	-
	B. animalis subsp. *lactis*	1	-

4.5.3. Estandarización de PCR en muestras de queso tipo panela

Para la estandarización de las condiciones de PCR de *Salmonella enteritidis* var. Typhimurium en muestras de queso, primero se realizó la inoculación de la cepa (ATTC 13076) como fue descrito en el apartado 3.9.1 de metodología, la extracción de DNA se llevó a cabo por el método

de CTAB. Cuando se utilizó el kit comercial DNAzol® en muestras de quesos no se obtuvieron productos de amplificación, probablemente algún componente del queso inhibe el proceso de amplificación del DNA.

4.5.4. Límite de detección de *Salmonella* por PCR

Se determinó el límite de detección al inocular *S. enteritidis* var. Typhimurium en 25 g de queso en concentraciones de 10^5 hasta 10^{-2} UFC/g de queso, se realizaron cuatro ensayos por duplicado, los resultados se muestran en la tabla 11. Con estos resultados se determinó que la inoculación de los quesos sería con concentraciones de 100 hasta 0.1 UFC/g donde se detectó con seguridad.

Tabla 11. Límite de detección de *Salmonella* inoculada en queso tipo panela.

Inóculo en queso UFC/g	Frecuencia de Detección
10^5	8/8
10^4	8/8
10^3	8/8
10^2	8/8
10^1	8/8
1	8/8
10^{-1}	8/8
10^{-2}	4/8

4.5.5. Inhibición de *Salmonella* en quesos con probióticos

Al analizar la presencia de *Salmonella enteritidis* var. Typhimurium en quesos inoculados con diferentes concentraciones del patógeno, se observó que en los quesos con la adición de probióticos se advierte la presencia del patógeno solo con las mayores concentraciones de inóculo; en contraste, se observó una mayor presencia de *Salmonella* en los quesos sin probióticos desde 10^2 a 1 UFC/g, como se observa en la Figura

23 donde se muestran los resultados de una electroforesis de productos de PCR para detección de *Salmonella* en quesos con y sin probióticos.

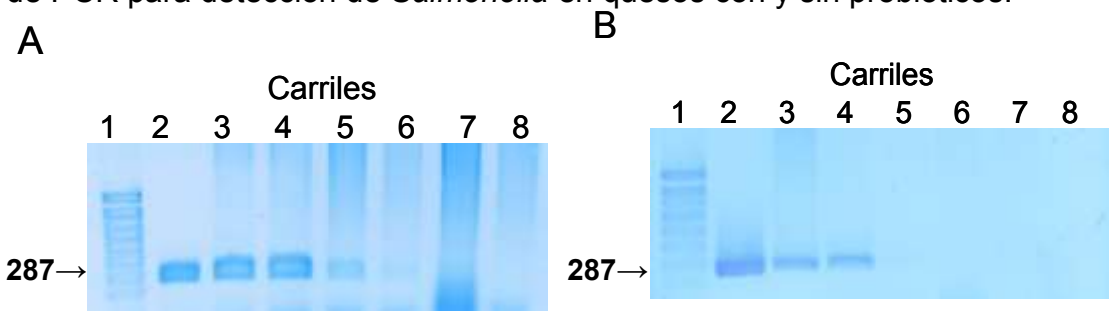


Figura 23. Electroforesis de productos de PCR de gen i*nv* A para detección de *Salmonella*. A) queso sin probióticos, B) queso con probióticos. Carril 1 Marcador de pb, 2 control positivo, carriles 3 al 6 queso inoculado con *Salmonella* con 10^2 a 10^{-1} UFC/g, carriles 7 queso sin *Salmonella* y carril 8 control negativo.

La frecuencia de detección de *Salmonella* en queso con y sin probióticos a las diferentes concentraciones de inóculo se muestra en la tabla 12, en el queso sin probióticos se detectó el patógeno en porcentajes mayores en todas las concentraciones de inóculo, esto fue más evidente en el día 2 del tratamiento y en la concentración de 10^1 de inóculo de *Salmonella.*

Tabla 12. Frecuencia de detección de *Salmonella* en quesos con y sin probióticos a diferentes concentraciones de inóculo.

	Frecuencia de detección de *Salmonella* (%)							
	Sin probióticos				**Con probióticos**			
	Concentración de inóculo UFC/g							
Día	**10^2**	**10^1**	**1**	**10^{-1}**	**10^2**	**10^1**	**1**	**10^{-1}**
0	100	100	66	66	80	40	60	60
1	66	100	33	66	60	80	40	20
2	100	100	100	66	60	20	20	0
3	100	100	66	33	60	60	20	20
4	100	50	0	0	75	25	0	0

En la Figura 24 se observa la frecuencia de detección de *Salmonella* al transcurrir el tiempo. Se observa que en los quesos sin probióticos el patógeno se detectó en un mayor porcentaje, en contraste con el queso con probióticos. Esta tendencia se observó con las diferentes

concentraciones de patógeno. No se presentó dependencia significativa en el porcentaje de detección de *Salmonella* en los diferentes días en los quesos con y sin probióticos. Estos resultados son similares en las cuatro concentraciones analizadas.

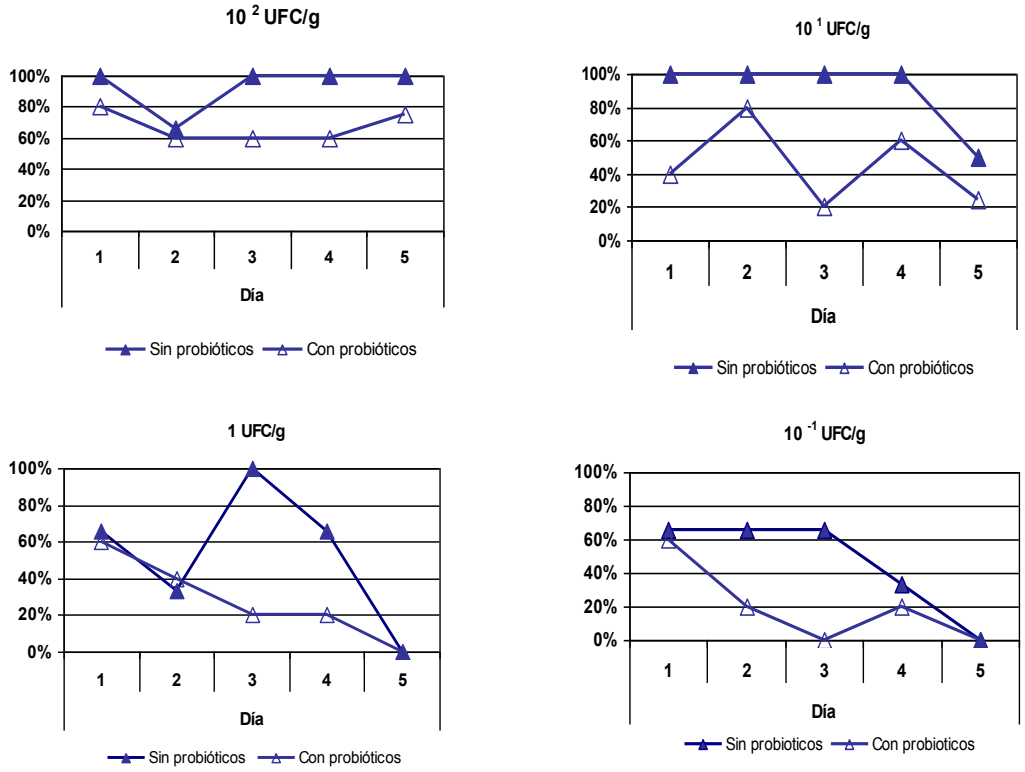


Figura 24. Frecuencia de detección de *Salmonella* en quesos con y sin probióticos por día a diferentes concentraciones de inóculo. Cada gráfica indica una concentración diferente de inóculo de *Salmonella*. Los símbolos sólidos corresponden a quesos sin probióticos y las vacías a los quesos con probióticos.

En la Figura 25 se muestra los resultados del análisis de frecuencia de detección de *Salmonella* en quesos con y sin probióticos en los diferentes días. No se presentó dependencia significativa en el porcentaje de detección de *Salmonella* en las diferentes concentraciones de inóculo en lo quesos con y sin probióticos. Estos resultados son similares en los primeros cuatro días, sin embargo, en el último día del experimento se encontró dependencia significativa solo en el queso con probióticos.

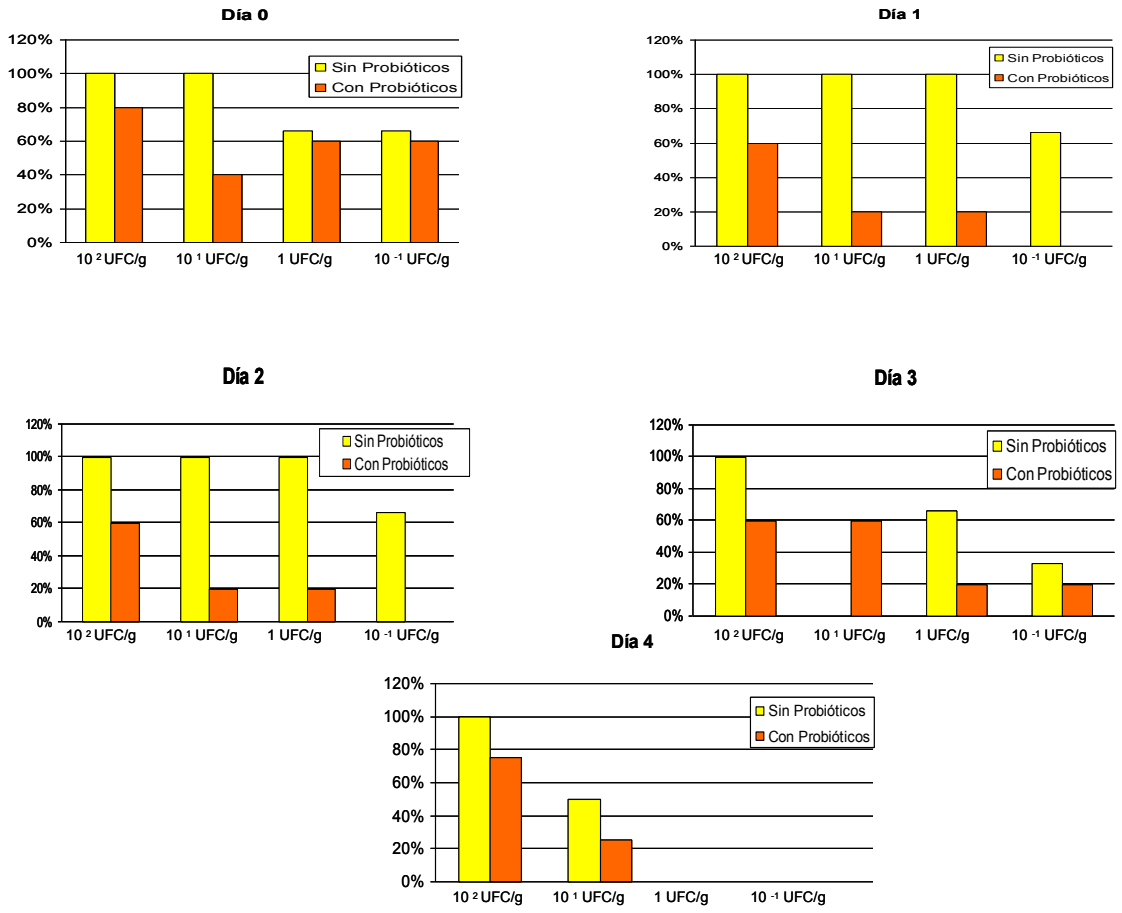


Figura 25. Frecuencia de detección de *Salmonella* en quesos con y sin probióticos por concentración de inóculo a diferentes días.

El grado de inhibición de la *Salmonella enteritiris* var. Typhimurium inoculada en quesos que contenían probióticos comparada con el queso control se analizó estadísticamente mediante la prueba de Mann-Whitney. Se observó un efecto positivo significativo de los probióticos en la inhibición del patógeno, en el día 2 en las concentraciones de $1x10^{1}$, 1 y $1x10^{-1}$ UFC/g.

Tabla 13. Prueba de Mann-Whitney de comparación de resultados de la presencia de *Salmonella* en quesos con y sin probióticos por día y concentración.

Día	Concentración							
	10^2 UFC/g		10^1 UFC/g		1 UFC/g		10^{-1} UFC/g	
	z	p	z	p	z	p	z	p
0	0.775	0.439	1.587	0.112	0.176	0.860	0.176	0.860
1	0.176	0.860	0.775	0.439	0.176	0.860	1.235	0.217
2	1.183	0.237	2.049	0.040*	2.049	0.040*	1.972	0.049*
3	1.183	0.237	1.183	0.237	1.235	0.217	0.394	0.693
4	0.707	0.480	0.559	0.576	0.000	1.000	0.000	1.000

* Diferencia significativa ($p < 0.05$).

Para determinar la concentración de inóculo en el que se presentó la mayor inhibición por los probióticos, así como también el tiempo en el que se dio la mayor inhibición, se obtuvo la diferencia entre la detección de *Salmonella* en los quesos con y sin probióticos para cada día y concentración de inóculo y se encontraron los valores que se muestran en la tabla 14, y la Figura 24. Se aprecia que los valores mayores corresponden a la concentración de 10^1 de inóculo y al segundo día de incubación.

Tabla 14. Diferencia entre la detección de *Salmonella* en los quesos con y sin probióticos (Queso sin probióticos – Queso con probióticos)

Día	Concentración de inóculo (UFC/g)			
	10^2	10^1	10^0	10^{-1}
0	20	60	6	6
1	6	20	-7	40
2	40	80	80	66
3	40	40	40	13
4	25	25	0	0

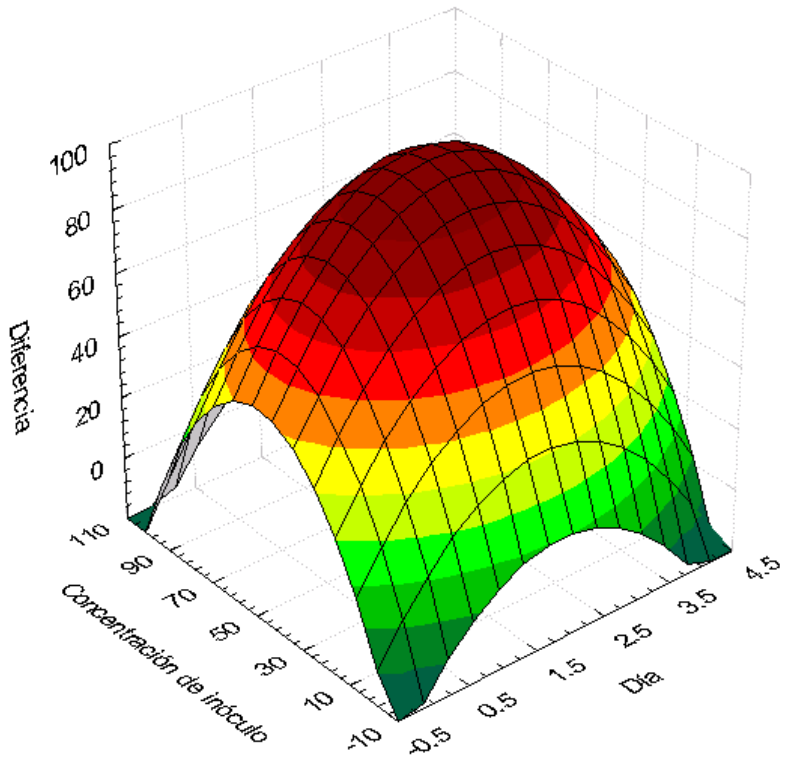


Figura 26. Diferencia de detección de *Salmonella* a diferentes días y concentraciones de inóculo.

