

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE COSTA RICA

ESCUELA DE BIOLOGÍA

INFORME DE TRABAJO FINAL DE GRADUACIÓN

EVALUACIÓN DE LA VIABILIDAD SEGÚN ISO 7889/IDF 117 DE LOS CULTIVOS INICIADORES *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus* EN YOGURT Y HELADO EN ALMACENAMIENTO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO PARA LA ENUMERACIÓN DEL PROBIÓTICO *Bifidobacterium lactis*.

Juan José Ramírez Ledezma

CARTAGO, 2010.



EVALUACIÓN DE LA VIABILIDAD SEGÚN ISO 7889/IDF 117 DE LOS CULTIVOS INICIADORES *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus* EN YOGURT Y HELADO EN ALMACENAMIENTO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO PARA LA ENUMERACIÓN DEL PROBIÓTICO *Bifidobacterium lactis*.

¹ Juan José Ramírez Ledezma

RESUMEN

Los “cultivos iniciadores” *L.bulgaricus* y *S.thermophilus* son ampliamente utilizados alrededor del globo por su impacto positivo en productos alimenticios como el yogurt. De igual forma el probiótico *B.lactis* (BB-12) ha demostrado que su presencia en este tipo de productos les brinda un valor agregado por todos los beneficios que este proporciona al ser humano. La presente investigación tuvo como objetivo implementar y validar diversos protocolos para el cultivo de los microorganismos “iniciadores” *L. bulgaricus* y *S. thermophilus* y la bacteria probiótica *Bifidobacterium lactis* BB-12, con el fin de evaluar la supervivencia de estos en yogurt y helado en etapas de almacenamiento. De esta forma se validaron los protocolos para el recuento de los cultivos iniciadores y posteriormente un análisis de viabilidad de estos en cuatro muestras a base de yogurt durante su vida útil de anaquel con el fin de comprobar la existencia de al menos $1,0 \times 10^7$ UFC/g ó ml que propone INTECO. Para BB-12 se realizó una comparación entre dos protocolos para su recuento y aislamiento brindados por CHR-HANSEN para escoger el más adecuado según las necesidades y limitaciones de la empresa. El estudio de viabilidad desprendió resultados positivos ya que todas las muestras cumplían con la cantidad mínima de “iniciadores”. Por su parte para el aislamiento de BB-12 se escogió el protocolo 2, que utiliza la mupirocina como agente selectivo, ya que se adapta mejor a los requerimientos de la compañía. Palabras clave: *L.bulgaricus*; *S.thermophilus*, *B.lactis*, cultivos iniciadores, yogurt, viabilidad, validación.

¹ INFORME DE TRABAJO FINAL DE GRADUACIÓN, Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago, Costa Rica 2010.

EVALUACIÓN DE LA VIABILIDAD SEGÚN ISO 7889/IDF 117 DE LOS CULTIVOS INICIADORES *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus* EN YOGURT Y HELADO EN ALMACENAMIENTO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO PARA LA ENUMERACIÓN DEL PROBIÓTICO *Bifidobacterium lactis*.

**Informe presentado a la Escuela de Biología
Del Instituto Tecnológico de Costa Rica como requisito parcial
Para optar al título del Bachiller de Ingeniería en Biotecnología**

Miembros del Tribunal



Dra. Virginia Montero Campos
Profesora Asesora-ITCR



Dr. Roberto Ávila Arias
Asesor Empresa



Dr. Carlos Chacón Vargas
Lector

DEDICATORIA

A DIOS, mis padres, mi familia y a mi niña,
por ser los pilares de mi existencia

AGRADECIMIENTOS

Primero que nada, debo darle gracias a Dios, por haberme permitido llegar hasta aquí y desarrollarme en el mundo de la ciencia y de esta forma enterarme de su grandeza.

A mis padres, en especial mi madre, por darme la vida y sacrificarse tanto para que nunca me faltase nada y hacerme una persona de bien.

A mi familia, hermanos(as), tíos(as), primos(as) y abuelos(as), por confiar siempre en mis capacidades y hacerme crecer como persona y especialmente a tío Hugo y a tía Emi, por brindarme siempre una pronta solución a mis problemas y mostrarse siempre cooperativos con todo lo relativo a este proyecto.

A mi niña adorada, por ser mi fuente de inspiración, por darme fuerzas y por estar a mi lado tanto tiempo, en las buenas y en las malas.

A la Dra. Virginia Montero, en primer lugar por sembrar en mí las bases y el interés hacia la rama de la microbiología en donde me desarrollo actualmente, y en segundo lugar, por sus consejos y respaldo en el presente trabajo.

Al Dr. Roberto Ávila, por su paciencia, positivismo y sus consejos durante todo el transcurso de la práctica y por ser un ejemplo a seguir.

Al personal de la Cooperativa de Productores de Leche Dos Pinos R.L. por su amabilidad y por estar siempre dispuestos a colaborar con mi persona. Acá debo destacar al Lic. Marco Aguilar, por abrirme las puertas de tan honorable empresa y también al Dr. Carlos Chacón y al Sr. Ronald Hidalgo por hacer de cada día de trabajo un día especial y por crear un ambiente laboral óptimo.

Por último pero no menos importante, quisiera agradecer a todos mis amigos y amigas, que directa o indirectamente me ayudaron a salir adelante con tan ardua labor.

Gracias a todos!

INDICE GENERAL

CONTENIDO

RESUMEN	i
DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
INDICE DE CUADROS	viii
INDICE DE FIGURAS	x
INDICE DE ANEXOS	xi
1 INTRODUCCIÓN	1
2 Revisión literaria	3
Importancia de los microorganismos	3
Fermentos Lácticos.....	4
Cultivos Iniciadores en Yogurt	9
Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus.....	11
Streptococcus salivarius subsp. thermophilus.....	13
Microorganismos Probióticos	16
Generalidades	16
Probióticos en el cuerpo humano	18
Diferentes beneficios de los probióticos en el cuerpo humano.....	19
Bifidobacterium animalis subsp. lactis (BB-12).....	24
3 Objetivos	27
Objetivo general.....	27
Objetivos específicos	27
4 METODOLOGÍA	28
4.1 Validación e implementación de un método de trabajo para la cuantificación de los cultivos “iniciadores” <i>L. bulgaricus</i> y <i>S. thermophilus</i> ..	29
4.1.1 Medio MRS Acidificado	29

4.1.2. Medio M17.....	30
4.1.3 Pruebas para encontrar la dilución correspondiente a cada muestra	30
4.1.4 Validación para el medio MRS acidificado y M17 para la enumeración y análisis de <i>L.delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> y <i>S.thermophilus</i> respectivamente.	31
4.2 Estudio de viabilidad de los cultivos “iniciadores” en yogurt y helado a lo largo de su vida útil (de anaquel) utilizando el protocolo implementado y validado.....	34
4.3 Validación de un protocolo para la cuantificación de <i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> BB-12, escogido mediante la comparación (de diversos factores) entre dos protocolos propuestos por CHR HANSEN.	35
4.3.1 Preparación de las soluciones.....	36
4.3.2 Pruebas para la escogencia de un protocolo	37
4.3.3 Validación del protocolo 2 (MRS + CyHCl + Mupirocina)	40
Repetibilidad.....	40
Reproducibilidad.....	40
Veracidad	41
5 RESULTADOS.....	42
5.1 Validación e implementación de un método de trabajo para la cuantificación de los cultivos “ <i>iniciadores</i> ” <i>L. bulgaricus</i> y <i>S. thermophilus</i> ..	42
Repetibilidad.....	42
Reproducibilidad.....	45
Veracidad	46
5.2 Estudio de viabilidad de los cultivos “ <i>iniciadores</i> ” en yogurt y helado a lo largo de su vida útil utilizando protocolos implementados y validados.	47
Muestra A.....	49
Muestra B.....	51
Muestra C.....	52
Muestra D.....	53

5.3 Validación de un protocolo para la cuantificación de Bifidobacterium lactis BB-12, escogido comparando diversos factores entre dos protocolos propuestos por CHR HANSEN.	55
Pruebas para la escogencia de un protocolo	55
Repetibilidad.....	57
Reproducibilidad.....	58
Veracidad	59
6 DISCUSIÓN	60
6.1 Validación e implementación de un método de trabajo para la cuantificación de los cultivos “iniciadores” <i>L. bulgaricus</i> y <i>S. thermophilus</i> ..	60
Búsqueda de las diluciones adecuadas para el análisis	60
Prueba de repetibilidad.....	60
Prueba de reproducibilidad.....	62
Prueba de veracidad	63
6.2 Estudio de viabilidad de los cultivos “iniciadores” en yogurt y helado a lo largo de su vida útil utilizando protocolos implementados y validados.	65
6.3 Validación de un protocolo para la cuantificación de Bifidobacterium lactis BB-12, escogido comparando diversos factores entre dos protocolos propuestos por CHR HANSEN	69
7 CONCLUSIONES	74
8 RECOMENDACIONES	76
9 LITERATURA CITADA.....	77
10 ANEXOS	87