Se observó que la adición de probióticos en el queso puede inhibir el crecimiento de *Salmonella* ya que se disminuyó hasta en un 80% la detección del patógeno, cuando se inoculó con 10^1 y 1 UFC/g en el día 2 del experimento, mientras que con inóculos de 10^2 UFC/g la inhibición fue menor, se alcanzaron valores máximos de 40%, cuando el inóculo fue con 1 UFC/g la inhibición máxima alcanzada fue del 80% en el día 2, pero con valores bajos los primeros y últimos días del experimento, resultados similares se presentaron con inóculo de 10^{-1} UFC/g donde se encontró una inhibición máxima de 66% en el día 2 y de 0% al cuarto día del estudio.

Se comprueba que la adición de probióticos puede inhibir el crecimiento de *Salmonella enteritidis* var. Ttyphimurium en forma temporal y es mas eficiente cuando la concentración del patógeno es10^{-1} UFC/g.

CAPITULO 5

DISCUSIÓN

5.1. EVALUACIÓN DE PRODUCTOS CON PROBIÓTICOS

El mercado de probióticos ha crecido de manera considerable en los últimos años; los productores, además de los microorganismos tradicionales, están utilizando cepas nuevas que deben ser evaluadas con la finalidad de asegurar que no exista riesgo en los consumidores y que los productos ejerzan los efectos benéficos que promulgan. En diferentes países se encontró que no todos los productos con probióticos presentan información de los microorganismos que contienen ni sus cantidades; además, en algunos casos, hay una falta de concordancia entre lo declarado y el contenido real en los productos.

De acuerdo a los mas recientes hallazgos, los efectos benéficos de los probióticos son específicos de especie (Salminen *et al.,* 1998); además, la cantidad de microorganismos que se requiere ingerir para conseguir un efecto específico no es igual para cada cepa, por lo que se considera que las propiedades benéficas de los probióticos dependen de la cepa que se trate (Vanderhoff y Young, 2002). Por lo anterior, resulta fundamental que en los productos probióticos que se comercializan se indique con claridad el tipo de microorganismos que contienen. Asimismo, es importante que la información de los microorganismos declarada por los fabricantes sea fidedigna, que estas especies de microorganismos se encuentren en los productos.

Un objetivo en este trabajo fue evaluar algunos productos con probióticos en aspectos como identificación de los microorganismos, su contenido y la sobrevivencia de los mismos hasta su fecha de caducidad.

Al analizar la información de las etiquetas, se encontró que solamente el 60% de los productos especifican el género y la especie de los microorganismos

contenidos, el 20% solo especifica el género y el 20% restante presenta información muy imprecisa, lo que sugiere un etiquetado deficiente; esta situación no es un problema exclusivo de México ya que existen reportes de otros países donde también se presenta esta falta de precisión. En un estudio realizado en Inglaterra, Hamilton y col. (1999) encontraron que en más de la mitad de los productos probióticos analizados no se especifica los microorganismos que contienen, siendo el yogurt el alimento con un etiquetado mas deficiente, en el caso de los suplementos, se observó que el 89% de los productos especificaba los géneros y las especies que contenían. En Italia, Fasoli y col. (2003) encontraron que solo el 54% de los yogurt con probióticos especifican de manera completa los microorganismos que contienen en contraste con el 95% de los productos liofilizados aunque con graves incongruencias ya que emplean nombres obsoletos o muy imprecisos como *Lactobacillus sporogenes* en lugar de *Bacillus coagulans*; cabe señalar que en ese estudio la mayoría de los microorganismos encontrados no correspondieron a los declarados en las etiquetas. Esto problemática a llevado a proponer la necesidad de establecer una reglamentación que regule el etiquetado de los diferentes productos que contienen probióticos, como sucede en Sudáfrica (Theunissen *et al*., 2005). Sin embargo, la principal dificultad para dicha reglamentación es la similitud bioquímica entre las especies, siendo necesario el uso de técnicas y equipos capaces de determinar características fisiológicas y genómicas que no son comunes en la mayoría de los laboratorios para una identificación confiable (Klein *et al.,* 1998).

En este trabajo se estudió también la correspondencia entre el microorganismo declarado en la etiqueta y el encontrado en el producto. Al comparar los microorganismos encontrados con respecto a los reportados se observó que un 30% de los productos corresponden en género y especie a lo declarado en las etiquetas, un 20% que solo específica el género, y en un 40% de los productos se encontraron más especies que las declaradas. Esta falta de concordancia fue reportada anteriormente por diversos autores. En Bélgica, Temmerman y col. (2003) encontraron mal etiquetados un 47% de los suplementos y 40% de

los productos lácteos analizados. En Francia el 30% de los probióticos con *Lactobacillus* presentaron también este problema donde además en un 40% no encontraron ningún *Lactobacillus* viable (Coeuret *et al.,* 2004), y en Canada ninguno de los 10 productos analizados coincidieron con lo reportado en las etiquetas (Huff, 2004).

En los productos analizados en este estudio no se encontraron especies de microorganismos potencialmente patógenos, resultado que contrasta con lo publicado por Hamilton y col. (1999) donde encontraron *Enterococcus faecium* en un 17% de los productos analizados y por Elliot yTeversham (2004) quienes observaron este mismo patógeno potencial en un 22% de los productos analizados, lo que representa un serio riesgo para la salud de los consumidores.

Para que un alimento se considere un eficiente vehículo de probióticos es necesario que el cultivo agregado durante el proceso de elaboración permanezca viable a altas concentraciones durante el tiempo de vida de anaquel. Algunas organizaciones internacionales proponen una concentración mínima de 1.6×10^7 UFC por gramo o mililitro de producto para que se generen los efectos benéficos a la salud de los consumidores (Lourens-Hattingh y Viljoen 2001; Stanton *et al.,* 2001). De acuerdo a lo propuesto por Sanders y Veld, (1999) es necesaria la ingestión de una dosis mínima diaria de 10^9 a 10^{10} para que puedan ser observados los efectos en la salud.

En este estudio, en 4 de los 10 productos analizados se especifica en las etiquetas la cantidad de microorganismos viables que contienen (una bebida láctea y 3 suplementos), y al comparar las cuentas de microorganismos probióticos totales con las cantidades declaradas, se observó que solo una bebida láctea especifica y cumple con el contenido marcado en la publicidad, y dos productos no lo especifican, lo mismo sucede con las leches en polvo, mientras que en los suplementos las cantidades de microorganismos obtenidos en el presente estudio son menores de 1 a 4 ciclos logarítmicos.

Al analizar los productos de acuerdo a su tipo, se encontró que un 66% de las bebidas, un 33% de las leches en polvo y ninguno de los suplementos cumplen con lo propuesto por las organizaciones internacionales de un mínimo de 10^7 UFC por gramo o mililitro de producto, iguales resultados se obtienen al analizar los consumos por día de acuerdo a las recomendaciones o dosificaciones de los fabricantes.

El contenido de microorganismos en las bebidas estudiadas fue menor de 0.5 a un ciclo logarítmico a los valores reportados por la procuraduría federal del consumidor en un estudio reportado en el 2004 (Revista del consumidor, 2004), probablemente esta variación se deba a los días que podían haber transcurrido desde que se generó el producto hasta que se tomaron las muestras en las tiendas, o a que durante la distribución de los productos, no se aseguró que éstos permanecieran a las temperaturas adecuadas.

El contenido de microorganismos encontrado en las bebidas lácteas (10^6 a 10^8 UFC/ml) es similar a los encontrados por Temmerman y col. (2003) quienes reportaron valores de 10^5 a 10^9 UFC/ml y por Fasoli y col. (2003) con valores de 10^5 a 10^7 UFC/ml.

En este trabajo se observaron bajos valores de microorganismos probióticos en los diferentes suplementos, esta es una situación que también fue publicada por Hamilton y col. (1999) que encontraron variaciones desde un nulo crecimiento hasta los valores declarados en las etiquetas, pero menos del 40% de los productos contenían cantidades aceptables o satisfactorias de microorganismos. Temmerman y col. (2003) encontraron valores de 10^3 a 10^6 UFC/g, mientras que, Fasoli y col. (2003) encontraron que la mayoría de los productos contenían valores más bajos que los declarados y un 28% presentó valores menores a 10 UFC/g.

La baja cuenta de probióticos en los suplementos o preparaciones farmacéuticas es posiblemente debido al estrés o daño que los tratamientos tecnológicos pueden producir en los microorganismos (Knorr, 1998), dando como resultado que los microorganismos, en especial los del género *Bifidobacterium* que son microorganismos anaerobios altamente sensibles a las presencia de oxígeno, no puedan ser cultivables pero mantienen la membrana celular funcional durante el período de almacenamiento de los productos, en un proceso de dormancia (Latineen *et al.,* 2005).

Al analizar la sobrevivencia de los probióticos en las bebidas lácteas, se observaron niveles aceptables (con reducciones de 0.3 a 1.5 unidades logarítmicas) y son similares a las encontradas por Davidson y col. (2000) y Hernández (2002) donde se conservan cantidades suficientes con capacidad de ejercer un efecto benéfico. Asimismo, la cantidad de probióticos se mantuvo aun después de la feche de caducidad que los productores establecieron en promedio 6 días mas, en forma similar a lo reportado por Shin y col. (2000).

Los probióticos en las leches en polvo presentaron una muy buena sobrevivencia en los cinco meses que se analizaron, tiempo superior al que usualmente el producto se mantiene en uso y los fabricantes recomiendan que se consuma. Los contenidos y la sobrevivencia de los probióticos encontrados en leches en polvo para lactantes son similares (10^7) a los que han sido reportados por otros investigadores en estudios clínicos (Saavedra *et al.,* 2004, Weizman *et al.,* 2005).

Se ha indicado que la leche y los productos lácteos son un sustrato idóneo para el desarrollo de los probióticos dada la variabilidad de nutrientes y la capacidad amortiguadora de este alimento (Ostile *et al.,* 2003). Sin embargo, también se ha logrado la sobrevivencia de probióticos en valores superiores a 10^9 UFC/ml utilizando leche de soya (Shimakawa *et al.,* 2003). Por otra parte, Dubey y Mistry (1996) observaron que no todas las especies de *Bifidobacterium* poseen características especificas que le permiten el crecimiento en estos sustratos y

que su crecimiento dependen de la formula láctea (leche, hidrolizado de caseína o soya).

Se analizó la calidad microbiológica de los productos con probióticos y se contrastaron los resultados con las especificaciones de las normas oficiales establecidas por la Secretaria de Salud.

Ninguno de los productos presentó microorganismos patógenos. Algunas muestras de bebidas presentaron valores superiores a los que se establecen en las normas para esos productos en las especificaciones de coliformes y levaduras, lo que sugiere deficiencia en el control de calidad en la elaboración y/o manejo de los productos.

Por lo que si bien con los bajos valores de probióticos no podría asegurarse un efecto positivo a la salud, es posible decir que no existe riesgo que estos productos puedan originar estados patológicos en los consumidores

5.2. ACCIÓN ANTAGÓNICA *IN VITRO* DE LOS PROBIÓTICOS CONTRA MICROORGANISMOS PATÓGENOS

Para evaluar la efectividad probiótica de las cepas aisladas de los productos analizados, se determinó la actividad antimicrobiana de los microorganismos aislados de estos productos y de los liofilizados comerciales. Este efecto antimicrobiano se analizó a través de pruebas *in vitro* de inhibición del crecimiento de bacterias patógenas (Kociubinski, 1996).

Los resultados muestran que de las 32 cepas analizadas, 25 dieron evidencia de actividad antimicrobiana contra los nueve patógenos de prueba; esto sugiere que los probióticos analizados producen sustancias que difunden al medio de cultivo y que ejercen actividad inhibitoria, tal como se ha descrito previamente (Stiles, 1996; Villegas y Gilliland, 1998). Torres (2002) describió que el efecto antimicrobiano de los probióticos podría deberse a la producción de sustancias

tales como bacteriocinas, ácidos grasos, ácidos orgánicos y peróxido de hidrógeno, entre otras, que inhiben el crecimiento de otros microorganismos relacionados que repercuten en la modificación de la ecología bacteriana. En el presente trabajo quedó de manifiesto la producción de alguna(s) sustancia(s) con estas características.

Por otra parte, hubo 7 cepas de probióticos que no mostraron efecto inhibitorio, de las cuales, 4 son las aisladas de suplementos. Es posible que las cepas aisladas de los suplementos hayan estado expuestas a condiciones que no permitan su crecimiento -estrés bacteriano- y/o producción adecuada de sustancias con actividad antimicrobiana, como lo describe Knorr (1998); sin embargo, se debe considerar que los microorganismos probióticos actuan mostrando sus efectos benéficos a través de diversos mecanismos, no solamente con la producción de sustancias antimicrobianas sino también con el efecto barrera o a través de la modulación del sistema inmune (Guarner, 2000b; Sanders, 2000), de tal forma que no se puede descartar que las cepas aisladas sean capaces de funcionar como probióticos al ser ingeridas en los alimentos.

Para analizar con mayor profundidad el efecto inhibitorio de las 25 cepas que produjeron sustancias difusibles, se determinó el grado de inhibición que producen los sobrenadantes de los probióticos aislados sobre los patógenos de prueba en diferentes condiciones. Los resultados muestran que todas las cepas aisladas de liofilizados comerciales tuvieron efectos muy similares contra los patógenos de prueba; estos resultados también se presentan al comparar el efecto inhibitorio entre las cepas aisladas de bebidas y de leches en polvo. Al analizar si el origen de las cepas influye sobre el grado de actividad inhibitoria, se observó que los patógenos fueron mas sensibles a la acción de las cepas aisladas de liofilizados y de bebidas que a las que provienen de las leches en polvo. Carvalho y col. (2004) demostraron que las preparaciones liofilizadas tienen algunas ventajas comparadas con los productos probióticos como las bebidas ya que exhiben mejores características de viabilidad y tiempos de almacenamiento.

De las cepas con que exhibieron actividad antimicrobiana, se evaluó si el producto de origen éstas afecta el grado de inhibición de los patógenos. Los resultados indican que los probióticos ejercen el mismo grado de inhibición, independientemente del producto del que fue aislado. Otra característica analizada fue la sensibilidad de los patógenos a los diversos probióticos y se encontró que los patógenos mas sensibles a las cepas aisladas fueron de los géneros *Salmonella* y *Yersinia*. El efecto de los probióticos sobre *Salmonella* ya fue analizado previamente por Hudahult y col (1997) quienes describen que el proceso puede deberse a la producción de sustancias antimicrobianas o al ácido láctico.

En general, se puede concluir que las cepas aisladas de los productos con probióticos tienen efecto antimicrobiano *in vitro*, lo que sugiere la generación de sustancias difusibles (bacteriocinas, entre otras) que podrían modificar la ecología intestinal.

5.3. ELABORACIÓN DE NUEVOS PRODUCTOS CON PROBIÓTICOS

Tradicionalmente, los alimentos que se utilizan para el consumo de probióticos son los productos lácteos como leches fermentadas y el yogurt; sin embargo, actualmente se estudia la eficiencia de otros productos como vehículos con la finalidad de incrementar la oferta de éstos para beneficiar a una mayor población.

Además, el uso de alimentos con varias especies de probióticos ha mostrado ser mas eficientes que los productos con una sola especie dado que se potencian los efectos benéficos a la salud y además se logran ventajas tecnológicas y organolépticas (Timmerman *et al.,* 2004). Por ejemplo, Vinderola y col. (2000) han descrito que *Bifidobacterium* mejora su sobrevivencia a pH

bajos, condición que es estimulada por la presencia de *Lactobacillus;* Por otra parte, *L. plantarum,* en queso Munster, puede generar bacteriocinas que inhiben el desarrollos de patógenos como *Listeria* (Ennahar, 1998; Loessner, 2003).

Con este objetivo se investigó la eficacia del queso fresco tipo panela como un sistema útil para incorporar una mezcla de microorganismos probióticos, así como el efecto de estos sobre la calidad microbiológica, la vida de anaquel y la aceptabilidad del producto.

Nuestros resultados preliminares permitieron decidir el uso de una mezcla de probióticos que no modificara las características organolépticas del producto y que favoreciera la sobrevivencia de los microorganismos probióticos. La mezcla elegida estuvo formada de *L. casei rhamnosus*, *L. plantarum* y *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*. Además de las ventajas tecnológicas, los probióticos seleccionados puede ejercer efectos benéficos a la salud complementarios. Anteriores estudios han demostrado que *Bifidobacterium lactis* acorta la diarrea por rotavirus y tiene efectos benéficos en el tratamiento de alergias (Ouwehand *et al.,* 2002; Kirjavainen *et al.,* 2002). *L. rhamnosus* es eficaz en el tratamiento de diarrea asociada a antibióticos e inhibe la adherencia de patógenos *in vitro* (Arvola, *et al.,* 1999; Lee *et al.,* 2003). *L. plantarum* se ha utilizado en el tratamiento de síndrome de colon irritable, y en la reducción de los niveles séricos de LDL colesterol (Salminen *et al.,* 1996; Molin, 2001).

Algunas organizaciones internacionales han propuesto que para que se generen los efectos benéficos a la salud de los consumidores, los alimentos deben contener una concentración mínima de 1×10^7 UFC de probióticos por gramo o mililitro de producto; en este trabajo, el queso fresco elaborado con *L. casei rhamnosus, L. plantarum* y *B. adolescentis* alcanzó una concentración de probióticos de 1.6×10^8 UFC/g, por lo que puede considerarse que cumple con esta condición. Otros investigadores elaboraron quesos con contenidos similares, por ejemplo Vinderola y col. (2000) elaboraron un queso fresco con

una mezcla de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* con un contenido de 10^8 UFC/g y, Kasimoglu y col. (2004) elaboraron un queso blanco con *L. acidophilus* y encontraron que los microorganismos sobreviven en cantidades superiores a 10^7 UFC/g.

Una característica deseable de los alimentos con probióticos es que los microorganismos adicionados puedan sobrevivir durante la vida de anaquel del producto. En el queso fresco elaborado se observó que los microorganismos adicionados no disminuyen en cantidad durante el tiempo de vida de anaquel del producto. Estos resultados son semejantes a los descritos por Vinderola y col. (2000) que reportó una reducción de cero a un ciclo logarítmico en 60 días en quesos frescos tipo argentino en las diferentes combinaciones. Por su parte, Kasimoglu y col. (2004) encontraron una disminución de 3 ciclos logarítmicos en 90 días en queso blanco madurado. Otros autores encontraron resultados aceptables de sobrevivencia en quesos tipo cheddar (Gardiner *et al.,* 1998; Daigle *et al.,* 1999, Gardiner *et al.,* 2002). Se ha observado que la variación en la sobrevivencia depende también de la especie o cepa que se adicione al queso, como lo evidenciaron Brearty y col. (2001) quienes encontraron diferencia entre *B. lactis* Bb12 y *B. longum* BB536. Se ha descrito que la capacidad de sobrevivir de los microorganismos probióticos en quesos podría deberse a la capacidad amortiguadora del producto así como de otros compuestos de la matriz (Gardiner *et al.,* 1999). Los datos presentados por Boylston y col. (2004) indican que algunos quesos contienen compuestos, como la para-κ-caseina, que se producen cuando la renina es utilizada como agente coagulante y que actúan como promotores del crecimiento de probióticos. Posiblemente, el incremento de un ciclo logarítmico del contenido de probióticos observado en el presente trabajo se deba al efecto estimulante de la para-κ-caseina formada.

Al analizar la calidad microbiológica de los quesos con probióticos y sus controles, se encontraron resultados similares. En ambos quesos, no se encontraron los patógenos *Salmonella* y *Listeria* y los contenidos de coliformes

y *S. aureus* fueron inferiores a los límites máximos permitidos por las Normas Oficiales Mexicanas. Aunque se ha reportado que la adición de probióticos disminuye la contaminación en los productos que los contienen (Stiles, 1996), en este trabajo no se observó este fenómeno debido posiblemente a las bajas cantidades de microorganismos contaminantes encontrados en los quesos estudiados. Por otra parte, se observó una ligera tendencia a mejorar la vida de anaquel de los productos con probióticos en los parámetros de aroma y sabor.

Es deseable en los alimentos con probióticos que los microorganismos adicionados no alteren las propiedades organolépticas del producto para lograr su aceptación por los consumidores. En este trabajo, los probióticos adicionados al queso no generaron cambios en los atributos de sabor, aroma, textura y color y son comparables a su control, lo que sugiere que la adición de la mezcla de probióticos no tiene efectos adversos en las características sensoriales del producto. Estos resultados son semejantes a los reportados por Gardiner y col. (1998) en queso cheddar adicionado con *L. salivarius* y *L. paracasei,* pero difieren de los reportados por otros investigadores tales como Davidson y col. (2000) en helado de yogurt, Blanchette y col. (1996) en queso cottage y Kasimoglu y col. (2004) en queso blanco.

5.4. EFECTO INHIBITORIO DE PROBIÓTICOS SOBRE Salmonella enteritidis var. Typhimurium INOCULADA EN QUESOS FRESCOS TIPO PANELA

La salmonelosis es una infección de importancia en salud pública debido al impacto socioeconómico que ocasiona tanto en los países en desarrollo como en los desarrollados. Es una enfermedad transmitida por los alimentos los cuales causan la mayor parte de los brotes de gastroenteritis (Gutiérrez-Cogco, *et al.,* 2000). En México en la década pasada, las notificaciones de casos por salmonelosis fueron desde 100 342 al inicio de la década hasta 215 155 al finalizarla (SSA, 1998).

Los productos lácteos son un vehículo de ingestión de *Salmonella* siendo reportada su presencia y sobrevivencia en los diferentes tipos de quesos (El-Gazzar y Marth, 1992). El riesgo de contaminación por *Salmonella* en quesos frescos es mayor por sus características de baja acidez y alto contenido de humedad (Peraza, 2001) además de que se potencia el riesgo de infección debido a que se consumen sin procesos de cocción.

Para disminuir el riesgo de contaminación en quesos se han implementado diversas estrategias como el uso de conservadores químicos, empaques al vacío y el empleo de bacteriocinas como la nisina (Delves-Broughton,1996) que tiene la ventaja de ser estable al calor y no conferir sabor cuando se adiciona a los alimentos (Garduño, 1999). Debido a esto, algunos investigadores comienzan a probar el uso de probióticos como bioconservadores.

Para evaluar la efectividad de los probióticos adicionados a los quesos sobre *Salmonella enteritidis* var. Typhimurium, se analizó el efecto de inhibición del crecimiento del patógeno inoculado artificialmente a través de pruebas *in vitro* a diferentes concentraciones y se comparó con un queso que no contenía probióticos.

Los resultados muestran que en los quesos sin probióticos el patógeno se detectó en un mayor porcentaje, en contraste con el queso con probióticos. Esta tendencia se observó con las diferentes concentraciones de patógeno. Estos resultados son similares a los descritos por Saad y col. (2001) al estudiar la inhibición de E. coli O157:H7 en queso Minas (queso fresco típico de Brasil) con *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* y *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* y se encontró que las bacterias lácticas disminuyen significativamente la cantidad del patógeno, lo que demuestra que la adición de probióticos puede ser efectiva para disminuir los riesgos en quesos frescos, que por sus características, son muy vulnerables de contaminarse.

Cabe destacar que, aunque se ha reportado que la acidez es el principal responsable de la inhibición de patógenos, como *Salmonella* como ha sido descrito por Brasheard y Durre, (1999) en experimentos *in vitro* y por Barrantes y col. (2004) en yogurt inoculado con *Listeria monocytogenes* y *E. coli* O157:H7, el efecto inhibitorio observado en este trabajo no parece ser debido a este factor ya que en ambos quesos el pH fue similar.

El análisis estadístico del grado de inhibición de la *Salmonella typhimurium* inoculada en quesos que contenían probióticos comparada con el queso control reveló un efecto positivo de los probióticos en la inhibición del patógeno que depende del tiempo, que fue significativo en el día 2 en las concentraciones de $1x10^{1}$, 1 y $1x10^{-1}$ UFC/g, lo cual sugiere un efecto de temporalidad, que ya fue descrito previamente (Stiles,1996).

El que no se mantenga el efecto inhibitorio de la *Salmonella* durante las tres semanas analizadas, no se debe a una disminución en el contenido de probióticos, pues como se describió en secciones previas, la concentración de éstos se incrementó de 10^{8} a 10^{9} en el transcurso del experimento.

También se observó que la adición de probióticos en el queso puede inhibir el crecimiento de *Salmonella* según la cantidad de patógeno inoculado, ya que se observó una disminución hasta en un 80% de la detección del patógeno, cuando se inoculó con 10^{1} UFC/g en los día 2 y 3 del experimento, mientras que con inóculos de 10^{2} UFC/g la inhibición fue menor ya que se alcanzaron valores máximos de 40%, cuando el inóculo fue con 1 UFC/g. Estos resultados muestran un efecto dependiente de la concentración de inóculo, lo que sugiere que el efecto inhibitorio de los probióticos ocurre solamente a bajas concentraciones del contaminante. Estos resultados son semejantes a los descritos por Salvatierra y col. (2004) al analizar la inhibición de *Staphylococcus aureus* por *Lactobacillus casei* y *L. acidophilus* en yogurt.

Las investigaciones previas han demostrado que los probióticos son capaces de producir sustancias difusibles como bacteriocinas y otros compuestos en

diversos tipos de quesos, sin embargo, hay pocos que estudian el efecto de estas sustancias sobre patógenos inoculados. Eppert y col. (1997) demostraron un efecto inhibitorio de *Brevibacterium linens* sobre *Listeria* spp inoculada en quesos y comprobaron que se debe a la presencia de una bacteriocina, la linocina M1; posiblemente compuestos de este tipo sean los responsables de la acción inhibitoria del crecimiento de *Salmonella* que se reporta en este trabajo ya que las cepas utilizadas demostaron tener un efecto antagónico en pruebas *in vitro*.

CAPITULO 6

CONCLUSIONES

EVALUACIÓN DE PRODUCTOS

- Existe un etiquetado deficiente de los productos con probióticos que actualmente se comercializan en el mercado; en un 40% no se expresan los microorganismos que contienen y en un 60% no indican la cantidad que contienen.
- Los probióticos identificados no coinciden con los declarados en el tipo y número de microorganismos, aunque los encontrados son considerados seguros por la FDA (sustancias GRAS).
- Solo el 30% de los productos contiene valores superiores a los 10^7 UFC/g sugerida para generar un efecto benéfico.
- Los suplementos no cumplen con el etiquetado en el número y tipo de microorganismos.
- La sobrevivencia de los probióticos de las bebidas lácteas y leches en polvo para lactantes superó la fecha de caducidad en las condiciones recomendadas por los fabricantes, en cambio los suplementos no demostraron la capacidad de mantener los microorganismos probióticos viables.
- La calidad microbiológica de alimentos y suplementos con probióticos fue buena, ninguna muestra contenía patógenos, aunque en un producto se encontraron microorganismos coliformes.

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

- Se demostró la actividad antimicrobiana de los microorganismos probióticos mediante la producción de compuestos difusibles en la mayoría de las cepas analizadas.

- Todas las cepas de patógenos estudiadas mostraron algún grado de sensibilidad. Las cepas liofilizadas comerciales mostraron una mejor acción inhibitoria sobre los microorganismos de prueba.
- Un alto porcentaje de bacterias lácticas y probióticas aisladas de productos comerciales, generan sustancias difusibles con capacidad inhibitoria como una ventaja competitiva contra patógenos.

ELABORACIÓN DE QUESOS CON PROBIÓTICOS

- La adición de probióticos no impacta negativamente en las propiedades organolépticas del queso conservando la buena aceptabilidad del mismo.
- No se demostraron estadísticamente efectos sobre la flora microbiana, se observó un efecto protector de los probióticos que prolonga la vida de anaquel del queso tipo panela.
- Se demostró que el queso fresco tipo panela es un vehículo adecuado para transporte de microorganismos probióticos pues permite la sobrevivencia de probióticos en la cantidad necesaria para producir los efectos benéficos a la salud de los consumidores y favorece la multiplicación de los probióticos.
- Estos resultados sugieren un efecto positivo de los probióticos sobre el control de la contaminación de los microorganismos patógenos en alimentos lácteos que podría repercutir en un menor riesgo de ocurrencia de enfermedades gastrointestinales.

INHIBICIÓN DE *Salmonella*

- La mezcla de probióticos tiene un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de *Salmonella* en quesos.
- La inhibición de *Salmonella* es transitoria y dependiente de la concentración de inóculo del patógeno.
- Se sugiere que la inhibición del patógeno se debe a la generación de los compuestos difusibles que generan los probióticos y no al pH del alimento.

CAPÍTULO 7

REFERENCIAS

Abee, T. Klaenhammer, T.R. & Letellier, L. (1994 a) Kinetic studies of lactacin F, a bacteriocin produced by *Lactobacillus johnsonii* that form poration complex in the cytoplasmic membrane. **Applied and Environmental Microbiology**, 60 (3), pp.1006-1013

Abee, T. Rombous, F.M. Hugenholst, J. Guihard, G. & Letellier, L. (1994 b) Mode of action of nisin Z against *Listeria monocytogenes* scott a grow at high and low temperatures. **Applied and Environmental Microbiology**, 60 (6), pp.1962-1968

Adhikari, K. Mustapha, A. Grün, I.U. & Fernando, L. (2000) Viability of microencapsulated bifidobacteria in set yogurt during refrigerated storage. **Journal of Dairy Science,** 83 (9), pp.1946-1951.

Adolfsson, O. Meydani, S.N. & Russel, R.M. (2004) Yogurt and gut function. **American Journal of Clinical Nutrition**, 80 (supplement), pp.245-256.

Alamprese, C. Foschino, R. Rossi, M. Pompei, C. & Savani, L. (2002) Survival of *Lactobacillus johnsonii* La1 and influence of its addition in retail-manufactures ice cream produced with different sugar and fat concentrations. **International Dairy Journal,** 12 (2-3), pp.201-208.

Alander, M. Satokari, R. Korpela, R. Saxelin, M. Vilpponen-Salmela, T. Mattila-Sandholm, T. & Wright, A. (1999) Persistence of colonization of human colonic mucosa by a probiotic strain, *Lactobacillus rhamnosus* GG, after oral consumption. **Applied and Environmental Microbiology,** 65 (1), pp.351-354.

Allison, G.E. Worobo, R.W. Stiles, M.E. & Klaenhammer, T.R. (1995) Heterologous expression of the lactacin F peptides by *Carnobacterium piscicola* LV17. **Applied and Environmental Microbiology,** 61 (4), pp.1371-1377.