INDICE DE CUADROS

Cuadro	Título	Pág.
1.	Muestra correspondiente a cada producto utilizado en el estudio de los cultivos iniciadores.....	30
2.	Características de cada una de las muestras utilizadas en la búsqueda de un protocolo para el cultivo de <i>Bifidobacterium lactis</i>	36
3.	Conteo para las diluciones utilizadas en la prueba para cada medio.	42
4.	Análisis de repetibilidad para cada una de las muestras utilizadas en el estudio de <i>L.delbrueckii subsp. bulgaricus</i> en medio MRS acidificado(pH 4,6).....	43
5.	Estudio de repetibilidad para cada una de las muestras utilizadas en la enumeración de <i>S.thermophilus</i> en Medio M17 complementado con lactosa.	44
6.	Estudio de reproducibilidad para la enumeración y análisis de <i>L.delbrueckii subsp. bulgaricus</i> en medio MRS acidificado(pH 4,6).	45
7.	Estudio de reproducibilidad para la enumeración y análisis de <i>S.thermophilus</i> en Medio M17 complementado con lactosa.....	46
8.	Resultados de prueba de veracidad efectuada a los dos protocolos utilizados en el presente estudio.....	47
9.	Productos utilizados a lo largo de todo el análisis de viabilidad.....	48
10.	Estudio de viabilidad de los microorganismos “starters” en la muestra A (Deligurt Fresa) durante las 7 semanas de su vida útil.	50
11.	Estudio de viabilidad de los microorganismos Starters en la muestra B (Yogurt Topping Chocolate) durante las 7 semanas de su vida útil.....	51
12.	Estudio de viabilidad de los microorganismos Starters en la muestra C (Helado Yogurt Fresa) durante 7 semanas.....	52
13.	Estudio de viabilidad de los microorganismos Starters en la muestra D (Paleta de Yogurt Mora) durante 7 semanas.	54

14. Resultados de la primera prueba para la escogencia del mejor protocolo para la enumeración de BB-12.....	55
15. Resultados de la segunda prueba para la escogencia del mejor protocolo para la enumeración de BB-12.....	56
16. Resultados de la tercer prueba para la escogencia del mejor protocolo para la enumeración de BB-12.	56
17. Resultados del estudio de repetibilidad para las dos muestras utilizadas para la validación del protocolo 2.....	57
18. Resultados del estudio de reproducibilidad con la muestra A para la validación del protocolo 2.	58
19. Resultados de prueba de veracidad efectuada al protocolo dos utilizado en el presente estudio.	59

INDICE DE FIGURAS

Figura	Título	Pág.
1.	Taxonomía de las bacterias ácido lácticas.....	6
2.	Mutualismo de <i>Lactobacillus bulgaricus</i> y <i>Streptococcus thermophilus</i> en yogurt.....	10
3.	Gránulos metacromáticos en <i>Lactobacillus bulgaricus</i> observados a 100x.....	12
4.	<i>Lactobacillus bulgaricus</i> observados a 100x.....	13
5.	<i>Streptococcus thermophilus</i> observados a 100x.....	15
6.	<i>Streptococcus thermophilus</i> observados a 100x.....	16
7.	<i>Bifidobacterium lactis</i> observados a 100x.....	26
8.	<i>Bifidobacterium lactis</i> observados en microscopio.....	26
9.	Muestras a utilizar durante el análisis, descritas en el cuadro 9.	48
10.	Viabilidad de <i>L.bulgaricus</i> en las cuatro muestras en estudio durante su periodo de almacenamiento.....	66
11.	Viabilidad de <i>S.thermophilus</i> en las cuatro muestras en estudio durante su periodo de almacenamiento.....	67

INDICE DE ANEXOS

Anexo	Título	Página
1.	Composición de los medios utilizados en el proyecto.....	87
2.	Principales características de <i>Lactobacillus delbruekii</i> subsp. <i>Bulgaricus</i> , <i>L. delbruekii</i> subsp. <i>Lactis</i> , <i>L. helveticus</i> y <i>L. acidophilus</i>	89
3.	“Enumeration of Bifidobacteria in fermented milk products – Guideline (CHR-Hansen, 2001)”	91
4.	“ <i>L. acidophilus</i> , <i>L. casei</i> and <i>Bifidobacteria</i> in fermented milk products – Guideline (CHR-Hansen, 2001)”	923

1 INTRODUCCIÓN

El único planeta en el que hasta el momento se conoce la existencia de vida es la Tierra, y con el paso de los años se hace aún más evidente la importancia de las bacterias en el inicio de la misma; lo que hace a estos organismos sumamente interesantes a los ojos de los científicos en diversas ramas (Curtis *et al*, 2000).

Los microorganismos son formas de vida muy pequeñas que sólo pueden ser observados a través del microscopio. Sin embargo, su tamaño no les resta complejidad, ya que existen un sin número de bacterias, hongos, virus y levaduras con funcionamientos, comportamientos y condiciones de vida que ni aún los más expertos logran explicar (Curtis *et al*, 2000).

Se ha encontrado que en el ser humano, más concretamente en el sistema digestivo habitan alrededor de 400 especies de bacterias, dentro de las cuales encontramos las no deseables, que suelen ser bacterias patógenas que a menudo invaden ciertas partes del cuerpo causando serios problemas a la salud. Sin embargo la gran mayoría son beneficiosas e inocuas para nuestro organismo, dándole condiciones aptas para el buen funcionamiento del tracto digestivo (Guarner, 2002).

Los probióticos son microorganismos vivos que al ser ingeridos en cantidades adecuadas pueden llegar a proporcionar efectos benéficos en nuestro sistema (Sodini *et al*, 2002).

Cuando se habla de probióticos, la mayor parte del tiempo se hace referencia a los conocidos como lactobacilos y bifidobacterias, que se encuentran en un gran número de productos lácteos fermentados como yogures y quesos. Sin embargo buena parte de estos beneficios a la salud que dichos productos

guardan, se debe en gran medida a la acción de sus dos fermentos clásicos mejor conocidos como “starters”: *Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*, que son bacterias que dan inicio a la fermentación y producción de yogurt, para luego dar paso a la adición de los probióticos (Corrales *et al*, 2007).

Dichos organismos producen ácido acético, láctico y fórmico, y consecuentemente una disminución del pH del intestino grueso, lo que se traduce en la inhibición del crecimiento de bacterias patógenas. Es por esto que la salud de nuestro tracto digestivo se ve condicionada en gran parte al control que puedan ejercer estos probióticos sobre los patógenos (Pérez y Ramírez, 2007).

Por esta razón, en esta investigación que se realizó en la Cooperativa de Productores de Leche Dos Pinos R.L. se busca controlar las cantidades y condición de estos microorganismos benéficos en yogurt y helado a lo largo de su vida de anaquel (almacenamiento), esto para comprobar que estas cantidades cumplen con el mínimo de $1,0 \times 10^7$ UFC por gramo o mililitro que propone el CODEX STAN 243-2003 para considerar un producto como yogurt y a la vez para asegurarse de que causen este efecto positivo en la salud de sus consumidores.

Para ello se realizarán pruebas de supervivencia para distintos microorganismos de acuerdo a los protocolos establecidos por la normativa ISO (ISO 7889/IDF 117).

2 REVISIÓN LITERARIA

Importancia de los microorganismos

Aunque parezca difícil de creer, la raza humana lleva en este planeta unos cuantos millones de años. Sin embargo otros organismos que tenemos siempre muy cerca fueron los primeros seres vivos que poblaron la Tierra y sus únicos habitantes durante siglos. Su trabajo fue decisivo para crear las condiciones iniciales de la existencia de vida en el planeta y hoy por hoy los encontramos prácticamente en cada rincón del planeta cubriendo como un inmenso manto mares, montañas, cuevas, atmósfera y por supuesto, nuestro cuerpo (Piñero, 1995).

Durante siglos, la raza humana ha hecho uso de la gran variedad de microorganismos existentes que poseen de una u otra manera propiedades benéficas en el desarrollo de diferentes practicas como lo son la agricultura, farmacología, producción de pan, bebidas fermentadas entre otras. La gran mayoría de las veces, las personas desconocían del mecanismo de acción de estas bacterias en los procesos ya nombrados. Sin embargo, estas recetas fueron de generación en generación hasta que se pudo descubrir la relevancia de los microorganismos en las mismas. Hoy en día nos encontramos en una cultura que empieza a entender y apreciar el uso de microorganismos en los principales procesos de producción y gracias a esto, dichos productos han tenido un impacto muy positivo en el ser humano. Actualmente, entre los organismos más utilizados por el hombre encontramos las bacterias acido lácticas (Farnworth, 2003).

Fermentos Lácticos

Normalmente un alimento fermentado es el resultado de la transformación microbiana de un producto, esto principalmente por el catabolismo de carbohidratos, mediante el cual se obtienen ácidos orgánicos, alcoholes y CO₂. En este proceso, se origina una modificación de las características sensoriales de las materias primas, dando como resultado una amplia gama de alimentos que incluyen los lácteos (yogurt, mantequilla, quesos y demás) y una gran diversidad de productos de panadería, embutidos, encurtidos y bebidas fermentadas (Sandine, 1979).

Se puede decir que los estudios en microbiología láctica comenzaron con la investigación del proceso de acidificación que se lleva a cabo de manera natural en la leche (Hassan y Frank, 2001). En 1857 Pasteur fue el primero en demostrar que dicho proceso era gracias a los microbios presentes en los lácteos; posteriormente se aislaron los cultivos puros de bacterias ácido lácticas (LAB, por sus siglas en inglés: *Lactic Acid Bacteria*) responsables de este proceso (Morais, 2004).

La fermentación láctica es efectuada por las bacterias que normalmente se encuentran en la leche, o bien puede ser inducida en forma de cultivos liofilizados de inoculación directa, proceso que origina a partir de los azúcares el ácido láctico principalmente y pequeñas cantidades de productos secundarios como compuestos carbonílicos, ácidos grasos volátiles (acético, propiónico, butírico y caproico), aminoácidos (valina, leucina, isoleucina, tirosina), cetoácidos (acetona, butanona), furfural, furfuralcohol, acetaldehídos y alcoholes (bencil-alcohol, bencil aldehído). Dicho proceso también es conocido como la etapa de acidificación y se compone de la fase de siembra y de incubación. (Morais, 2004).

Hoy en día, se utilizan cultivos lácticos iniciadores comerciales para la elaboración de gran cantidad de productos. Estos cultivos son manipulados de acuerdo a la necesidad que tenga el productor y las características que quiera implantar en el producto. De esta manera se le puede dar a un producto mediante la adición de bacterias sabor, aroma, resistencia a bacteriófagos, tolerancia a la sal, producción de bacteriocinas, entre otros (Morais, 2004).

Las bacterias lácticas son anaerobias pero algunas son aerotolerantes, en general son gran-positivas, sin formación de esporas y se caracterizan por una producción significativa de ácido láctico proveniente del metabolismo de los carbohidratos (Fox et al., 2000).

Estas bacterias necesitan de varios aminoácidos, vitaminas y factores de crecimiento, y son incapaces de hacer uso de carbohidratos complejos (Stanley, 1998).

En este grupo de LAB se pueden incluir los géneros *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Vagococcus*, *Aerococcus*, *Alloicoccus*, *Tetragenococcus*, *Carnobacterium*, *Weissella*, *Oenococcus*, *Bifidobacterium* y *Propionibacterium*. Exceptuando los dos últimos, todos los anteriores corresponden al *Phylum* B XIII *Firmicutes* del dominio *Bacteria*; Clase *Bacilli*; y Orden *Lactobacillales*. Son bacterias Gram positivas, que presentan genomas con un contenido en G+C inferior al 50%. Los géneros *Bifidobacterium* y *Propionibacterium* se adscriben al *Phylum* B XIV *Actinobacteria* del dominio *Bacteria*; Clase *Actinobacteria*; y Órdenes *Bifidobacteriales* y *Actinomycetales*, respectivamente. Sus miembros se caracterizan por ser bacterias Gram positivas y poseer genomas con un contenido en G+C superior al 50%. (Ludwig et al., 1994; Fox et al., 2000).

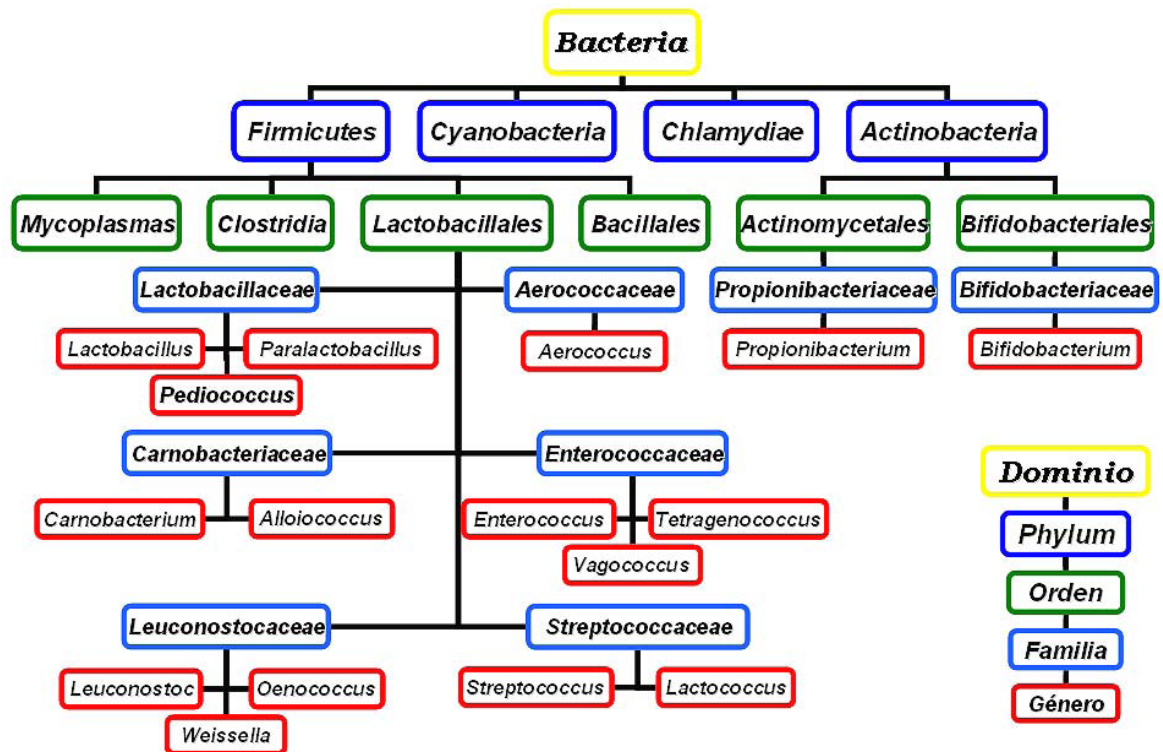


Figura 1. Taxonomía de las bacterias ácido lácticas (Hernández, 2007).

Los géneros más utilizados habitualmente para la obtención de alimentos y bebidas fermentadas son *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus* y dentro del género *Streptococcus* la especie *S. thermophilus* (Hernández, 2007).

Estos microorganismos se pueden clasificar de varias formas según un criterio taxonómico fenotípico, el cual incluye morfología, fermentación de carbohidratos, temperatura y tolerancia a la sal. Morfológicamente, encontramos la división entre cocos y bacilos (Axelsson, 1998).

Además estos organismos, como se menciona anteriormente, forman ácido láctico como producto principal de la fermentación de los azúcares y los podemos clasificar según la forma de realizar dicho proceso. De esta

manera, las bacterias lácticas homofermentativas utilizan la vía de Embden-Meyerhof, que consta de una secuencia de reacciones enzimáticas que comienza con la fosforilación de 1 mol de glucosa para la conversión anaeróbica a 1,8 moles de ácido láctico aproximadamente y así producir energía en forma de ATP (Stanley, 1998; King, 2009).

Por su parte las heterofermentativas producen 1 mol de ácido láctico por cada mol de glucosa, y además cantidades apreciables de dióxido de carbono, etanol y otros productos volátiles. Esto mediante una vía anabólica que utiliza 6 carbonos de glucosa para generar azúcares de 5 carbonos y equivalentes reducidos (NADPH) llamada la ruta de las pentosas de fosfato; que además, provee de ribosa-5-fosfato que es utilizada principalmente para la síntesis de nucleósidos y ácidos nucleicos (Stanley, 1998; King, 2009).

Otra clasificación proporcionada es según su temperatura de crecimiento óptimo, de tal forma que las bacterias mesófitas crecen a un ámbito de temperatura de 20-40°C siendo la más favorable a 30°C. De este grupo son principalmente utilizados en la industria los géneros *Lactococcus* y *Leuconostoc*. Por su parte, las bacterias termófilas presentan una temperatura óptima de desarrollo de 40-45°C y son empleadas para la elaboración de diferentes productos. Dentro de las más relevantes encontramos los géneros *Lactobacillus* y *Streptococcus* (Cogan, 1996, Stanley, 1998).

Hoy en día se dispone de diversos medios de cultivo para el aislamiento, diferenciación y enumeración de las bacterias lácticas, siendo el inconveniente más grande la poca selectividad presentada por los mismos. De esta manera se realizan cambios para la diferenciación basados en las características bioquímicas como la sensibilidad al oxígeno, resistencia a

diferentes antibióticos, producción de ácido y demás, así como los bioproductos de las especies a aislar, como por ejemplo el ácido acético, diacetilo, acetoina, CO₂, etc (Hassan y Frank, 2001).

Los medios de cultivo más utilizados para aislar LAB son el M17 para *Lactococcus spp.* y *Streptococcus thermophilus*, el MRS para *Lactobacillus spp.* y el MSE para *Leuconostoc spp.* (DeMan *et al.*, 1960 y Mayeux *et al.*, 1962 ;Terzaghi y Sandine, 1975).

Para los cultivos lácticos existen propiedades deseables según el tipo de producto que se desea elaborar, la que presentan en común es la producción rápida de ácido y principalmente brindar un sabor y aroma favorable (Morais, 2004).