Alm, L. (1983) The effect of *Lactobacillus acidophilus* administration upon the survival of *Salmonella* in randomly selected human carriers. **Progress in Food and Nutrition Science**, 7 (3-4), pp.13-17.

Amézquita, A. & Brashears, M.M. (2002) Competitive inhibition of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat meat products by lactic acid bacteria. **Journal of Food Protection**, 65 (2), pp.316-325.

Aranceta, J. Pérez, C. Serra, Ll. (2002) **Disponibilidad y consumo de probióticos en España. En Alimentos Funcionales. Probióticos. [RM Ortega, A Marcos, J Aranceta, JA Mateos, AM Requejo, L Serra]** Cap.3, pp.19-31. Editorial Médica Panamericana.

Arvola, T. Laiho, K. Torkkeli, S. Mykkänen, H. Salminen, S. Maunula, L. & Isolauri, E. (1999) Prophylactic *Lactobacillus GG* reduces antibiotic-associated diarrhea in children UIT respiratory infections: A randomized study. **Pediatrics**, 104 (5), 1-4.

Asahara, T. Shimizu, K. Nomoto, K. Hamabata, T. Ozawa, A. & Takeda, Y. (2004) Probiotic bifidobacteria protect mice from letal infection whit shiga toxin-producing *Escherichia coli* 0157:H7. **Infection and Immunity,** 72 (4), pp.2240-2247.

Baharav, E. Mor, F. Halpern, M. & Weinberger, A. (2004) *Lactobacillus* GG bacteria ameliorate arthritis in lewis rats. **Journal of Nutrition,** 134 (8), pp.1964-1969.

Banasaz, M. Norin, E. Holma, R. & Midvedt, T. (2002) Increased enterocyte production in gnotobiotic rats mono-associated with *Lactobacillus rhamnosus* GG. **Applied and Environmental Microbiology,** 68 (6), pp.3031-3034.

Barefoot, S. Chen, Y. Hughes, T. Bodine, A. Shearer, M. & Hughes, M. (1994) Identification and purification of a protein that induces production of the

Lactobacillus acidophilus bacteriocin lactacin B. **Applied and Environmental Microbiology,** 60 (10), pp.3522-3528.

Barrantes, X. Railey, D. Arias, M.L. & Chaves, C. (2004) Evaluación del efecto de cultivos probióticos adicionados a yogurt comercial, sobre poblaciones conocidas de *Listeria monocytogenes* y *Escherichia coli* 0157:H7. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, 54 (3), pp.293-297.

Benech, R. Kheadr, E. Laridi, R. Lacroix, C. & Fliss, I. (2002) Inhibition of *Listeria innocua* in cheddar cheese by addition of nisin Z in liposomes or by in situ production in mixed culture. **Applied and Environmental Microbiology**, 68 (8) May, pp.3683-3690.

Benkerroum, N. Oubel, H. & Mimoun, L.B. (2002) Behavior of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* in yogurt fermented with a bacteriocin-producing thermophilic starter. **Journal of Food Protection,** 65 (5), pp.799-805.

Bernet, M.F. Brassart, D. Nesser, J.R. & Servin, A.L. (1993) Adhesion of human bifidobacterial strain to cultured human intestinal epithelial cell and inhibition of enteropatogen-cell interactions. **Applied and Environmental Microbiology,** 9 (12), pp.4121-4128.

Berrocal, D. Arias, M.L. Henderson, M. & Wong, E. (2002) Evaluación de la actividad de cultivos probióticos sobre *Listeria monocytogenes* durante la producción y almacenamiento de yogur. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, 52 (4) pp.375-380 .

Bertazzoni, E. Benini, A. Marzotto, M. Sbarbati, A. Ruzzenente, O. Ferrerio, R. Hendriks, H. & Dellaglio, F. (2004) Assessment of novel probiotic *Lactobacillus casei* strains for the production of functional dairy foods. **International Dairy Journal,** 14 (8), pp.723-736.

Bezkorovainy, A. (2001) Probiotics: Determinants of survival and growth in the gut. **American Journal of Clinical Nutrition,** 73 (supplement), pp.399S-405S.

Blanchette, L. Roy D. Belanger, G. & Gauthier, S. F. (1996). Production of cottage cheese using dressing fermented by bifidobacteria. **Journal of Dairy Science**, 7, pp.8-15.

Bouksaim, M. Lacroix, C. Audet, P. & Simard R. (2000) Effects of mixed starter composition on nisin Z production by *Lactococcus lactis* subsp. lactis biovar. diacetylactis UL 719 during production and ripening of gouda cheese. **International Journal of Food Microbiology**, 59 (3) September, pp.141-156.

Boylston, T.D. Vinderola, C.G. Ghoddusi, H.B. & Reinheimer, J.A. (2004) Incorporation of bifidobacteria into cheeses: Challenges and rewards. **International Dairy Journal**, 14 (5), pp.375-387.

Brady, L.J. Gallaher, D.D. & Busta, F.F. (2000) The role of probiotic cultures in the prevention of colon cancer. **Journal of Nutrition,** 130, pp.410S-414S.

Brashears, M.M. & Durre W.A. (1999) Antagonistic action of *Lactobacillus lactis* toward *Salmonella* spp. and *Escherichia coli* 0157:H7 during growth and refrigerated storage. **Journal of Food Protection**, 62 (11), pp.1336-1340.

Brearty, S. Roos, R.P. Fitzgerald, G.F. Collins, J.K. Wallace, J.M. & Stanton, C. (2001) Influence of two commercially available bifidobacteria cultures on cheddar cheese quality. **International Dairy Journal**, 11 (8), pp.599-610.

Bruno, M.E.C. & Montville, T. (1993) Common mechanistic action of bacteriocins from lactic acid bacteria. **Applied and Environmental Microbiology,** 59 (9), pp. 3003-3010.

Buydens, P. & Debeuckelaere, S. (1996) Efficacy of SF 68 in treatment of acute diarrhea. A placebo controlled trial. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, 31 (9), pp.887-891.

Buyong, N. Kok, J. & Luchansky, J. (1998) Use of a genetically enhanced, pediocin-producing starter culture, *Lactococcus lactis* subsp. lactis MM217, to control *Listeria monocytogenes* in cheddar cheese. **Applied and Environmental Microbiology,** 64 (12) September, pp.4842-4845.

Campos, J.A. (2002). Cultivos probióticos y protectores, propiedades funcionales (nutraceúticas) de valor agregado en los derivados lácteos. **Lácteos y Cárnicos Mexicanos,** Jun/Jul, pp.26-37.

Carvalho, A.S. Silva, J. Ho, P. Teixeira, P. Malcata, F.X. & Gibbs, P. (2004) Relevant factors for the preparation of freeze-dried lactic acid bacteria. **International Dairy Journal**, 14 (10), pp.835-847.

Chauviére, G. Coconnier, M.H. Kernéis, S. Fournait, J. & Servin, A.L. (1992 a) Adhesion of human *Lactobacillus acidophilus* strain Ib to human enterocyte-like caco-2 cells. **Journal of General Microbiology,** 138, pp.1689-1696.

Chauviére, G. Coconnier, M.H. Kernéis, S. Darfeuille-Michaud, A. Joly, B. & Servin, A.L. (1992 b) Competitive exclusion of diarrheagenic *Escherichia coli* (ETEC) from human enterocity-like caco-2 cells by heat-killed *Lactobacillus*. **FEMS Microbiology Letters,** 91, pp.213-218.

Chikindas, M.L. García–Garcera, M.J. Driesessen, A.J.M. Ledeboer, A.M. Nissen-Mejer, J. Nes, I.F. Abee, T. Konings, W.N. & Venema, G. (1993) Pediocin PA-1, a bacteriocin from *Pediococcus acidilactici* PAC1.0 forms hydrophilic pores in the cytoplasmic membrane of target cells. **Applied and Environmental Microbiology,** 59 (11), pp.3577-3584.

Coconnier, M. Bernet, M. Kerneis, S. Chauviére, G. Fourniat, J. & Servin, A.L. (1993) Inhibition of adhesion of enteroinvasive pathogens to human intestinal

caco-2 cells by *Lactobacillus acidophilus* strain LB decreases bacterial invasion. **FEMS Microbiology Letters,** 110, pp.299-306

Coconnier, M. Liévin, V. Hemery, E. & Servin, A. (1998) Antagonistic activity against helicobacter infection in vitro and in vivo by the human *Lactobacillus acidophilus* strain LB*.* **Applied and Environmental Microbiology,** 64 (11), pp.4573-4580.

Coconnier, M. Liévin, V. Lorrot, M. & Servin, A. (2000) Antagonistic activity of *Lactobacillus acidophilus LB* against intracellular *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* infecting human enterocyte-like caco-2/TC-7 cells. **Applied and Environmental Microbiology,** 66 (3), pp.1152-1157.

Coeuret, V. Gueguen, M. & Vernoux, J.P. (2004). Numbers and strains of lactobacilli in some probiotic products. **International Journal of Food Microbiology**, 97, pp.147-156.

Corbo, M.R. Albenzio, M. De Angelis, M. Sevi, A. & Gobbetti, M. (2001) Microbiological and biochemical properties of canestrato pugliese hard cheese supplemented with bifidobacteria. **Journal of Dairy Science,** 84 (3), pp.551-561.

Cruchet, S. Obregon, M.C. Salazar, G. Díaz, E. & Gotteland, M. (2003) Effect of the ingestion of a dietary product containing *Lactobacillus johnsonii* La1 on *Helicobacter pylori* colonization in children. **Nutrition**, 19 (9), pp.716-721.

Daigle, A. Roy, D. Bélanger, G. & Vuillemard, J.C. (1999) Production of probiotic cheese (cheddar-like cheese) using enriched cream fermented by *Bifidobacterium infantis.* **Journal of Dairy Science**, 82 (6), pp.1081-1091.

Danielsen, M. & Wind, A. (2003) Susceptibility of *Lactobacillus* spp. to antimicrobial agents. **International Journal of Food Microbiology**, 82 (1) pp.1-11.

Dave, R.I. & Shah, N.P. (1998) Ingredient supplementation effects on viability of probiotic bacteria in yogurth. **Journal of Dairy Science.** 81 (11), pp.2804-2816.

Davidson, R.H. Duncan, S.E. Hackney, C.R. Eigel, W.N. & Boling, J.W. (2000) Probiotic culture survival and implications in fermented frozen yogurt characteristics. **Journal of Dairy Science**, 83 (4), pp.666-673.

D´Souza, A.L. Rajkumar, C. Cooke, J. & Bulpitt, C.J. (2002) Probiotics in prevention of antibiotic associated diarrhoea: meta-analysis. **British Medical Journal**, 83 (4), pp.324-1361.

De Champs, C. Maroncle, N. Balestrino, D. Rich, C. & Forestier, C. (2003) Persistence of colonization of intestinal mucosa by a probiotic strain, *Lactobacillus casei* subsp. rhamnosus Lcr35, after oral consumption. **Journal of Clinical Microbiology,** 41 (3), pp.1270-1273.

De Vrese, M. Stegelmann, A. Richter, B. Fenselau, S. Laue, C. & Schrezenmeir, J. (2001) Probiotics–compensation for lactase insufficiency. **American Journal of Clinical Nutrition,** 73 (supplement), pp.421S-429S.

Delves-Broughton, J. (1990) Nisin and its use as a food preservative. **Food Technology,** 44, pp.100-112.

Delves-Broughton, J. Blackburn, P. Evans, R.J. & Hugenholtz. (1996) Application of the bacteriocin nisin**. Antonie Van Leeuwenhoek,** 69, pp.193-202.

Desmond, C. Stanton, C. Fitzgerald, G.F. Collins, K. & Ross, R.P. (2002) Environmental adaptation of probiotic *Lactobacilli* towards improvement of performance during spray drying. **International Dairy Journal**, 12 (2-3), pp.183-190.

Diplock, A.T. Aggette, P.S. Ashwell, M. Bornet, F. Ferm, E.B. & Robertfroid, M. (1999) Scientific concepts of functional foods in Europe: consensus document. **British Journal of Nutrition**, 81 (51).

Donglai, M. Forsythe, P. & Bienenstock, J. (2004) Live *Lactobacillus reuteri* is essential for the inhibitory effect on tumor necrosis factor alpha-induced interleukin-8 expression. **Infection and Immunity,** 72 (9), pp.308-314.

Dubey, U.K. & Mistry, V.V. (1996). Growth characteristics of bifidobacteria in infant formulas. **Journal Dairy Science**, 79 (7), pp.1146-1155.

Duffy L.C. (2000) Interactions mediating bacterial translocation in the immature intestine. **American Society for Nutritional Sciences**, Supplement, pp.432S-436S.

Dunne, C. O'Mahony, L. Murphy, L. Thornton, G. Morrissey, D. O' Halloran, S. Feeney, M. Flynn, S. Fitzgerald, G. Daly, C. Kiely, B. O'Sullivan, G.C. Shanahan, F. & Collins, J.K. (2001) In vitro selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with in vivo findings. **American Journal of Clinical Nutrition,** 73 (supplement), pp.386S-392S.

Edwards K, Johnstone C, & Thompson C. (1991) A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. **Nucleic Acids Research** 19 (6):1349.

Eijsink, V. Skeie, M. Middelhove, H. Brurberg, M. Nes, I.F. (1998) Comparative studies of class IIa bacteriocins of lactic acid bacteria. **Applied and Environmental Microbiology,** 64 (9), pp.3275-3281.

El-Gazzar, F.E. & Marth, E.H. (1992). *Salmonellae, Salmonellosis*, and dairy foods: a review. **Journal Dairy Science**, 75, pp.2327-2343.

Elliott, N.S. Buret, A. McKnight, W. Miller, J.S.M. & Wallace, J.L. (1998) Bacteria rapidly colonize and modulate healing of gastric ulcers in rats **Gastrointestinal and Liver Physiology**, 275 (3), pp.G425-G432.

Elliot, E. & Teversham, K. (2004). An evaluation of nine probiotics available in South Africa, August 2003. **South African Medicine Journal**, 94 (2), pp.121-124.

Ennahar, S. Aoude-Werner, D. Sorokine, O. Van Dorsselaer, A. Bringel, F. Hubert, J. & Hasselmann C. (1996) Production of pediocin AcH by *Lactobacillus plantarum* WHE 92 isolated from cheese. **Applied and Environmental Microbiology,** 62 (12), pp.4381-4387.

Ennahar, S. Assobhei O. & Hasselmann C. (1998) Inhibition of Listeria monocytogenes in a smear-surface soft cheese by *lactobacillus plantarum* WHE 92, a pediocin AcH producer. **Journal of Food Protection**, 61 (2), pp.186-191.

Eppert, I. Valdés, N. Götz, H. Busse, M. & Scherer, S. (1997) Growth reduction of *Listeria* spp. caused by undefined industrial red smear cheese cultures and bacteriocin-producing brevibacterium linens as evaluated in situ on soft cheese. **Applied and Environmental Microbiology**, 63 (12), pp.4812-4817.

Farnworth, E.R. (2001) **Probiotics and prebiotics. En Handbook of Nutraceutical and functional foods [RE Wildman]** Cap. 25: 407 – 422. Editorial CRC Press.

Fasoli, S. Marzotto, M. Rizzotti, L. Rossi, F. Dellaglio, F. & Torriani, S. (2003). Bacterial composition of commercial probiotic products as evaluated by PCR-DGGE analysis. **International Journal of Food Microbiology**, 82, pp.59-70.