Dentro de los principales criterios de selección para LAB en la fermentación de alimentos se espera que el organismo no sea patógeno o bien que no posea ningún tipo de actividad tóxica, además que éste pueda generar los cambios deseados como la acidificación, proteólisis y lipólisis para dar características organolépticas específicas como sabor, aroma y textura. También se busca la cualidad de competir con otros microorganismos no favorables mediante la acidificación o bien la producción de bacteriocinas y una buena propagación, preservación y estabilidad de las características deseables (Buchenhúskes, 1993).

Vale la pena recalcar que las LAB son consideradas internacionalmente como microorganismos GRAS (por sus siglas en inglés: *General Regarded As Safe*)(Felis y Dellaglio, 2009).

Cultivos Iniciadores en Yogurt

El yogurt es un alimento muy saludable que en los últimos años ha tenido un auge impresionante. Si bien es cierto no se sabe exactamente ni donde ni cuando el hombre hizo uso por primera vez del mismo, se cree que fue por el año 5000 a.C. en Mesopotamia, y su nombre proviene de la palabra turca “yoghurut”.

Una cosa si es segura, gracias a la creciente demanda del yogurt, la industria láctea alrededor del mundo le ha dado tal importancia, que día con día salen a la venta diferentes tipos, y todos muy bien recibidos por los consumidores (Farnworth, 2003).

Una de las propiedades más destacables del yogurt es su capacidad de regenerar la flora intestinal, la cual se ve muy afectada por una mala alimentación y sobre todo, por infecciones y abuso de medicamentos como los antibióticos (Mendoza, 2007).

Un cultivo iniciador (“CI”, “*starter*” o fermento) es una o más cepas, ya sea de una o varias especies utilizadas para inocular un determinado producto con el fin de llevar a cabo una fermentación (Sandine, 1979).

El yogurt es obtenido por fermentación láctica mediante la acción de cultivos (iniciadores) protosimbóticos de *Lactobacillus delbruekii sub. bulgaricus* y *Streptococcus salivarius sub. thermophilus*, con esta protooperación se producen niveles de ácido láctico y acetaldehído superiores a los que se obtendrían por separado, además de reducir el tiempo de latencia y aumentar la producción de biomasa. Esta relación se basa en los diferentes requerimientos nutricionales que presenta cada una de las bacterias antes nombradas. *S. thermophilus* crece más rápido, produciendo ácido fórmico y

dióxido de carbono; compuestos que favorecen el desarrollo de *L. bulgaricus*, que por su parte genera péptidos y aminoácidos debido a su actividad proteolítica. *S. thermophilus* se aprovecha de estos metabolitos como un aporte exógeno de enzimas proteolíticas extracelulares. Esta última bacteria gracias a su metabolismo genera en el medio la disminución inicial del pH hasta niveles que rondan las 5 unidades. Por otra parte su acompañante logra acidificar el producto hasta un pH final cercano a 4 (Hernandez, 2007).

Durante su crecimiento en leche *Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus* utilizan la lactosa como fuente principal de energía. Se conocen dos formas para el metabolismo y sistema de transporte de lactosa dentro del grupo de las LAB; la primera de estas es un sistema de fosfotransferasa de fosfoenolpiruvato(PEP) de lactosa, con una enzima fosfo-p-galactosidasa. Por otra parte tenemos la segunda ruta, que es un sistema de permeasa de lactosa con una p-galactosidasa, el cual utiliza *L. bulgaricus* del que se habla más adelante (Leong-Morgenthaler *et al.*, 1991).

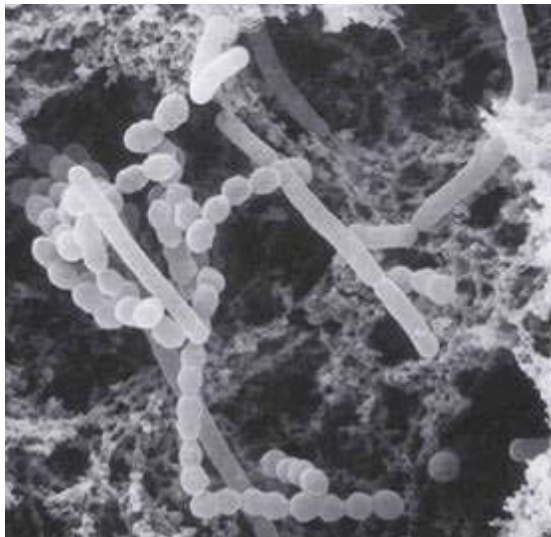


Figura 2. Mutualismo de *Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus* en yogurt (Hernandez, 2007).

Dichos microorganismos fermentadores (CI) deben ser viables y estar presentes en el producto terminado en cantidad mínima de $1,0 \times 10^7$ U.F.C por gramo o mililitro (INTECO, 2006).

En la siembra se inoculan el *S. thermophilus* y el *L. bulgaricus* en una relación que varía según las recetas propias de la casa productora; es muy importante lograr una concentración adecuada de estos microorganismos para obtener una acidificación correcta, asegurar que las bacterias resistan condiciones desfavorables, lograr una buena textura y evitar sinéresis, que es la pérdida de agua del producto (Castillo et al., 2004).

Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus

El género *Lactobacillus* es uno de los más utilizados en fermentaciones alimentarias, aunque también constituye un porcentaje elevado de la microbiota intestinal. Los organismos pertenecientes a este género son bacilos gram positivos, usualmente largos, no patógenos, no esporulados y por lo general no móviles. Estas bacterias son anaerobias facultativas o microaerófilas con un contenido de G+C que va de 32-53% Mol. Además, son mesófilos y quimioheterótrofos; carecen de catalasa y de citocromos y se consideran organismos complejos, ya que requieren de muchas vitaminas, aminoácidos, purinas y pirimidinas por su limitada capacidad biosintética. Dentro de este heterogéneo género se encuentran alrededor de 100 especies, de las cuales *L.delbrueckii* es una de las más reconocidas; formada por las subespecies *delbrueckii*, *bulgaricus*, *indicus* y *lactis* (Axelsson, 1998; Hernandez, 2007, Felis y Dellaglio, 2009).

Estos microorganismos pueden ser aislados de productos lácteos, plantas, carnes, aguas residuales, cerveza, frutas y un sinnúmero de sustratos (Felis y Dellaglio, 2009).

Una característica de *L. bulgaricus* es que utiliza la ruta antes mencionada para transportar y metabolizar la lactosa. Esta es traída a la célula como azúcar libre y cortada por la P-galactosidasa. Las moléculas de glucosa del azúcar son metabolizadas mientras las de galactosa son liberadas (Leong-Morgenthaler *et al.*, 1991).

Se conoce también que al igual que muchos de sus parientes, *Lactobacillus bulgaricus* posee gránulos metacromáticos; que son grupos de fosfato unidos por enlaces ester que funcionan como reserva de fosforo para la bacteria. Estos se sintetizan al escasear algún nutriente esencial y se pueden observar luego de una tinción Gram o bien con colorantes básicos como el azul de metileno o toluidina (Leong-Morgenthaler *et al.*, 1991).



Figura 3. Gránulos metacromáticos en *Lactobacillus bulgaricus* observados a 100x.

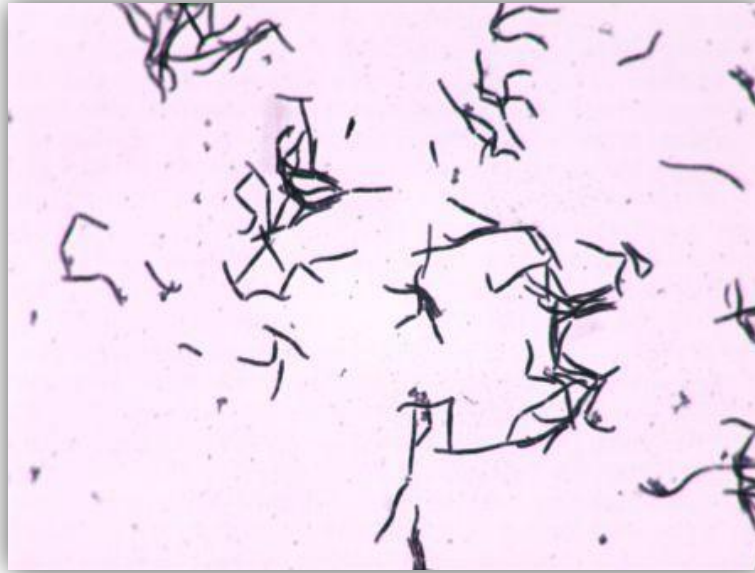


Figura 4. *Lactobacillus bulgaricus* observados a 100x.

Streptococcus salivarius subsp. thermophilus

Este género consta de cocos (esféricos u ovoides) gram positivos, inmóviles, con ausencia de citocromos y con un diámetro comprendido entre 0,7–1 μm . Dentro de éste género podemos hallar especies causantes de enfermedades como amigdalitis e impétigo, producidas por *Streptococcus pyogenes* del grupo A. También meningitis en neonatos y trastornos del embarazo en la mujer a causa de *Streptococcus agalactiae* del grupo B. Otra bacteria perjudicial es *Streptococcus pneumoniae* que es la principal causa de neumonía y por su parte *Streptococcus viridans* es una causa importante de endocarditis y de abscesos dentales (Mendoza, 2007).