Fimland, G. Blingsmo, O.R. Sletten, K. Jung, G. Nes, I.F. & Nissen-Meyer, J. (1996) New biologically active hybrid bacteriocins constructed by combining regions from various pediocin-like bacteriocins: the C-terminal region is

important for determining specificity. **Applied and Environmental Microbiology**, 62 (9), pp.3313-3318.

Food and Agriculture Organization of the United Nation's and World Health Organization. (2002). Posting date. Guidelines for the evaluation of probiotics in food. ***Food and Agriculture Organization of the United Nation's and World Health Organization Working Group Report.***

Gagnon, M. Kheadr, E.E. Le Blay, G. & Fliss, I. (2004) In vitro inhibition of *Escherichia coli* 0157:H7 by bifidobacterial strains of human origin. **International Journal of Food Microbiology.** 92 (1), pp.69-78.

García-Garibay, M. (2000) Leches fermentadas como vehículos de probióticos. **Archivos de Investigación Pediátrica**. Suplemento especial: Los probióticos en la nutrición.

Gardiner, G. Ross, R. Collins, J.K. Fitzgerald, G. & Stanton, C. (1998). Development of a probiotic cheddar cheese containing human-derived *Lactobacillus paracasei* strains. **Applied and Environmental Microbiology**, 64 (6) pp.2192-2199.

Gardiner, G. Stanton, C. Lynch, P.B. Collins, J.K. Fitzgerald, G. & Ross, R.P. (1999) Evaluation of cheddar cheese as a food carrier for delivery of a probiotic strain to the gastrointestinal tract**. Journal of Dairy Science,** 82 (7), pp.1379-1387.

Gardiner, G. Ross, R. Collins, J.K. Fitzgerald, G. & Stanton, C. (2000) Comparative survival rates of human-derived probiotic *Lactobacillus paracasei* and *l. salivarius* strains during heat treatment and spray drying. **Applied and Environmental Microbiology,** 66 (6), pp.2605-2612.

Gardiner, G. Bouchier, P. O'Sullivan, E. Kelly J. Collins, J.K. Fitzgerald, G. Ross, R. & Stanton, C. (2002) A spray-dried culture for probiotic cheddar cheese manufacture. **International Dairy Journal**, 12 (9), pp.749-756.

Garduño, A. (1999) Nuevos Enfoques en Aditivos para la Fabricación de Productos Cárnicos. **Lácteos y Cárnicos Mexicanos**, Abril-Mayo.

Gibson, G.R. & Fuller, R. (2000) Aspects of in vitro and in vivo research approaches directed toward identifying probiotics and prebiotics for human use. **American Society for Nutritional Sciences**, supplement, pp.391S-395S

Gilliland, S.E. Nelson, C.R. & Maxwell, C. (1985) Assimilation of cholesterol by *Lactobacillus acidophilus.* **Applied and Environmental Microbiology**, 49 (2), pp.377-381.

Ghosh, S. van Heel, D. & Playford, R.J. (2004) Probiotics in inflammatory bowel disease: is it all gut flora modulation? **Gut,** 53, pp.620-622.

Gómez Zavaglia, A. Kociubinski, G. Pérez, P. & De Antoni, G. (1998) Isolation and characterization of *Bifidobacterium s*trains for probiotic formulation. **Journal of Food Protection**, 61 (7), pp.865-873.

González-Martínez, B.E. Gómez, M. Jiménez, Z. (2003) Bacteriocinas de probióticos. **Revista de Salud Pública y Nutrición** [Internet], 4 (2). Desde http://www.uanl.mx/publicaciones/respyn/index.html [Acceso Octubre 24, 2003]

Granato, D. Perotti, F. Masserey, I. Rouvet, M. Golliard, M. Servin, A. & Brassart, D. (1999) Cell surface-associated lipoteichoic acid acts as an adhesion factor for attachment of *Lactobacillus johnsonii* La1 to human enterocyte-like caco-2 cells**. Applied and Environmental Microbiology,** 65 (3), pp.1071-1077.

Greene, J.D. & Klaenhammer, T.R. (1994) Factors involved in adherence of *Lactobacilli* to human caco-2 cells. **Applied and Environmental Microbiology,** 60 (12), pp.4487-4494.

Greenwald P. Clifford, C.K. & Milner, J.A. (2001) Diet and cancer prevention. **Europa Journal Cancer.** 37, pp.948-965.

Guadalajara JF. (1996) Cardiología. Programa de Actualización para Médicos Generales. **Academia Nacional de Medicina Intersistemas, S.A. de C.V.**

Guandalini, S. Pensabene, L. Zikri, M.A. Dias, J.A. Casali, L.G. Hoekstra, H. Kolacek, S. Massar, K. Micetic-Turk, D. Papadopoulou, A. de Sousa, J.S. Sandhu, B. Szajewska, H. & Weizman, Z. (2000) *Lactobacillus* GG administered in oral rehydration solution to children with acute diarrea: a multicenter Europan trial. **Journal of Pediatrics Gastroenterology and Nutrition**, 30 (1), pp.54-60.

Guarner, F. (2000 a). Probióticos y flora bacteriana. **Yogurt vivo. Alimento fresco y activo,** 5, pp.10-12.

Guarner, F. (2000 b) El colon como órgano: habitat de la flora bacteriana **Alimentación Nutrición y Salud,** 7 (4), pp.99-106.

Guarner, F. & Malagelada, J.R. (2002) **Ecología Intestinal: Modulación mediante probióticos. En Alimentos Funcionales. Probióticos.[RM Ortega, A Marcos, J Aranceta, JA Mateos, AM Requejo, L Serra]** Cap 4, Editorial Médica Panamericana.

Gutierrez-Cogco, L. Montiel-Vázquez, E. Aguilera-Pérez, P. & González-Andrade, M. (2000). Serotopos de *Salmonella* identificados en los servicios de salud de México. **Salud Pública de México**, 42 (6), pp.490-495.

Hamilton-Miller, J.M.T. Shah, S. & Winkler, J.T. (1999) Public health issues arising form microbiological and labelling quality of foods and supplements containing probiotic microorganisms. **Public Health Nutrition**, 2 (2), pp.223-229.

Hart, A.L. Lammers, K. Brigidi, P. Vitali, P. Rizzello, F. Gionchetti, P. Campieri, M. Kamm, M.A. Knight, S.C. Stagg, A.J. (2004) Modulation of human dendritic cell phenotype and function by probiotic bacteria. **Gut,** 53, pp.1602-1609.

Hatakka, K. Savilahti, E. Pönkä, A. Meurman, J.H. Poussa, T. Näse, L. Saxelin, M. & Korpela, R. (2001) Effect of long term consumption of probiotic milk on infections in children attending day care centres: double blind, randomised trial. **British Medical Journal**, 322, pp.1327-1329.

Heller, K.J. (2001) Probiotic bacteria in fermented foods: product characteristics and starter organisms. **American Journal of Clinical Nutrition,** 73 (supplement), pp.374S-379S.

Hernández, M. (2002). Supervivencia de las bacterias ácido-lácticas en los productos lácteos. **Yogurt vivo. Alimento fresco y activo**, 11, pp.8-9.

Heyman, M. (2000) Effect of lactic acid bacteria on diarrheal diseases. **Journal of the American College of Nutrition**, 19 (2), pp.137S-146S.

Hilton, E. Kolakowsky, P. Singer, C. & Smith, M. (1997) Efficacy of *Lactobacillus* GG as a diarrheal preventive in travelers. **Journal of Travel Medicine**, 4 (1), pp.41-43.

Holzapfel, W.H. Haberes, P. Geisen, R Björkroth, J. & Schillinger, U. (2001) Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. **American Journal of Clinical Nutrition,** 73 (supplement), pp.365S-373S.

Hopkins, M.J. & Macfarlane, G.T. (2003) Nondigestible oligosaccharides enhance bacterial colonization resistance against C*lostridium difficile* in vitro. **Applied and Environmental Microbiology**, 69 (4), pp.1920-1927.

Hori, T. Kiyoshima, J. Shida, K. & Yasui, H. (2001) Effect of intrasanal administration of *Lactobacillus casei* shirota on influenza virus infection of upper respiratory tract in mice. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology.** 8 (3), pp.593-597.

Hori, T. Kiyoshima, J. Shida, K. & Yasui, H. (2002) Augmentation of cellular immunity and reduction of influenza virus titer in aged mice fed *Lactobacillus casei* strain shirota. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, 9 (1) pp.105-108.

Horn, N. Martínez, M. Martínez, J. Hernández, P. Gasson, M. Rodríguez, J. & Dodd, H. (1999) Enhanced production of nisin and pedioncin PA-1 by *Lactcoccus lactis*. **Applied and Environmental Microbiology**, 65 (10), pp.4443-4450.

Hudault, S. Liévin, V. Bernet-Camard, M. & Servin, A.L. (1997) Antagonistic activity exerted in vitro and in vivo by *Lactobacillus casei* (strain GG) against *Salmonella typhimurium* C5 infection. **Applied and Environmental Microbiology**, 63 (2), pp.513-518.

Huff, B.A. (2004). Caveat emptor. "Probiotics" might not be what they seem. **Canadian Family Physician**, 50, pp.583-587.

Hughes, D.B. & Hoover, D.G. (1991) Bifidobacteria-their potencial for use in American dairy products. Food Technology, 45, pp.74-83.

Ishibashi, N. & Yamazaki, S. (2001) Probiotics and safety. **American Journal of Clinical Nutrition,** 73 (supplement), pp.465S-470S.

Isolauri, E. Juntunen, M. Rautanen, T. Sillanaukee, P. & Koivula, T. (1991) A human *Lactobacillus strain (Lactobacillus casei sp strain* GG) promotes recovery from acute diarrhea in children. **Pediatrics**, 88 (1), pp.90-97.

Isolauri, E. (2001) Probiotics in human disease. **American Journal of Clinical Nutrition,** 73 (supplement) pp.1142S-1146S.

Isolauri, E. Kirjavainen, P.V. & Salminen, S. Probiotics: a role in the treatment of intestinal infection and inflammation. (2002) **Gut,** 50, pp.54-59.

Isolauri, E. (2003) Probiotics for Infections diarrhoea. **Gut**, 52, pp.436-437.

Jacobsen, C.N. Nielsen, V.R. Hayford, A.E. Moller, P.L. Michaelsen, K.F. Perregaard, A. Sandström, B. Tvede, M. & Jakobsen, M. (1999) Screening of probiotic activities of forty-seven strains of *Lactobacillus* spp. by in vitro techniques and evaluation of the colonization ability of five selected strains in humans. **Applied and Environmental Microbiology**, 65 (11), pp.4949-4956.

Jin, L.Z. Marquardt, R.R. & Zhao, X. (2000) A strain of *Enterococcus faecium* (18C23) inhibits adhesion of enterotoxigenic *Escherichia coli* K88 to porcine small intestine mucus. **Applied and Environmental Microbiology**, 66 (10), pp.4200-4204.

Jijon, H. Backer, J. Diaz, H. Yeung, H. Thiel, D. McKaigney, C. De Simone, C. Madsen, K. DNA from probiotic bacteria modulates murine and human epithelial and immune function. (2004) **Gastoenterology,** 126, pp.1358-1373.

Johansson, M.L. Molin, G. Jeppsson, B. Nobaek, S. Ahrné, S. & Bengmark, S. (1993) Administration of different *Lactobacillus* strains in fermented oatmeal soup: in vivo colonization of human intestinal mucosa and effect on the indigenous flora. **Applied and Environmental Microbiology**, 59 (1), pp.15-20.

Johnsen, L. Fimland, G. Eijsink, V. & Nissen-Meyer, J. (2000) Engineering increased stability in the antimicrobial peptide pediocin PA-1. **Applied and Environmental Microbiology**, 66 (11), pp.4798-4802.

Joosten, H. & Nuñez, M. (1996) Prevention of histamine formation in cheese by bacteriocin-producing lactic acid bacteria. **Applied and Environmental Microbiology,** 62 (4), pp.1178-1181.

Juntunen, M. Kirjavainen, P.V. Ouwehand, A.C. Salminen, S.J. & Isolauri, E. (2001) Adherence of probiotic bacteria to human intestinal mucus in healthy infants and during rotavirus infection. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, 8 (2), pp.293-296.

Kalliomaki, M. Salminen, S. Arvilommi, H. Kero, P. Koshinen, P. & Isola, E. (2001) Probiotics in primary prevention of atopic disease: a randomized placebo. **Lancet,** 357 (9262), pp.1076-1079.

Kasimoglu, A. Göncüoglu, M & Akgün, S. (2004) Probiotic white cheese with *Lactobacillus acidophilus***. International Dairy Journal**, 14 (12), pp.1067-1073.

Khalil, A.H. & Mansour, E.H. (1998) Alginate encapsulated bifidobacteria survival in mayonnaise. **Journal of Food Science**, 63 (4), pp.702- 705.

Kim, S.H. Yang, S.J. Koo, H.C. Bae, W.K. Kim, J.Y. Park, J.H. Baek, Y.J. & Park, Y.H. (2001) Inhibitory activity of *Bifidobacterium* longum HY80001 against vero cytotoxin of *Escherichia coli* O157:H7. **Journal of Food Protection**, 64 (11), pp.1667-1673.

Kim, T. Hur, J. Yu, M. Cheigh, C. Kim, K. Hwang, J. & Pyun, Y. (2003) Antagonism of *Helicobacter pylori* by bacteriocins of lactic acid bacteria. **Journal of Food Protection**, 66 (1), pp.3-12.

Kimoto, H. Kurisaki, J. Tsuji, N.M. Ohmomo, S. & Okamoto, T. (1999) *Lactococci* as probiotic strains: adhesion to human enterocyte-like Caco-2 cells and tolerance to low pH and bile. **Letters in Applied Microbiology,** 29, pp.313-316.

Kimoto, H. Ohmomo, S. & Okamoto, T. (2002) Cholesterol Removal from Media by *Lactococci.* **Journal of Dairy Science**, 85, pp.3182-3188.

Kimura, K. McCartney, A. McConnell, M. & Tannock, G. (1997) Analysis of fecal populations of bifidobacteria and *lactobacilli* and investigation of the immunological responses of their human hosts to the predominant strains. **Applied and Environmental Microbiology,** 63 (9), pp.3394-3398.

Knorr, D. (1998). Technology aspects related to microorganisms in functional foods. **Trends Food Science Technology**, 9, pp.295-306.

Kirjavainen, P.V. Arvola, T. Salminen, S.J. & Isolauri, E. (2002) Aberrant composition of gut microbiota of allergic infants: a target of bifidobacterial therapy at weaning. **Gut**, 51, pp.51-55.

Klaenhammer, T.R. (1993) Genetics of bacteriocin produced by lactic acid bacteria **FEMS Microbiology Reviews**, 12, pp.39-86.

Klaenhammer, T.R. (2000) Probiotic bacteria: Today and tomorrow. **Journal of Nutrition**, 130, pp.415S-416S.

Klaver, F.A. & van der Meer, R. (1993) The assumed assimilation of cholesterol by *Lactobacilli* and *Bifidobacterium bifidum* is due to their bile salt-deconjugating activity. **Applied and Environmental Microbiology**, 59 (4), pp.1120-1124.

Klein, G. Pack, A. Bonaparte, C. & Reuter, G. (1998). Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, 41 (2), pp.103-125.

Kok, J. Holo, H. van Belkum, Mj. Haandrikman, A.J. & Nes, I.F. (1993) No nisin bacteriocins in lactococci: biochemistry, genetics and mode of action. **En Bacteriocin of lactic acid bacteria (D Hoover, L Steevenson) Academic Press, New York**, pp.121-150.