En este grupo también encontramos bacterias benéficas como *Streptococcus thermophilus*. Esta última especie es una de las LAB más importantes por su gran impacto económico en la industria láctea. Al igual que los Lactobacillus, son exigentes cuando de requerimientos nutricionales

se refiere, encontrándose casi exclusivamente en la leche o sus derivados y se disponen siempre en grupo, ya sea en parejas o en cadenas, además no poseen capsula. Obtiene energía mediante la fosforilación a nivel de sustrato en vez de fosforilación oxidativa y transporte electrónico. Son moderadamente termofílicos, creciendo en un rango de temperaturas de 15–45 °C, asimismo, posee uno de los genomas más pequeños de todas las LAB, con un porcentaje de G+C del 40% (Hernández, 2007).

Esta bacteria es considerada como anaerobia aerotolerante y es capaz de producir energía (ATP) por su respiración aeróbica o por fermentación; sin embargo crece más lentamente en presencia de oxígeno que en su ausencia, mostrando una tasa de crecimiento de 40 y 27 minutos respectivamente. Esta habilidad de sobrevivir en estas condiciones se presume que proviene de la existencia de un mecanismo de defensa que ayuda a las células a eliminar las especies reactivas de oxígeno (ROS) y a reparar el daño (Stingele *et al.*, 1999; Fernandez *et al.*, 2003).

En principio, la lactosa es la fuente principal de carbón y energía para *S. thermophilus*. Este usa un transporte de lactosa que utiliza un gradiente de protones para acumular la galactosidasa dentro de la célula. La acumulación de esta, promueve su intercambio por lactosa, de esta manera esta última es metabolizada (Foucaud y Poolman, 1992).

Su pared celular está compuesta por N-acetilglucosamida (NAG) y ácido N-acetilmuránico (NAM), y se encuentra unida por ligamentos de éter. Esta singular estructura provee a *S. thermophilus* de la habilidad de soportar elevadas temperaturas, lo cual es sumamente importante para muchas de las fermentaciones industriales que requieren el procesamiento de la leche a estas temperaturas (Stingele *et al.*, 1999).

Su mecanismo proteolítico consiste en la degradación de las proteínas por las enzimas proteasas. *S. thermophilus* posee únicamente dos peptidasas, la oligopeptidasa y la aminopeptidasa que cumplen múltiples funciones en el crecimiento de la bacteria. Las aminopeptidasas son las únicas enzimas que funcionan como exopeptidasas, en otras palabras enzimas que catalizan la separación de aminoácidos específicos de un polipéptido. Estas enzimas esenciales desempeñan acciones como la maduración de las proteínas, la hidrólisis de proteínas reguladoras, regulan la expresión génica, el metabolismo del nitrógeno, entre otras (Fernandez-Espla y Rul, 1999).

La industria alimentaria usa bacterias como *S. thermophilus* gracias a su habilidad proteolítica para crecer e hidrolizar proteínas de la leche como la caseína. Enzimas como la aminopeptidasa son la clave para que estos organismos sean utilizados como iniciadores debido a que los exopolisacáridos creados por estas peptidasas son indispensables para generar una textura y propiedades organolépticas favorables para los productos (Fernandez-Espla y Rul, 1999).



Figura 5. *Streptococcus thermophilus* observados a más de 100x.



Figura 6. *Streptococcus thermophilus* observados a 100x.

Microorganismos Probióticos

Generalidades

A favor de vida, este es el significado proveniente del vocablo latín “pro”(a favor) y griego “bios”(vida) para la palabra probiótico, la cual ha sido ampliamente utilizada durante los últimos años por industrias alimentarias (Guarner y Schaafsman, 1998; Schrezenmeir y De Vrese, 2001).

Elie Metchnikoff, zoólogo, microbiólogo, Premio Nobel de Medicina y Fisiología en 1908, y destacado investigador del Instituto Pasteur y el Instituto Bacteriológico de Odessa, dio el primer concepto de la palabra a principios del siglo XX, dando una descripción detallada con base en la importancia de la microflora intestinal en el estado general de la salud del ser humano. Además relacionó la salud y longevidad de las personas con los

microorganismos presentes en alimentos como yogurt, kéfir y la leche agria. Esto gracias a que notó que en Bulgaria existía un inmenso número de personas centenarias, lo cual le parecía extraño ya que era un país pobre y con pocos servicios médicos; sin dudarlo viajó hacia el país en donde descubrió que la población consumía yogurt en grandes cantidades, de esta manera pudo aislar los microorganismos presentes en aquel alimento, utilizándolos para sus investigaciones (Hughes y Hoover, 1991; Trapp et al, 1993; Siuta-Cruce y Goulet, 2001).

Posterior a esto, se dieron diversas definiciones. En 1965, Lilly y Stillwell lo usaron para describir sustancias secretadas por microorganismos que estimulan el desarrollo de otras (Lilly y Stillwell, 1995).

Sin embargo, Parker fue el primero en utilizar el vocablo de la manera en que hoy lo conocemos, en otras palabras, organismos o sustancias que directa o indirectamente tienen efectos positivos en el balance de la flora intestinal. Se ha querido mejorar esta definición con un sin número de opciones. Luego de todas estas definiciones se puede concluir que los probióticos son microorganismos viables, que al ser adicionados en alimentos o algún otro tipo de productos de ingesta como los farmacéuticos, modifican la flora intestinal al aumentar el número y diversidad de organismos benéficos, dando como resultado una mejora en la salud del hospedero (Schrezenmeir y De Vrese, 2001).

Actualmente muchas bacterias son reconocidas como probióticos, dentro de las más significativas encontramos del género lactobacillus: *L. casei*, *L. rhamnosus*, *L. acidophilus*, *L. bulgaricus*, *L. fermentum*, *L. gasseri*, *L. johnsonii*, *L. lactis*, *L. paracasei*, *L. plantarum*, *L. reuteri* y *L. salivarius*. Por su parte el género bifidobacterium aporta: *B. bifidum*, *B. breve*, *B. infantis*, *B. lactis*, y *B. longum*. Además otras de géneros variados como *S.thermophilus*.

Sin embargo, a pesar de la gran variedad aparente de microorganismos probióticos, para ser calificadas como tales es necesario que estas cumplan con ciertos requisitos lógicos como inocuidad, estabilidad, o capacidad de adherencia a las mucosas y otros más complejos como cumplir alguna función de barrera contra patógenos, mejorar la asimilación de nutrientes o bien estimular una respuesta inmune (Martinez *et al.*, 2007).

Probióticos en el cuerpo humano

Drante el periodo de embarazo, el lumen intestinal permanece estéril y posee una baja tensión de oxígeno, esto porque recibe este a través de la placenta. Esta condición cambia a la hora de nacer, debido a que el recién nacido empieza a adquirir una flora que es propia de cada ser humano, a partir de la microbiota fecal materna y este proceso puede incluir probióticos que la madre haya recibido. Los primeros organismos en colonizar los intestinos son las enterobacterias microaerófilas, y consumen el oxígeno restante. El desarrollo de estos organismos provoca una disminución en el potencial de reducción, dando paso a un ambiente favorable para el desarrollo de las bacterias anaerobias de géneros como *bifidobacterium*, *lactobacillus*, *eubacterium* y *streptococcus*. Dicho proceso varía según la vía del parto, que puede darse por medio de cesárea o de forma natural (Hughes y Hoover, 1991; Barreda, 2005).

Posteriormente, se lleva a cabo un fenómeno muy interesante, ya que la leche materna estimula la colonización de ese medio sin oxígeno por una flora muy especial, con un predominio de *Lactobacillus sp.* y de *Bifidobacterium sp.* Esta flora especial cumple muchas funciones, donde destaca por su importancia, la protección del lactante contra una serie de enfermedades en especial una de las más temidas, la diarrea aguda. Es decir, se produce un ambiente en el tubo digestivo que impide que un

enteropatógeno lo colonice mientras el niño es amamantado (Hoover, 1993; Barreda, 2005).

Estas variables en la flora intestinal continuaran dándose a través de los años, dependiendo de muchos factores como la alimentación, estrés, consumo de antibióticos, edad, cambios hormonales y demás, que pueden llegar a desestabilizar el equilibrio poblacional del intestino (Fuller, 1994).

Diferentes beneficios de los probióticos en el cuerpo humano

Los efectos promotores potenciales para la salud adjudicados a las LAB debido a sus propiedades inmunomoduladoras, antagónicas de patógenos y padecimientos gástricos e intestinales, hipolipemiantes, entre otras, han originado un incremento de la investigación con la meta de mejorar procesos de la industria alimentaria (productos fermentados) y médica, y poder entender de mejor manera los mecanismos encargados de ejercer estos efectos benéficos. (Taranto *et al.*, 2005).

Algunos de los muchos efectos positivos conocidos para estos organismos se desarrollan a continuación.

- **Propiedades anticancerígenas**

El cáncer es una enfermedad que afecta el crecimiento y la multiplicación celular, causado principalmente por mutaciones o la activación de ciertos genes que controlan estas funciones (Parvez , 2006).

Los probióticos pueden evadir estas reacciones evitando o disminuyendo la absorción y producción de compuestos mutagénicos y carcinógenos. Muchas de estas sustancias poseen precursores como los radicales libres y a partir

de estos los probióticos inhiben la producción de estas sustancias, evitando el cambio que se da de procarcinógenos a carcinógenos mediante la inhibición de las enzimas que permiten este proceso (Parvez , 2006).

La β -Glucoronidasa, azoreductasa y la nitroreductasa son algunas de estas enzimas que pueden ser inhibidas entre otras cosas por la simple disminución de pH (Vanderhoof y Young, 1998).

Además, se conoce que la presencia de probióticos aumenta la cantidad de citoquinas, que disminuyen el índice mitótico (Hiramaya y Rasfter, 2000).

También se ha comprobado mediante estudios que en ciertos tipos de cáncer, los probióticos muestran un antagonismo con las células tumorales, haciendo la reaparición de la enfermedad mucha más lenta y tardía con respecto a pacientes que no consumieron las bacterias (Parvez , 2006).

- **Mejora del sistema inmune**

Para encontrarse saludable, es sumamente importante mantener el sistema inmune en condiciones ideales de respuesta. Se cree que los microorganismos probióticos poseen la capacidad de aumentar los niveles de respuesta inmune específica y no específica.

Las investigaciones realizadas muestran un aumento de la capacidad fagocítica de las células inmunitarias, además de un incremento en la producción de citoquinas tanto *in vivo* como *in vitro* y el aumento de los niveles de inmunoglobulinas, especialmente la IgA. Siendo los organismos más estudiados los del genero *Lactobacillus spp*, (Arunachalam, 2000).

Además el rendimiento del sistema inmune se ve ligeramente incrementado por acción de los probióticos, disminuyendo las enfermedades asociadas a la inmunodepresión, y permitiendo regular el efecto inmunoinflamatorio en las respuestas de hipersensibilidad (Parvez , 2006).

Es sumamente importante destacar que estas bacterias presentan una gran ventaja, mediando la actividad inmunológica sin provocar alguna respuesta inflamatoria perjudicial (Sanders, 1999).

- **Mejora de la tolerancia a la lactosa**

Normalmente, cuando un organismo deja de consumir leche materna los niveles de lactasa en el sistema digestivo van disminuyendo con el paso del tiempo. Lo cual puede llegar a ocasionar problemas de mala digestión de aquellos alimentos con componentes lácteos y causar la abstención de las personas de ingerirlos, ocasionando así graves padecimientos por falta de calcio (Doménech y Mañé, 2006).

La intolerancia congénita a lactosa es causada por una deficiencia en la enzima b-galactosidasa (b-gal) a nivel intestinal, resultando así en la imposibilidad de digerir este disacárido. Un 70% de la población mundial presenta problemas con la digestión de la lactosa. Los individuos con este padecimiento presentan entre otros síntomas: diarrea, dolor abdominal y producción de gas. Esto debido a que la lactosa no digerida llega al intestino en donde es fermentada por las bacterias del colon dando como resultado la formación de hidrogeno gaseoso (Naidu *et al.*, 1999).

A pesar de que estos individuos presentan problemas al consumir lácteos, el consumo de yogurt no les afecta de tal manera. Esto pasa porque este alimento contiene probióticos que contienen lactasas, las cuales son

liberadas cuando las secreciones biliares lisan la pared bacteriana. Además el yogurt tiene un tránsito intestinal más lento con relación a la leche, ya que es un alimento viscoso con un alto contenido de sólidos, lo que retrasa el vaciado gástrico y por lo tanto favorece la digestión de la lactosa (Shah, 2001; Doménech y Mañé, 2006).

- **Terapia contra la Diarrea**

Uno de los efectos beneficiosos más reconocidos a nivel mundial que se les adjudica a los probióticos, es la habilidad de disminuir la incidencia o duración de los cuadros diarreicos (Sanders, 1999).

La diarrea es un problema que se puede presentar de forma aguda o crónica, por lo que afecta la calidad de vida de la persona que la padece. La causa es variable según la edad, siendo las infecciones gastrointestinales por microorganismos patógenos o enterotoxinas las más frecuentes (Lopez, 2005).

Diversos estudios reflejan que los probióticos pueden ser una terapia complementaria en el tratamiento de la diarrea aguda en los niños, mediante la inhibición de los patógenos entéricos por la secreción de agentes antibacterianos. Además se cree que la competencia por receptores de la mucosa intestinal podría prevenir la adhesión y sobrecrecimiento de bacterias gram negativas aerobias enterotóxicas y virus enteropatogénicos y por lo tanto permitir la adherencia de organismos más beneficiosos a la superficie intestinal. El aumento de la producción de ácidos grasos volátiles y la reducción del pH fecal podrían también jugar un papel muy importante en la inhibición de los organismos enterotóxicos causantes de este mal. La mayoría de estos estudios sobre los probióticos apoyan su eficacia en el

tratamiento de la diarrea aguda. A pesar de esto, no son utilizados ampliamente por los médicos (Kahn *et al.*, 2009).

El comité experto de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) aclaran que cepas probióticas similares pueden tener efectos clínicos distintos, por lo que enfatizan que los resultados beneficiosos observados en una cepa no pueden generalizarse a otras cepas similares (Kahn *et al.*, 2009).

- **Efecto hipocolesterolémico**

Un efecto probiótico importante, con una posible aplicación en el área médico-nutricional, es la capacidad de algunas cepas LAB de reducir el colesterol sérico, que es un compuesto precursor de ácidos biliares y hormonas esteroideas y un componente importante de la membrana celular de los organismos eucariotas superiores (Taranto *et al.*, 2005).

El ser humano, posee dos tercios del colesterol plasmático total esterificado y el restante circula en la membrana de los glóbulos rojos. Las lipoproteínas de baja densidad (LDL) transportan de un 60-70%, las de alta densidad (HDL) el 30% y de 5-10% por las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL). Aún cuando el colesterol es imprescindible para la vida, su exceso es un factor de riesgo en el desarrollo de la aterosclerosis y otras enfermedades coronarias (Taranto *et al.*, 2005).

Una de las explicaciones acerca de la forma de actuar de este sistema natural regulador de colesterol es la actividad de desconjugación y precipitación de los ácidos biliares en presencia de microorganismos probióticos como ciertas cepas de bifidobacterias. Al efectuarse estos

procesos, el colesterol coprecipita con las sales biliares desconjugadas a valores de pH ácidos (3,4 – 5,5), este precipitado es eliminado por la asimilación de las bacterias que lo incorporan a su pared celular o bien debido a su insolubilidad por medio de la excreción (Tahri *et al.*,1997).

A pesar de los avances en el tema, no se conoce aún el modo de acción de los probióticos lipo-reductores ni el mecanismo por el cual reducen colesterol *in vivo*. Según estudios realizados *in vitro* (en medios de cultivo) se cree que el fenómeno podría deberse a la asimilación del compuesto por la bacteria o bien fenómenos físicoquímicos y/o Actividad hidrolasa de sales bilares del probiótico(Taranto *et al.*, 2005).

Bifidobacterium animalis subsp. lactis (BB-12)

Este género fue descubierto hace más de 100 años en las heces de bebés alimentados aún con leche materna, para ser más exactos en 1900. Fueron nombradas *Bacillus bifidus comunis* por Henry Tissier, quien realizó el hallazgo (Hawkins, 1993).

Se pueden hallar en los hábitats de animales y humanos aislándolas de las excretas y otros medios como desagües, caries, miel de abeja y la vagina en caso de humanos (Felis y Dellaglio, 2009).

Caracterizadas por ser bacterias gram-positivas y no formadoras de esporas, además anaerobias, sin flagelos y catalasa negativas. Su diversidad morfológica las caracteriza, presentándose en bacilos cortos y curvados, y bacilos bifurcados en forma de Y y V (Hawkins, 1993; Shah, 1997).

Estos organismos heterofermentativos, degradan la glucosa por la peculiar vía de la fructosa-6-fosfato también llamada “bifid shunt” produciendo así

ácido acético y ácido láctico en una relación molar de 3:2 y en menor cantidad ácido fórmico, etanol y ácido succínico. La enzima clave de este proceso es llamada fructosa-6-fosfoetolasa y es considerada un marcador taxonómico para la familia *Bifidobacteriaceae* (Felis y Dellaglio, 2009).

Dentro de sus condiciones óptimas de desarrollo se puede destacar un ámbito de temperatura que oscila entre 36-38°C y un pH cercano al neutro entre 6-7, presentando serios problemas de crecimiento a valores de pH más ácido o alcalinos (Shah, 1997). Genéticamente hablando poseen un porcentaje de G+C que varía desde 42 hasta 67% (Felis y Dellaglio, 2009).

Como se menciona anteriormente, el género *Bifidobacterium* pertenece al *Phylum* B XIV *Actinobacteria* del dominio *Bacteria*, clase *Actinobacteria*, subclase *Actinobacteridae*, orden *Bifidobacteriales*, familia *Bifidobacteriaceae*. Hasta la fecha forman parte de este género 29 especies, *Bifidobacterium animalis* presenta dos subespecies: *B. animalis subsp. animalis* y *B. animalis subsp. lactis* (Felis y Dellaglio, 2009).