Kociubinski, G.L. Pérez, P.P. Añón, M.C. & De Antoni, G.L. (1996) A method of screening for highly inhibitory lactic acid bacteria. **Journal of Food Protection**, 59 (7), pp.739-745.

Lahtinen, S.J. Gueimonde, M. Ouwehand, A.C. Reinikainen, J.P. & Salminen, S.J. (2005). Probiotic bacteria may become dormant during storage. **Applied and Environmental Microbiology**, 71 (3), pp.1662-1663.

Lee, Y. Puong, K. Ouwehand, A.C. & Salminen, S. (2003) Displacement of bacterial pathogens from mucus and Caco-2 cell surface by *Lactobacilli*. **Journal of Medical Microbiology**, 52, pp.925-930.

Liévin, V. Peiffer, I. Hudault, S. Rochat, F. Brassart, D. Neeser, J-R. & Servin, A.L. (2000) *Bifidobacterium* strains from resident infant human gastrointestinal miclofora exert antimicrobial activity. **Gut**, 47, pp.646-652.

Liévin-Le, V. Amsellem, R. Servin, A.L. & Coconnier, M.H. (2002) *Lactobacillus acidophilus* (strain LB) from the resident adult human gastrointestinal microflora exerts activity against brush border damage promoted by a diarrhoeagenic *Escherichia coli* in human enterocyte-like cells. **Gut**, 50, pp.803-811.

Loessner, M. Guenther, S. Steffan, S. & Scherer, S. (2003) A pediocin-producing *Lactobacillus plantarum* strain inhibits *Lysteria monocytogenes* in a multispecies cheese surface microbial ripening consortium. **Applied and Environmental Microbiology,** 69 (3), pp.1854-1857.

Lopez, M.C. Medina, L.M. & Jordano, R. (1998) Survival of lactic acid bacteria in commercial frozen yogurt. **Journal Food Science**, 63 (4), pp.706- 708.

Lourens-Hattingh, A. & Viljoen, B.C. (2001) Yogurt as probiotic carrier food. **International Dairy Journal**, 11 (1-2), pp.1-17.

Lu, L. & Walker, A. (2001) Pathologic and physiologic interactions of bacteria with gastrointestinal epithelium. **American Journal of Clinical Nutrition,** 73 (supplement), pp.1124S-1130S.

Ma, D. Forsythe, P. & Bienenstock, J. (2004) Live *Lactobacillus reuteri* is essential for the inhibitory effect on tumor necrosis factor alpha-induced interleukin-8 expression. **Infection and Immunity**, 72 (9), pp.5308-5314.

Macedo, R.F. Freitas, R.J. Pandey, A. & Soccol, C.R. (1999) Production and shelf-life studies of low cost beverage with soymilk, buffalo cheese whey and

cow milk fermented by mixed cultures of *Lactobacillus casei* ssp. shirota and *Bifidobacterium adolescentis*. **Journal of Basic Microbiology**, 39 (4), pp.243-251.

Macedo, M.G. (2002) El yogur: un alimento funcional. **Nutrición Clínica**, 5 (3), pp.172-181.

Mack, D. Michail, S. Wei, S. McDougall, L. & Hollingsworth, M. (1999) Probiotics inhibit enteropathogenic *E. coli* adherence in vitro by introducing intestinal mucin gene expression. **American Journal of Physiology Gastrointestinal**, 276 (4), pp.G941-G950.

Mack, D. Ahrne, S. Hyde, L. Wei, S. & Hollingsworth, M. (2003) Extracellular MUC3 mucin secretion follows adherence of *Lactobacillus* strains to intestinal epithelial cells in vitro. **Gut,** 52, pp.827-833.

Mackie, R.I. Sghir, A. & Gaskins, H.R. (1999) Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract. **American Journal of Clinical Nutrition,** 69 (supplement), pp.1035S-1045S.

Madsen, K. Cornish, A. Soper, P. McKaigney, C. Jijon, H. Yachimec, C. Doyle, J. Jewell, L. & De Simone, C. (2001) Probiotic bacteria enhance murine and human intestinal epithelial barrier function. **Gastroenterology**, 121 (3), pp.580-591.

Marteau, P. Vrese, M. Cellier, C.J. & Schrezenmeir, J. (2001) Protection from gastrointestinal diseases with the use of probiotics **American Journal of Clinical Nutrition,** 73 (supplement), pp.430-436.

Mateos, J.A. (2002) Aspectos Básicos de la Tecnología de las Leches Fermentadas**. En Alimentos Funcionales. Probióticos. [Ortega RM, A Marcos, J Aranceta, JA Mateos, AM Requejo, L. Serra.]** Cap 6, Editorial Médica Panamericana.

Mauriello, G. Aponte, M. Andolfi, R. Moschetti, G. & Villani, F. (1999) Spray-Drying of bacteriocin-producing lactic acid bacteria. **Journal of Food Protection**, 62 (7), pp.773-777.

Maoz, A. Mayr, R. & Scherer, S. (2003) Temporal Stability and Biodiversity of Two Complex Antilisterial Cheese-Ripening Microbial Consortia. **Applied and Environmental Microbiology,** 69 (7), pp.4012-4018.

Mata, V.L. (2003) Implementación de la PCR para la detección de bacterias patógenas de importancia en carne de res, aves y derivados. **Tesis de maestro en Ciencias con especialidad en Microbiología**, Universidad Autónoma de Nuevo León.

Mayo, B. & Delgado, S. (2003) Probióticos y Salud. **Alimentación, Nutrición y Salud,** 10 (3), pp.61-70.

Ménard, S. Candalh, C. Bambou, J.C. Terpend, K. Cerf-Bensussan, N. & Heyman, M. (2004) Lactic acid bacteria secrete metabolites retaining anti-inflammatory properties after intestinal transport. **Gut,** 53, pp.821-828.

Metges, C. El-Khoury, A. Hnneman, L. Petzke, K. Grant, K.I. Bedri, S. Pereira, P. Ajami, A.F. Fuller, M. & Young, V. (1999) Availability of intestinal microbial lysine for whole body lysine homeostasis in human subjects. **Endocrinology and Metabolism**, 277 (4), pp.E597-E607.

Metges, C. (2000) Contribution of microbial amino acids to amino acid homeostasis of the host. **Journal of Nutrition**, 130, pp.1857S -1864S.

Meydani, N.S. & Ha, W.K. (2000) Immunologic effects of yogurt. **American Journal of Clinical Nutrition**, 71 (4), pp.861-872.

Molin, G. (2001) Probiotics in foods not containing milk or milk constituents, with special reference to *Lactobacillus plantarum* 299v. **American Journal of Clinical Nutrition**, 73 (2), pp.380 - 385.

Moll, G.N. Akker, E.V.D. Hauge, H.H. Nissen-Meyer, J. Nes, I.F. Konings, W.N. & Driessen, A.J. (1999) Complementary and overlapping selectivity of the two-peptide bacteriocins plantaricin EF and JK. **Journal of Bacteriology**, 181 (16), pp.4848-4852.

Montville, T.J. & Chen, Y. (1998) Mechanistic action of pediocin and nisin: recent progress and unresolved questions. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 50, pp.511-519.

Moore, W. & Moore, L. (1995) Intestinal flora of populations that have a high risk of colon cancer. **Applied and Environmental Microbiology**, 61 (9), pp.3202-3207.

Mulet-Powell, N. Lacoste-Armynot, A.M. Viñas, M. & Simeon de Buochberg, M. (1998) Interactions between pairs of bacteriocins from lactic bacteria. **Journal of Food Protection**, 61 (9), pp.1210-1212.

Nes, I.F. Diep, D.B. Havarstein, L.S. Brurberg, Mi. Eijsink, V. & Holo, H. (1996) Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. **Antonie Van Leeuwenhoek,** 70 (2), pp.113-128.

NOM 092-SSA1 (1994) Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa. Diario oficial de la federación.

NOM 111-SSA1 (1994) Método para la cuenta de mohos y levaduras en alimentos. Diario oficial de la federación.

NOM 112-SSA1 (1994) Determinación de bacterias coliformes. Técnica de número más probable. Diario oficial de la federación.

NOM 113-SSA1 (1994) Método para la cuenta de microorganismos coliformes totales en placa. Diario oficial de la federación.

NOM 114-SSA1 (1994) Método para la determinación de *Salmonella* en

alimentos. Diario oficial de la federación.

NOM-115-SSA1-(1994) Norma oficial mexicana para la determinación de *Staphilococcus aureus* en alimentos. Diario oficial de la federación.

NOM 121-SSA-(1994) Quesos frescos madurados y procesados. Especificaciones Sanitarias. Diario oficial de la federación.

NOM 131-SSA1 (1995) Bienes y servicios. Alimentos para lactantes y niños de corta edad. Diario oficial de la federación.

NOM 143-SSA-(1996) Método de prueba microbiológica para alimentos. Determinación de *Listeria monocytogenes*. Diario Oficial de la Federación.

NOM-000-SSA1-(1996) Determinación de cuenta de organismos coliformes fecales por el número más probable (presuntiva de *E.coli*) en alimentos. Diario Oficial de la Federación.

NOM 185-SSA1 (2002) Productos y Servicios. Mantequilla, crema, productos lácteos condensado azucarado, Productos lácteos fermentados y acidificados, dulces a base de leche. Diario oficial de la federación.

Ogawa, M. Shimizu, K. Nomoto, K. Takahashi, M. Watanuki, M. Tanaka T. Hamabata, T. Yamasaki, S. & Takeda, Y. (2001) Protective effect of *Lactobacillus casei* strain *shirota* on shiga toxin producing *Escherichia coli* O157:H7 infection in infants rabbits. **Infection and Immunity**, 69 (2), pp.1101-1108.

Oksanen, P.J. Salminen, S. Saxelin, M. Hamalainen, P. Ihantola-Vormisto, A. Muurasniemi-Isoviita, L. Nikkari, S. Oksanen, T. Porsti, I. & Salminen, E. (1990) Prevention of travelers diarrhoea by Lactobacillus GG. **Annals of Medicine**, 22 (1), pp.53-56.

Ostlie, H.M. Helland, M.H. & Narvhus, J.A. (2003) Growth and metabolism of

selected strains of probiotic bacteria in milk. **International Journal of Food Microbiology**, 87 (1-2), pp.17-27.

Ouwehand, A.C. & Conway, P.L. (1996 a) Specificity of spent culture fluids of *Lactobacillus* SPP. to inhibit adhesion of enteropathogenic fimbriated *Escherichia coli* cells. **Microbial Ecology in Health and Disease**, 9, pp.239-346.

Ouwehand, A.C. & Conway, P.L. (1996 b) Purification and characterization of a component produced by *Lactobacillus fermentum* that inhibits the adhesion of K88 expressing *Escherichia coli* to porcine ileal mucus. **Journal Applied Bacteriology**, 80, pp.311-318.

Ouwehand, A.C. Salminen, S. Tölkkö, S. Roberts, P.J. Ovaska, J. & Salminen, E. (2002) Resected human colonic tissue: new model for characterizing adhesion of lactic acid bacteria. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, 9 (1), pp.184-186.

Ouwehand, A.C. Salminen, S. & Isolauri, E. (2002). Probiotics: an overview of beneficial effects. **Antonie Van Leeuwenhoek**, 82, pp.279-89.

Ouwehand, A.C. Salminen, S. Roberts, P.J. Ovaska, J. & Salminen, E. (2003) Disease-dependent adhesion of lactic acid bacteria to the human intestinal mucosa. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, 10 (4), pp.643-646.

Pavan, S. Desreumaux, P. & Mercenier, A. (2003) Use of mouse models to evaluate the persistence, safety, and immune modulation capacities of lactic acid bacteria. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, 10 (4) July, pp.696-701.

Pedrero, D.L. & Pangbron, R.M. (1989) **Evaluación sensorial de los alimentos. Métodos analíticos**. Editorial Alambra Mexicana S. A. México.

Peraza, C. (2001). Los quesos artesanales en México. **Lácteos y cárnicos mexicanos**. 15, pp.48-54.

Perdigon, G. Vintiñi, E. Alvarez, S. Medina, M. & Medici, M. (1999) Study of the possible mechanisms involved in the mucosal immune system activation by lactic acid bacteria. **Journal of Dairy Science,** 82, pp.1108-1114.

Pereira, D.I. & Gibson, G.R. (2002 a) Cholesterol assimilation by lactic acid bacteria and bifidobacteria isolated form the human gut. **Applied and Environmental Microbiology**, 68 (9), pp.4689-4693.

Pereira, D.I. & Gibson, G.R. (2002 b) Effects of consumption of probiotics and prebiotics on serum lipid levels in humans. **Critical reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, 37 (4), pp.259-281.

Pereira, D.I. McCartney, A.L. & Gibson, G.R. (2003) An in vitro study of the probiotic potential of a bile-salt-hydrolyzing *Lactobacillus fermentum* strain, and determination of its cholesterol-lowering properties. **Applied and Environmental Microbiology**, 69 (8), pp.4743-4752.

Pérez, P.F. Minnaard, J. Rouvet, M. Knabenhans, C. Brassart, D. Antoni, G.L. & Schiffrin, E.J. (2001) Inhibition of giardia intestinalis by extracellular factors form *Lactobacilli*: an in vitro study. **Applied and Environmental Microbiology**, 67 (11), pp.5037-5042.

Rahn, K. De Grandis, S.A. Clarke, R.C. McEwen, S.A. Galán, J.E. Ginocchio, C. Curtis III, R. & Gyles, C.L. (1992) **Amlification of an *inv*A gene secuence of *Salmonella typhimurium* by polymerase chain reaction as specific method of detection of *Salmonella.*** Moll. Cell. Probes. 6:271-279.

Raza, S. Graham, S.M. Allen, S.J. Sultana, S. Cuevas, L. & Hart, C.A. (1995) Lactobacillus GG promotes recovery from acute nonbloody diarrhea in Pakistan. **Pediatric Infectious Disease Journal**, 14 (2), pp.107-111.

Reddy, B.S. (1999) Possible mechanisms by which pro-and probiotics influence colon carcinogenesis and tumor growth. **Journal of Nutrition**, 129 (supplement), pp.1478S - 1482S.

Reid, G. (1999) The scientific basis for probiotic strains of *Lactobacillus*. **Applied and Environmental Microbiology**, 65 (9), pp.3763-3766.

Reid, G. Jass, J. Sebulsky, M.T. & McCormick, J.K. (2003) Potential uses of probiotic in clinical practice. **Clinical Microbiology Reviews**, 16 (4), pp.658-672.

Resta- Lenert, S. & Barrett, K.E. (2003) Live probiotics protect intestinal epithelial cells from the effects of infection whit enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC). **Gut,** 52, pp.988-997.

Revista del Consumidor, (2004) Bebidas Lácteas Fermentadas**, Procuraduría Federal del Consumidor,** p.42-44.

Richardson, D. (1996) Probiotics and product innovation. **Nutrition & Food Science**, 4, pp.27-33.

Roberfroid, M.B. (2000) Prebiotics and probiotics: are they functional foods?. **American Journal of Clinical Nutrition**, 71 (6), pp.1682 S-1687S.

Rogelj, I. Matijasic, B.B. Majhenic, A.C. Stojkovic, S. (2002) The survival and persistence of *Lactobacillus acidophilus* LF221 in different ecosystems. **International Journal of Food Microbiology**, 76 (1-2), pp.83-91.