B. lactis se caracteriza por ser capaz de sobrevivir a pH de 3,5 y, a diferencia de otras especies de bifidobacterias, tolera concentraciones bajas de oxígeno, lo que representa una ventaja en su capacidad de adaptación en comparación con las otras especies con las que comparte el ambiente del lumen del colon (Bjorksten *et al.*, 2001).

La caracterización funcional de *Bifidobacterium* Bb12 está refrendada por estudios en seres humanos de todas las edades, desde lactantes a senescentes. Los efectos de su administración están relacionados con el crecimiento de recién nacidos y la ausencia de signos de intolerancia, la modulación de las respuestas inmunes, las modificaciones que induce en la microbiota residente, sus efectos sobre la susceptibilidad, evolución y

prevención de la diarrea aguda, y sobre la aparición de manifestaciones alérgicas en los primeros meses de vida (Bjorksten *et al.*, 2001).



Figura 7. *Bifidobacterium lactis* observados a 100x.

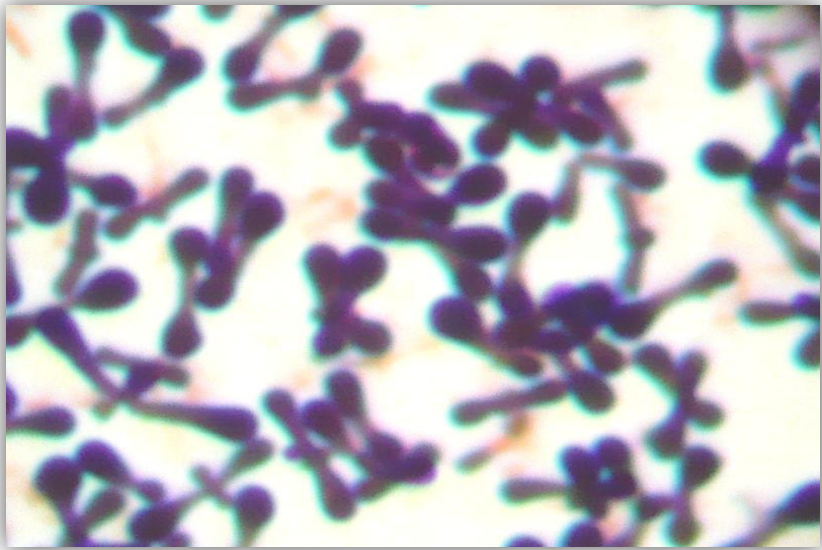


Figura 8. *Bifidobacterium lactis* observados a más de 100x.

3 OBJETIVOS

Objetivo general

Implementar y validar diversos protocolos para el cultivo de los microorganismos “iniciadores” *L. bulgaricus* y *S. thermophilus* y la bacteria probiótica *Bifidobacterium lactis* BB-12, con el fin de evaluar la supervivencia de estos en yogurt y helado en etapas de almacenamiento.

Objetivos específicos

- Implementar y validar un método para la cuantificación de los microorganismos “iniciadores” *L. bulgaricus* y *S. thermophilus*.
- Determinar la supervivencia de los microorganismos starters *L. bulgaricus* y *S. thermophilus* en yogurt y helado a lo largo de su vida de anaquel en almacenamiento, utilizando el método implementado y validado.
- Evaluar estadísticamente el nuevo método propuesto por CHR HANSEN en comparación con el anterior, para determinar cuál de los dos presenta mejores resultados en términos de cuantificación de *B.lactis*.

4 METODOLOGÍA

El presente trabajo de investigación fue desarrollado en las instalaciones del Laboratorio de Microbiología y el Laboratorio de Química de la Cooperativa de Productores de Leche Dos Pinos R.L., ubicado en la planta del Coyol de Alajuela, durante un periodo comprendido entre el 18 de febrero y el 15 de agosto del 2009.

Este estudio consta de un análisis de viabilidad de los cultivos iniciadores *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* y *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus* en 4 muestras en almacenamiento bajo los lineamientos de ISO 7889 – IDF 117. Anterior a este análisis fue necesario realizar una validación de los protocolos presentes en esta norma, para efectos de este proyecto la validación refiere a un estudio de repetibilidad, reproducibilidad y veracidad (recuperación del medio).

Además, mediante diversas pruebas se llevó a cabo una comparación de los protocolos “*L.acidophilus, L.casei* and *Bifidobacteria* in fermented milk products-guideline (CHR-Hansen,2001)” y “Enumeration of *Bifidobacteria* in fermented milk products-guideline (CHR-Hansen,2001)” propuestos por CHR-Hansen para el estudio de *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* BB-12; escogiendo y validando el que resultó más adecuado según las necesidades de la empresa.

4.1 Validación e implementación de un método de trabajo para la cuantificación de los cultivos “iniciadores” *L. bulgaricus* y *S. thermophilus*.

4.1.1 Medio MRS Acidificado

Se preparó el medio MRS (OXOID CM0361 (Anexo 1)) según indicaciones de fabricante, una vez disuelto se dejó enfriar por unos minutos para poder realizar el ajuste de pH. Con ácido acético glacial se acidificó hasta un valor entre 4,5 y 4,6. El pHmetro utilizado fue previamente calibrado con los buffer de pH 4,0 y 7,0 respectivamente. Una vez establecido el pH, se autoclavó el medio y posterior a esto se comprobó que el pH estuviera dentro del ámbito antes mencionado.

En la incubación se utilizaron jarras de anaerobiosis OXOID con una capacidad de 2.5L. Para la generación de la atmosfera anaeróbica se utilizaron los sobres de AnaeroGen™ marca OXOID, junto con los indicadores de anaerobiosis OXOID.

ISO 7889 – IDF 117 recomienda realizar la incubación a 37°C, sin embargo en la presente investigación se incubó a 42°C ± 1°C durante 72 horas debido a problemas de selectividad.

Una vez concluido el periodo de incubación, para la lectura de las placas se tomaron en cuenta todas las diluciones que presentaron un ámbito contable de colonias de 15 a 300. Posteriormente se realizó una tinción Gram de varias de las colonias en la placa, con lo que se comprobó mediante el análisis microscópico la presencia de bacilos semejantes a *L.bulgaricus*.

4.1.2. Medio M17

El medio M17 fue preparado de acuerdo con las indicaciones brindadas por el fabricante (OXOID CM0785). Posterior a la esterilización, se comprobó que el pH estuviera en un valor de $6,8 \pm 0,2$.

Inmediatamente antes de utilizar el medio, se adicionaron 50 mL de una solución de lactosa estéril por cada 950 mL de medio M17 preparado.

Se incubó en una cámara a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 48 horas.

Para la lectura de placas se tomaron en cuenta las colonias presentes en las diluciones que presentaron un ámbito contable de 15 – 300. Además se realizó una tinción Gram de varias de las colonias en la placa, buscando cocos Gram positivos semejantes a *S.thermophilus*.

4.1.3 Pruebas para encontrar la dilución correspondiente a cada muestra

Se utilizaron 4 productos de la Cooperativa de Productores de Leche Dos Pinos R.L. con la presencia de los microorganismos “Iniciadores”, los cuales se pueden observar el cuadro 1.

Cuadro 1. Muestra correspondiente a cada producto utilizado en el estudio de los cultivos iniciadores.

Muestra	Producto	Tipo
A	Deligurt	Líquido
B	Yogurt	Batido
C	Helado de yogurt	Helado
D	Paleta de yogurt	Helado

Inmediatamente después del tiempo de esterilización de los medios se prepararon las diluciones de prueba para cada muestra, para lo cual se realizaron diluciones seriadas desde 10^{-1} hasta 10^{-7} . Para realizar estas diluciones se utilizaron botellas de agua peptonada bufferizada (APEB 1%) de 99 mL, de manera que en la dilución primaria fueron adicionados con una paleta estéril 11 gramos del producto a una botella previamente rotulada con la muestra correspondiente y la dilución, en este caso " 10^{-1} " (1/10). Para realizar una dilución " 10^{-2} " (1/100) se tomo 1 mL de la dilución " 10^{-1} " y se adicionó a un tubo de ensayo con APEB 1% conteniendo 9 mL. Así se realizaron diluciones decimales seriadas hasta " 10^{-7} ".

Una vez listas las diluciones de 10^{-2} hasta 10^{-7} se procedió a inocular por duplicado en las placas petri desechables previamente rotuladas, vertiendo 1 mL de cada dilución y posterior a esto se vertieron aproximadamente 15 ml de medio por placa petri, agitando de manera cuidadosa pero asegurándose de que el inóculo quedara bien distribuido. Luego se dejó solidificar el medio de por unos minutos.

Las pruebas para la búsqueda de estas diluciones fueron realizadas simultáneamente para cada una de las muestras y medios.

4.1.4 Validación para el medio MRS acidificado y M17 para la enumeración y análisis de L.bulgaricus y S.thermophilus respectivamente.

Repetibilidad

Para determinar la repetibilidad de ambos protocolos (medios) se utilizaron dos diluciones para cada muestra en estudio según lo encontrado en el apartado 4.1.3 y se realizaron 10 repeticiones por dilución.