Rolfe, R.D. (2000) The Role of Probiotic Cultures in the Control of Gastrointestinal Health. **Journal of Nutrition**, 130 (supplement), pp.396S-402S.

Roos, N. & Katan, M. (2000) Effects of probiotic bacteria on diarrhoea, lipid metabolism, and carcinogenesis: a review of papers, published between 1988 and 1998. **American Journal of Clinical Nutrition**, 71 (2), pp.405-411.

Ryan, M. Rea, M. Hill, C. & Ross, R. (1996) An application in cheddar cheese manufacture for a strain of *Lactococcus lactis* producing a novel broad-spectrum bacteriocin, lacticin 3147. **Applied and Environmental Microbiology**, 62 (2), pp.612-619.

Ryan, M. Ross, R. & Hill, C. (2001) Strategy for manipulation of cheese flora using combinations of lacticin 3147 producing and resistant cultures. **Applied and Environmental Microbiology**, 69 (6), pp.2699-2704.

Saad, S.M.I. Vanzin, C. Oliveira, M.N. & Franco, B.D.G.M. (2001) Influence of lactic acid bacteria on survival of *Escherichia coli* O157:H7 in inoculated minas cheese during storage at 8.5°C. **Journal of Food Protection**, 64 (8), pp.1151-1155.

Saavedra, J.M. (2001) Clinical applications of probiotic agents. **American Journal of Clinical Nutrition**, 73 (supplement), pp.1147-1151.

Saavedra, J.M. Abi-Hanna, A. Moore, N. & Yolken, R.H. (2004) Long-term consumption of infant formulas containing live probiotic bacteria: tolerance and safety. **American Journal of Clinical Nutrition**, 79, pp.261-267.

Sablon, E. Contreras, B. & Vandamme, E. (2000) Antimicrobial peptides of Lactic Acid Bacteria: Mode of Action, Genetic and Biosynthesis. **In Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology. [Th. Scheper] Springer –Verlag.**

Sakamoto, I. Igarashi, M. Kimura, K. Takagi, A. Miwa, T. & Koga, Y. (2001) Suppressive effect of *Lactobacillus gasseri* OLL 2716(LG21) on *Helicobacter pylori* infections in humans. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 47, pp.709-710.

Salminen, S. Isolauri, E. & Salminen, E. (1996). Clinical uses of probiotics for stabilizing the gut mucosal barrier: successful strains and future challenges. **Antonie Van Leeuwenhoek**, 70, pp.347-58.

Salminen, S. Bouley, C. Boutron-Ruault, M.C. Cummings, J.H. Franck, A. & Gibson, G.R. (1998) Functional food science and gastrointestinal physiology and function. **Journal of Nutrition**, 80 (supplement), pp.147-171

Salminen, S. Gueimonde, M. & Isolauri, E. (2005) Probiotics that modify disease risk. **Journal of Nutrition**, 135 (5), pp.1294-1298.

Salvatierra, M. Molina, A. Gamboa, M. & Arias, M.L. (2004) Evaluación del efecto de cultivos de probióticos presentes en yogurt sobre *Staphylococcus aureus* y la producción de termonucleasa. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, 54 (3), pp.298-302.

Sambrook, J. Russell (2001) **Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press.**

Sancho, J. Bota, E. & De Castro, J.J. (2002). Introducción al análisis sensorial de los alimentos. Alfaomega Grupo Editor S. A. México.

Sanders, M.E. & Huis in't Veld, J.H.J. (1999). Bringing a probiotic-containing functional food to the market: microbiological, product, regulatory and labeling issues. **Antonie Van Leeuwenhoeck**, 76, pp.293-315.

Sanders, M.E. (2000) Considerations for use of probiotic bacteria to modulate human health. **Journal of Nutrition**, 130, (supplement), pp.384S-390S.

Sanders, M.E. & Klaenhammer, T.R. (2001) Invited review: The scientific basic of *Lactobacillus acidophilus* NCFM functionality as a probiotic. **Journal of Dairy Science**, 84 (2), pp.319-331.

Sartor, R.B. (2003) Targeting enteric bacteria in treatment of inflammatory bowel diseases: why, how, and when. **Current Opinion in Gastroenterology**, 19, pp.358-365.

Scardovi, V. (1986) Irregular Nonsporing Gram-positive rods. **In Manual of**

systematic bacteriology. [Sneath, P.H. Mair, N.S. Sharpe, M.E. Hollt, J.G. Bergey's.] Section 15. Vol. 2, USA. Williams & Williams.

Schrezenmeir, J. & De Vrese, M. (2001) Probiotics, prebiotics, and synbiotics-approaching a definition. **American Journal of Clinical Nutrition**, 73 (supplement), pp.361S-354S.

Senne, M.M. & Gilliland S.E. (2003) Antagonistic action of cells of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* against pathogenic and spoilage microorganisms in fresh meat systems. **Journal of Food Protection**, 66 (3), pp.418-425.

Shah, N.P. (2000) Symposium: Probiotic bacteria: Selective enumeration and survival in dairy foods. **Journal of Dairy Science**, 83 (4), pp.894-907.

Shanahan, F. (2000) Nutrient tasting and signaling mechanisms in the gut v. mechanisms of immunologic sensation of intestinal contents. (2000) **American Journal of Physiology Gastrointestinal,** 278, pp.191-196.

Shanahan, F. (2001) Probiotics in inflammatory bowel disease. **Gut**, 48, pp.609.

Shimakawa, Y. Matsubara, S. Yuki, N. Ikeda, M. & Ishikawa, F. (2003) Evaluation of *Bifidobacterium breve* strain Yakult fermented soymilk as a probiotic food. **International Journal of Food Microbiology**, 81(2), pp.131-136.

Shin, H. Lee, J. Pestka, J.J. & Ustunol, Z. (2000) Viability of *Bifidobacteria* in commercial dairy products during refrigerated storage. **Journal of Food Protection**, 63 (3), pp.327-331.

Shornikova, A.V. Isolauri, E. Burkanova, L. Lukovkinova, S. & Vesikari, T. (1997a) A trial in the Karelian Republic of oral rehydration and Lactobacillus GG. **Acta Paediatrica**, 86 (5), pp.460-465.

Shornikova, A.V. Casas, I.A. Isolauri, E. Mykkanen, H. & Vesikari, T. (1997b)

Lactobacillus reuteri as a therapeutic agent in acute diarrhea in young children. **Journal of Pediatrics Gastroenterology and Nutrition**, 24 (4), pp.399-404.

Sodini, I. Lucas, A. Oliveira, M.N. Remeuf, F. & Corrieu, G. (2002) Effect of milk base and starter culture on acidification, texture, and probiotic cell counts in fermented milk processing. **Journal of Dairy Science**, 85 (10), pp.2479-2488.

Solis, B. Marcos, A. & Lemonnier, D. (2002) Inducción de la producción de interferon por bacterias lácticas en el ser humano. **Yogur Vivo,** 11, pp.11-12.

Songisepp, E. Kullisaar, T. Hütt, P. Elias, P. Brilene T. Zilmer, M. & Mikelsaar M. (2004) A new probiotic cheese with antioxidative and antimicrobial activity. **Journal of Dairy Science**, 87, pp.2017-2023.

SSA Dirección general de epidemiología, Secretaría de Salud. Sistema único de información para la vigilancia epidemiológica. México, D.F. (1998) pp.172, 266, 454.

Stanton, C. Gardiner, G. Meehan, H. Collins, K. Fitzgerald, G. Lynch, P. & Ross, R. (2001) Market potential for probiotics. **American Journal of Clinical Nutrition**, 73 (supplement), pp.476S-483S.

Stiles, M.E. (1996) Biopreservation by lactic acid bacteria. **Antonie Van Leeuwenhock**, 70, pp.331-345.

St-Onge, M. Farnworth, E. & Jones, P. (2000) Consumption of fermented and nonfermented dairy products: effects on cholesterol concentrations and metabolism. **American Journal of Clinical Nutrition**, 71 (3), pp.674-681.

Sullivan, A. & Nord, C.E. (2002) Probiotics in human infections. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 50, pp.625-627.

Szilagyi, A. (1999) Prebiotics or probiotics for lactose intolerance: a question of adaptation. **American Journal of Clinical Nutrition**, 70 (1), pp.105-106.

Tagg, J.R. Dajani, A.S. & Wannamaker, L.W. (1976) Bacteriocins of gram-positive bacteria. **Bacteriol,** 40, pp.722-756.

Takagi, A. Matsuzaki, T. Sato, M. Nomoto, K. Morotomi M. & Yokokura, T. (2001) Enhancement of natural killer cytotoxicity delayed murine carcinogenesis by a probiotic microorganism. **Carcinogenesis**, 22 (4), pp.599-605.

Talwakar, A. & Kailasapathy, K. (2003) Metabolic and biochemical responses of probiotic bacteria to oxygen. **Journal of Dairy Science,** 86 (8), pp.2537-2546.

Tannock, G.W. Munro, K. Harmsen, H.J. Welling, G.W. Smart, J. & Gopal, P.K. (2000) Analysis of the Fecal microflora of human subjects consuming a probiotic product containig *Lactobacillus rhamnosus* DR20. **Applied and Environmental Microbiology**, 66 (6), pp.2578-2588.

Temmerman, R. Pot, B. Huys, & Swings, J. (2003) Identification and antibiotic susceptibility of bacterial isolates from probiotic products. **International Journal of Food Microbiology**, 81 (1), pp.1-10.

Tharmaraj, N. & Shah, N.P. (2004) Survival of *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei, Lactobacillus rhamnosus, Bifidobacterium animalis* and *Propionibacterium* in cheese-based dips and the suitability of dips as effective carriers of probiotic bacteria. **International Dairy Journal,** 14 (12), pp.1055-1066.

Theunissen, J. Britz, T.J. Torriani, R.C. & Witthuhun, R.C. (2005). Identification of probiotic microorganisms in South African products using PCR-based DGGE analysis. **International Journal of Food Microbiology**, 98, pp.11-21.

Thomas, L.V. & Wimpenny, J.W. (1996) Investigation of the effect of combined variations in temperature, pH, and NaCl concentration on nisin inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus*. **Applied and Environmental Microbiology**, 62 (6) pp.2006-2012.

Timmerman, H.M. Koning, C.J. Mulder, L. Rombouts, F.M. & Beynen A.C. (2004) Monostrain, multistrain and multispecies probiotics a comparison of functionality and efficacy. **International Journal of Food Microbiology**, 96 (3), pp.219-233.

Torres, M.R. (2002) **Flora intestinal, probióticos y salud.** Segunda Edición, México, D. F. Editorial Gráfica Nueva, Editora de las Universidades Iberoamericanas.

Tuomola, E. Crittenden, R. Playne, M. Isolauri, E. & Salminen, S. (2001) Quality assurance criteria for probiotic bacteria. **American Journal of Clinical Nutrition**. 73 (supplement), pp.393S-398S.

Usman, & Hosono, A. (2000) Effect of Administration of *Lactobacillus gasseri* on serum lipids and fecal steroids in hypercholesterolemic rats. **Journal of Dairy Science**, 83 (8), pp.1705-1711.

Ustunol, Z. & Gandhi, H. (2001) Growth and viability of commercial *Bifidobacterium* spp. in honey-sweetened skim milk. **Journal of Food Protection**, 64 (11), pp.1775-1779.

Van de Water, C. Keen, L. & Gershwin, M.E. (1999) The influence of chronic yogurt consumption on immunity. **Journal of Nutrition**, 129 (supplement), pp.1492S-1495S.

Van Niel, C. Feudtner, C. Garrison, M. Christakis, D. (2002) **Lactobacillus** therapy for acute infectious diarrhea in children: a meta-analysis. **Pediatrics**, 9 (4), pp.678-684.

Vanderhoof, J.A. & Young, R. (2002) Probiotics in pediatrics. **Pediatrics**, 109 (5), pp.956-958.

Villegas, E. & Gilliland, S.E. (1998) Hydrogen peroxide production by *Lactobacillus delbrueckii* subs. *lactis* I at 5°C. **Journal of Food Science**, 63 (6),

pp.1070-1074.

Vinderola, C.G. Prosello, W. Ghiberto, D. & Reinheimer, J.A. (2000) Viability of probiotic (*Bifidobacterium, Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei*) and nonprobiotic microflora in argentinian fresco cheese. **Journal of Dairy Science**, 83 (9), pp.1905-1911.

Vinderola, C.G. Mocchiutti, P. & Reinheimer, J.A. (2002) Interactions among lactic acid starter and probiotic bacteria used for fermented dairy products. **Journal of Dairy Science**, 85 (4), pp.721-729.

Waard, R. Garssen, J. Bokken, G. & Vos, J. (2002) Antagonistic activity of *Lactobacillus casei* strain s*hirota* against gastrointestinal *Listeria monocytogenes* infection in rats. **International Journal of Food Microbiology**, 73 (1), pp.93-100.

Wagner, R.D. Warner, T. Roberts, L. Farmer, J. & Balish, E. (1997 a) Colonization of congenitally immunodeficient mice with probiotic bacteria. **Infection and Immunity**, 65 (8), pp.3345-3351.

Wagner, R.D. Pierson, C. Warner, T. Dohnalek, M. Farmer, J. Roberts, L. Hilty, M. & Balish, E. (1997 b) Biotherapeutic effects of probiotic bacteria on candidiasis in immunodeficient mice. **Infection and Immunity**, 65 (10), pp.4165-4172.

Wagner, R.D. Pierson, C. Warner, T. Dohnalek, M. Hilty, M. & Balish, E. (2000) Probiotic effects of feeding heat-killed *Lactobacillus acidophilus* and *Lactabacillus casei* to candida albicans-colonized immunodeficient mice. **Journal of Food Protection**, 63 (5), pp.638-644.

Wang, K.Y. Liu, S.N. Perng, D.S. Su, Y.C. Wu, D.C. Lai, C.M. Wang, T.N. & Wang. W.M. (2004) Effects of ingesting *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* containing yogurt in subjects with colonized *Helicobacter pylori.* **American Journal of Clinical Nutrition,** 80 (3), pp.737-741.

Wanke, C.A. (2001) Do probiotics prevent childhood illnesses?. **British Medical Journal**, 322, pp.1318-1319.

Weizman, Z. Asli, G. & Alsheikh, A. (2005). Effect of a probiotic infant formula on infections in child care centers: comparison of two probiotic agents. **Pediatrics**, 115, pp.5-9.

Winkowski, K. Crandall, A. & Montville, T. (1993) Inhibition of *Listeria monocytogenes* by *Lactobacillus bavaricus* MN in beef systems at refrigeration temperatures. **Applied and Environmental Microbiology**, 59 (8), pp.2552-2557.

Wollowski, I. Taek, J. Bakalinsky, S. Neudecker Ch A.T. & Pool-Zobel, B.L. (1999) Bacteria used for the production of yogurt inactivate carcinogens and prevent DNA damage in the colon of rats. **Journal of Nutrition**, 129 (1), pp.77-82.

Xiao, J.Z. Kondo, S. Takahashi, N. Miyaji, K. Oshida, K. Hiramatasu, A. Iwatsuki, K. Kokubo, S. & Hosono, A. (2003) Effects of milk products fermented by *Bifidobacterium longum* on Blood lipids in rats and healthy adult male volunteers**. Journal of Dairy Science**, 86 (7), pp.2452-2461.

Yan, F. & D.B. Polk, (2002) Probiotic bacterium prevents cytokine-induced apoptosis in intestinal epithelial cells. **Journal of Biological Chemistry**, 277 (52), pp.959-965.

Yasui, H. Kiyoshima, J. Hori, T. & Shida, K. (1999) Protection against influenza virus infection of mice fed *Bifidobacterium breve* Yit4064. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, 6 (2), pp.186-192.

Yasui, H. Kiyoshima, J. & Hori, T. (2004) Reduction of influenza virus titer and protection against influenza virus infection in infant mice fed *Lactobacillus casei* s*hirota*. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, 11 (4), pp.675-679.

Yeung, P. Sanders, M. Kitts, C. Cano, R. & Tong, P. (2002) Species-specific identificacion of commercial probiotic strains. **Journal of Dairy Science**, 85 (5), pp.1039-1051.

APÉNDICES

Apéndice 1
Evaluación Sensorial
"Prueba Analítica de Diferenciación Triangular"

Instrucciones:

1. Antes de iniciar la prueba lea cuidadosamente toda la hoja de evaluación.
2. No hable en ningún momento con compañeros evaluadores, si tiene alguna duda durante el transcurso de la prueba, levante su mano y enseguida acudirá un coordinador a atenderle.
3. Limpie las manos con las toallitas húmedas proporcionadas.
4. Antes de iniciar la degustación, tome el agua que se proporciona, asegurándose que recorra toda la superficie de la lengua.
5. Observe el código de cada uno de los vasos que contienen las muestras.
6. Comience a probar la muestra A, identificando claramente su sabor, textura, aroma y color.
7. Antes de probar la muestra B, tome el segundo vaso de agua (si aún no lo ha recibido, espere a que se le brinde).
8. Pruebe la muestra B identificando claramente su sabor, textura, aroma y color.
9. Antes de probar la muestra C, tome el tercer vaso de agua (si aún no lo ha recibido, espere a que se le brinde).
10. Pruebe la muestra C identificando claramente su sabor, textura, aroma y color.
11. Si desea cerciorarse de algún atributo (aroma, color, sabor o textura) de alguna de las tres muestras, no olvide tomar agua antes de probarlas (si ya no tiene agua, solicítela levantando su mano para que se le provea).
12. Una vez que probó las tres muestras, llene el cuadro de evaluación que a continuación se presenta:

A. Marque con una cruz la muestra que identificó diferente en cuanto a sabor: **A B C**
B. Marque con una cruz la muestra que identificó diferente en cuanto a textura: **A B C**
C. Marque con una cruz la muestra que identificó diferente en cuanto a aroma: **A B C**
D. Marque con una cruz la muestra que identificó diferente en cuanto a color: **A B C**

Conteste las siguientes preguntas:

1. ¿Cuál de las muestras le pareció diferente y porqué?
   - _____
     _____
2. ¿Cuál de las muestras le gustó más y porqué?
   - _____
     _____
3. Si tuviera oportunidad de mejorar la muestra que más le gustó, ¿qué cambios le realizaría?
   - _____
     _____

Apéndice 2
Evaluación Sensorial
Prueba Hedonista del Nivel de Agrado

Instrucciones:

1. Antes de iniciar la prueba lea cuidadosamente toda la hoja de evaluación.
2. No hable en ningún momento con compañeros evaluados, si tiene alguna duda durante el transcurso de la prueba, levante su mano y enseguida acudirá un coordinador a atenderle.
3. Limpie sus manos con las toallitas húmedas proporcionadas.
4. Antes de iniciar la degustación, tome el agua que se proporciona, asegurándose que recorra toda la superficie de la lengua.
5. Pruebe la muestra proporcionada, procurando que el producto recorra toda la superficie de la lengua.
6. Observe el sabor, textura, aroma y color del producto.

A. De acuerdo a la calificación de la tabla, evalúe uno de los atributos de la muestra:

(9) Me Gusta Extremadamente
(8) Me Gusta Mucho
(7) Me Gusta Moderadamente
(6) Me Gusta Ligeramente
(5) Ni me gusta ni me disgusta
(4) Me Disgusta Ligeramente
(3) Me Disgusta Moderadamente
(2) Me Disgusta Mucho
(1) Me Disgusta Extremadamente

Sabor_____ Aroma_____ Color_____ Textura_____

B. Coloque una cruz frente al enunciado que mejor describa su actitud hacia el producto (solo lo puede realizar 2 veces):

1. Lo comería en cada oportunidad que tuviera (diariamente) _____
2. Lo comería frecuentemente (más de 3 veces a la semana) _____
3. Lo comería ocasionalmente (una vez a la semana) _____
4. Lo comería de vez en cuando (una vez al mes) _____
5. Lo comería si lo tuviera disponible pero no me saldría del camino para conseguirlo _____
6. Difícilmente lo comería _____
7. Lo comería si no tuviera otra opción _____
8. Lo comería únicamente si fuera forzado o comprometido _____
9. Lo comería solo si me lo obsequiaran _____
10. No lo consumiría _____

C. ¿Qué cambios le realizaría al producto para mejorar la opción que tiene actualmente de él?

_____

D. Valorando de forma integral el producto, ¿qué calificación le daría dentro de una escala del 1 al 10?

_____

Apéndice 3
"Concentración y Pureza de DNA"

Determinación de Concentración y pureza de DNA							
Queso	**Día**	**Clave**	**A 260**	**A 280**	**A 260 / A 280**	**DNA μg/μl**	**DNA en PCR**
1	0	N-5	0.135	0.063	2.14	3.38	16.88
1	0	N-6	0.133	0.061	2.18	3.33	16.63
1	0	N-7	0.061	0.029	2.10	1.53	7.63
1	0	N-8	0.014	0.007	2	0.35	1.75
1	0	P-5	0.131	0.059	2.22	3.28	16.38
1	0	P-6	0.103	0.053	1.94	2.58	12.88
1	0	P-7	0.148	0.071	2.08	3.7	18.5
1	0	P-8	0.098	0.047	2.09	2.45	12.25
1	1	N-5	0.098	0.05	1.96	2.45	12.25
1	1	N-6	0.077	0.037	2.08	1.93	9.63
1	1	N-7	0.105	0.053	1.98	2.63	13.13
1	1	N-8	0.073	0.035	2.09	1.83	9.13
1	1	P-5	0.069	0.033	2.09	1.73	8.63
1	1	P-6	0.057	0.026	2.19	1.43	7.13
1	1	P-7	0.052	0.024	2.17	1.3	6.5
1	1	P-8	0.069	0.038	1.82	1.73	8.63
1	2	N-5	0.093	0.059	1.58	2.33	11.63
1	2	N-6	0.114	0.065	1.75	2.85	14.25
1	2	N-7	0.028	0.020	1.40	0.7	3.5
1	2	N-8	0.019	0.016	1.19	0.48	2.38
1	2	P-5	0.052	0.037	1.41	1.3	6.5
1	2	P-6	0.101	0.057	1.77	2.53	12.63
1	2	P-7	0.068	0.042	1.62	1.7	8.5
1	2	P-8	0.091	0.052	1.75	2.28	11.38
1	3	N-5	0.071	0.031	2.29	1.78	8.88
1	3	N-6	0.058	0.040	1.45	1.45	7.25
1	3	N-7	0.099	0.056	1.77	2.48	12.38
1	3	N-8	0.060	0.026	2.31	1.5	7.5
1	3	P-5	0.040	0.017	2.35	1	5
1	3	P-6	0.074	0.044	1.68	1.85	9.25
1	3	P-7	0.075	0.047	1.60	1.88	9.38
1	3	P-8	0.053	0.024	2.21	1.33	6.63
2	0	S-5	0.094	0	#¡DIV/0!	2.35	11.75
2	0	S-6	0.109	0.040	2.73	2.73	13.63

2	0	S-7	0.106	0.037	2.86	2.65	13.25
2	0	S-8	0.106	0.041	2.59	2.65	13.25
2	0	I-5	0.144	0.052	2.77	3.6	18
2	0	I-6	0.097	0.032	3.03	2.43	12.13
2	0	I-7	0.119	0.041	2.90	2.98	14.88
2	0	I-8	0.176	0.067	2.63	4.4	22
2	0	2-5	0.092	0.03	3.07	2.3	11.5
2	0	2-6	0.061	0.018	3.39	1.53	7.63
2	0	2-7	0.097	0.031	3.13	2.43	12.13
2	0	2-8	0.063	0.014	4.50	1.58	7.88
2	1	S-5	0.105	0.035	3.00	2.63	13.13
2	1	S-6	0.126	0.057	2.21	3.15	15.75
2	1	S-7	0.126	0.054	2.33	3.15	15.75
2	1	S-8	0.098	0.028	3.50	2.45	12.25
2	1	I-5	0.047	0.005	9.40	1.18	5.88
2	1	I-6	0.105	0.047	2.23	2.63	13.13
2	1	I-7	0.096	0.029	3.31	2.4	12
2	1	I-8	0.073	0.017	4.29	1.83	9.13
2	1	2-5	0.032	0.017	1.88	0.8	4
2	1	2-6	0.045	0.020	2.25	1.13	5.63
2	1	2-7	0.013	0.004	3.25	0.33	1.63
2	1	2-8	0.051	0.023	2.22	1.28	6.38
2	2	S-5	0.158	0.086	1.84	3.95	19.75
2	2	S-6	0.150	0.071	2.11	3.75	18.75
2	2	S-7	0.082	0.039	2.10	2.05	10.25
2	2	S-8	0.080	0.036	2.22	2	10
2	2	I-5	0.281	0.134	2.10	7.03	35.13
2	2	I-6	0.379	0.177	2.14	9.48	47.38
2	2	I-7	0.190	0.089	2.13	4.75	23.75
2	2	I-8	0.224	0.104	2.15	5.6	28
2	2	2-5	0.042	0.022	1.91	1.05	5.25
2	2	2-6	0.087	0.042	2.07	2.18	10.88
2	2	2-7	0.033	0.016	2.06	0.83	4.13
2	2	2-8	0.075	0.037	2.03	1.88	9.38
2	3	S-5	0.218	0.104	2.10	5.45	27.25
2	3	S-6	0.168	0.082	2.05	4.2	21
2	3	S-7	0.239	0.120	1.99	5.98	29.88
2	3	S-8	0.214	0.100	2.14	5.35	26.75
2	3	I-5	0.097	0.047	2.06	2.43	12.13
2	3	I-6	0.07	0.037	1.89	1.75	8.75
2	3	I-7	0.093	0.047	1.98	2.33	11.63

2	3	I-8	0.083	0.045	1.84	2.08	10.38
2	3	2-5	0.094	0.046	2.04	2.35	11.75
2	3	2-6	0.128	0.068	1.88	3.2	16
2	3	2-7	0.116	0.057	2.04	2.9	14.5
2	3	2-8	0.147	0.072	2.04	3.68	18.38
2	4	S-5	0.198	0.100	1.98	4.95	24.75
2	4	S-6	0.211	0.101	2.09	5.28	26.38
2	4	S-7	0.214	0.100	2.14	5.35	26.75
2	4	S-8	0.171	0.080	2.14	4.28	21.38
2	4	I-5	0.122	0.062	1.97	3.05	15.25
2	4	I-6	0.093	0.047	1.98	2.33	11.63
2	4	I-7	0.128	0.067	1.91	3.2	16
2	4	I-8	0.105	0.058	1.81	2.63	13.13
2	4	2-5	0.135	0.071	1.90	3.38	16.88
2	4	2-6	0.049	0.022	2.23	1.23	6.13
2	4	2-7	0.088	0.044	2.00	2.2	11
2	4	2-8	0.117	0.056	2.09	2.93	14.63
3	0	S-3	0.049	0.025	1.96	1.23	6.13
3	0	S-4	0.02	0.007	2.86	0.50	2.50
3	0	S-5	0.063	0.031	2.03	1.58	7.88
3	0	S-6	0.059	0.028	2.11	1.48	7.38
3	0	3-3	0.123	0.057	2.16	3.08	15.38
3	0	3-4	0.137	0.066	2.08	3.43	17.13
3	0	3-5	0.101	0.049	2.06	2.53	12.63
3	0	3-6	0.062	0.028	2.21	1.55	7.75
3	0	4-3	0.055	0.025	2.20	1.38	6.88
3	0	4-4	0.059	0.027	2.19	1.48	7.38
3	0	4-5	0.057	0.025	2.28	1.43	7.13
3	0	4-6	0.087	0.041	2.12	2.18	10.88
3	1	S-3	0.014	0.005	2.80	0.35	1.75
3	1	S-4	0.099	0.047	2.11	2.48	12.38
3	1	S-5	0.026	0.009	2.89	0.65	3.25
3	1	S-6	0.046	0.037	1.24	1.15	5.75
3	1	3-3	0.033	0.016	2.06	0.83	4.13
3	1	3-4	0.057	0.026	2.19	1.43	7.13
3	1	3-5	0.054	0.023	2.35	1.35	6.75
3	1	3-6	0.012	0.003	4.00	0.30	1.50
3	1	4-3	0.043	0.023	1.87	1.08	5.38
3	1	4-4	0.018	0.008	2.25	0.45	2.25
3	1	4-5	0.09	0.07	1.29	2.25	11.25
3	1	4-6	0.071	0.044	1.61	1.78	8.88

3	2	S-3	0.036	0.022	1.64	0.90	4.50
3	2	S-4	0.05	0.028	1.79	1.25	6.25
3	2	S-5	0.034	0.016	2.13	0.85	4.25
3	2	S-6	0.033	0.017	1.94	0.83	4.13
3	2	3-3	0.022	0.011	2.00	0.55	2.75
3	2	3-4	0.012	0.005	2.40	0.30	1.50
3	2	3-5	0.033	0.018	1.83	0.83	4.13
3	2	3-6	0.005	0	#¡DIV/0!	0.13	0.63
3	2	4-3	0.056	0.024	2.33	1.40	7.00
3	2	4-4	0.01	0	#¡DIV/0!	0.25	1.25
3	2	4-5	0.003	0	#¡DIV/0!	0.08	0.38
3	2	4-6	0.089	0.041	2.17	2.23	11.13
3	3	S-3	0.046	0.028	1.64	1.15	5.75
3	3	S-4	0.071	0.037	1.92	1.78	8.88
3	3	S-5	0.074	0.037	2.00	1.85	9.25
3	3	S-6	0.029	0.016	1.81	0.73	3.63
3	3	3-3	0.012	0.009	1.33	0.3	1.5
3	3	3-4	0.024	0.014	1.71	0.6	3
3	3	3-5	0.058	0.040	1.45	1.45	7.25
3	3	3-6	0.136	0.069	1.97	3.4	17
3	3	4-3	0.037	0.025	1.48	0.93	4.63
3	3	4-4	0.041	0.026	1.58	1.03	5.13
3	3	4-5	0.156	0.049	3.18	3.9	19.5
3	3	4-6	0.100	0.056	1.79	2.5	12.5
3	4	S-3	0.029	0.020	1.45	0.73	3.63
3	4	S-4	0.033	0.023	1.43	0.83	4.13
3	4	S-5	0.028	0.019	1.47	0.7	3.5
3	4	S-6	0.025	0.021	1.19	0.63	3.13
3	4	3-3	0.019	0.015	1.27	0.48	2.38
3	4	3-4	0.008	0.008	1.00	0.2	1
3	4	3-5	0.018	0.014	1.29	0.45	2.25
3	4	3-6	0.024	0.017	1.41	0.6	3
3	4	4-3	0.035	0.026	1.35	0.88	4.38
3	4	4-4	0.051	0.032	1.59	1.28	6.38
3	4	4-5	0.015	0.012	1.25	0.38	1.88
3	4	4-6	0.039	0.028	1.39	0.98	4.88