Se inoculó cada una de las placas petri con 1ml de la respectiva repetición de la dilución. Se vertieron aproximadamente 15 mL por placa petri, agitando cuidadosamente para que el inóculo quedara bien distribuido. Por último se dejó solidificar el medio por unos minutos y se puso a incubar según el medio en cuestión.

Para determinar la repetibilidad se aplicó la fórmula de desviación estándar a los resultados obtenidos en forma de logaritmo y el dato derivado fue comparado con el valor de referencia de 0.20 unidades de logaritmo presentado en ISO 7889 – IDF 117.

Reproducibilidad

La reproducibilidad, en términos de precisión intermedia, fue evaluada mediante un análisis independiente por tres analistas. Cada uno realizó un total de 2 repeticiones (dos diluciones por repetición) por muestra, las cuales fueron plaqueadas por duplicado, para un total de 8 placas por persona.

A los resultados obtenidos se les determinó la desviación estándar. El resultado fue comparado con el dato teórico brindado por ISO 7889 – IDF 117 cuyo valor es 0.35 unidades de logaritmo y de esta manera se evaluó la reproducibilidad de la técnica.

Veracidad

En el estudio de la veracidad de los protocolos, fue utilizado un estándar de McFarland de 0.5, equivalente a $1,5 \times 10^8$ U.F.C/mL. De esta manera, en un tubo de 5 mL conteniendo agua destilada estéril se preparó la suspensión

bacteriana tomando como patrón el estándar de 0.5 comparando la solución con una tarjeta con patrones.

Las bacterias utilizadas para la suspensión fueron procedentes de aislamientos de cultivos de ambas bacterias, tanto *L.bulgaricus* como *S.thermophilus*.

Una vez listas las suspensiones, se procedió a realizar las respectivas diluciones, que en este caso fueron 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} y 10^{-7} , para después sembrar por duplicado cada una de ellas en los medios MRS(pH 4,6) y M17 para *L.bulgaricus* y *S.thermophilus* respectivamente. Además se sembró de igual forma en los medios MRS y RT como control.

Con los resultados obtenidos se pudo determinar la capacidad de recuperación de cada uno de los protocolos (Con MRS acidificado y con M17)

Análisis de Resultados

Para establecer un valor a partir del conteo de colonias en placas se utilizó la fórmula:

$$N = \frac{\sum C}{(n_1 + 0.1n_2)d}$$

Donde:

“N” es el valor numérico de los microorganismos característicos por gramo de la muestra en estudio.

“ ΣC ” es el valor numérico de la sumatoria de todas las colonias en todas las placas. Se tomaron en cuenta solo las placas con valores entre 15- 300 colonias.

“ n_1 ” es el valor numérico del número de placas contadas usando la primera dilución

“ n_2 ” es el valor numérico del número de placas contadas usando la segunda dilución.

“ d ” es el valor numérico de la masa, en gramos, de la muestra no diluida presente en la placa con la primera dilución.

Al resultado proveniente de esta fórmula se le determinó su respectivo valor en logaritmo con base 10 y se utilizó de esta manera en los cuadros de resultados.

Además para determinar la repetibilidad se calculó la desviación estándar(S):

$$\sqrt{s^2} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

4.2 Estudio de viabilidad de los cultivos “iniciadores” en yogurt y helado a lo largo de su vida útil (de anaquel) utilizando el protocolo implementado y validado.

Una vez finalizada la validación de los métodos de ensayo, se realizó el análisis de viabilidad de los “iniciadores” en las muestras A, B, C y D (Cuadro 1) siguiendo la misma metodología descrita en la parte de validación.

Para cada muestra se sembraron por duplicado 2 diluciones según el ámbito contable (15-300 colonias) de estas, encontrado en las pruebas realizadas anteriormente.

De esta forma se realizó un análisis cada semana durante la vida de anaquel de 7 semanas determinada por la empresa para los yogures “deligurt” y “yogurt batido” y por 7 y 9 semanas para la “Paleta de Yogurt” y para el “Helado de Yogurt Inline” respectivamente.

Los resultados fueron analizados y expresados en cuadros de resumen. Luego se elaboró el gráfico respectivo por muestra, que expresa la viabilidad de *L. bulgaricus* y *S. thermophilus* con el paso de las semanas, tomando en cuenta la disminución de la cantidad de estas bacterias iniciadoras presentes en el producto al final de su vida de anaquel y si estas se encontraban o no en la cantidad requerida según lo esperado por la norma INTE 02-03-07-06.

4.3 Validación de un protocolo para la cuantificación de Bifidobacterium animalis subsp. lactis BB-12, escogido mediante la comparación (de diversos factores) entre dos protocolos propuestos por CHR HANSEN.

Se utilizaron 2 productos de la Cooperativa de Productores de Leche Dos Pinos R.L. con la presencia de “*Bifidobacterium lactis* (BB-12)”, los cuales se pueden apreciar en el cuadro 2.

Cuadro 2. Características de cada una de las muestras utilizadas en la búsqueda de un protocolo para el cultivo de *Bifidobacterium lactis*.

Muestra	Producto	Tipo	Cant. Bact,
A	Deligurt Inline	Líquido	$>10^6$ UFC/ mL
B	Petit Suisse	Endurecido	$>10^6$ UFC/ g

4.3.1 Preparación de las soluciones

Mupirocina

Para preparar la solución Stock se pesaron en una balanza analítica 100 mg de Mupirocina CRS.PHEUR en un tubo de ensayo por cada 10 mL de agua destilada estéril. Posteriormente se esterilizó con un filtro Whatman® Puradisc™ 25mm de 0.2µm y se almacenó en un tubo eppendorf Fisherbrand® estéril de centrifuga a -20°C, donde puede permanecer por un espacio de 2 meses sin perder propiedades.

Dicloxalina

La elaboración de la solución de dicloxalina se llevó a cabo en una balanza analítica según la proporción 10 mg dicloxalina SIGMA D9016-1G por cada 100 mL de agua destilada estéril. Seguidamente se esterilizó por filtración (Filtro Whatman® Puradisc™ 25mm de 0.2µm) y se depositó en un tubo eppendorf Fisherbrand® estéril de 50ml almacenándola a 3°C durante 2 semanas.

Cloruro de Litio (LiCl)

Se preparó la solución pesando 2 g de LiCl SIGMA 213233-100G en una balanza analítica y adicionando 18 g de agua destilada estéril. Se agitó vigorosamente hasta lograr que se disolviera completamente. Una vez listo, se procedió a esterilizar por medio de un filtro de 0.2 μm antes mencionado y fue almacenado en un tubo estéril de 50 mL a 3°C por un máximo de 2 semanas.

Hidrocloruro de Cisteína (CyHCl)

Para la obtención de la solución de Hidrocloruro de Cisteína se elaboró al 10% utilizando el reactivo CyHCl SIGMA C9768-10G y agua destilada estéril. La esterilización y almacenamiento de esta se llevó a cabo de la misma forma que la solución de LiCl.

4.3.2 Pruebas para la escogencia de un protocolo

Para la escogencia del protocolo más adecuado para trabajar este tipo de análisis, se realizaron 3 pruebas con las muestras descritas en el Cuadro 2. Cada una de estas pruebas se llevó a cabo con los protocolos 1 y 2 (descritos más adelante) de forma paralela con las diluciones 10^{-4} , 10^{-5} y 10^{-6} , las cuales fueron plaqueadas por duplicado.

Protocolo 1(MRS + CyHCl + LiCl + Dicloxacilina)

El protocolo 1 se desarrolló según la metodología aportada por CHR-HANSEN con el nombre de “*L.acidophilus, L. casei and Bifidobacteria* in fermented milk products – Guideline (CHR-Hansen, 2001)”.

La preparación del medio MRS (OXOID CM0361 (Anexo 1)) fue realizada según las instrucciones del fabricante. Posterior a la esterilización de este, se dejó enfriar en un baño de agua a temperatura ambiente hasta unos 40°C; inmediatamente antes de su uso fueron adicionados por cada litro de medio 5 mL de la solución de CyHCl, 5ml de la solución de Dicloxacilina y 10ml de la de LiCl.

Seguidamente se agitó vigorosamente para que se homogenizaran todos los componentes y se vertieron aproximadamente 15 mL de medio en cada una de las placas petri previamente rotuladas e inoculadas por 1 mL las diluciones 10^{-5} , 10^{-6} y 10^{-7} de las muestras a usar. Para efectos de comparación el plaqueo de cada una de las diluciones fue realizado por duplicado.

Se procedió a colocar las placas en la jarra de anaerobiosis, con AnaeroGen™ OXOID y su respectivo indicador de anaerobiosis OXOID. Una vez lista la jarra, se cerró de forma inmediata y se incubó durante 72 horas a 42°C.

Antes de realizar la lectura de las placas, se realizó una tinción Gram de varias de las colonias en la placa, buscando bacilos Gram positivos semejantes a *Bifidobacterium lactis*. Una vez confirmado este tipo de morfología en las bacterias procedentes de las colonias en la placa, se

procedió a realizar el conteo, tomando en cuenta todas aquellas colonias presentes en un ámbito de 15 - 300.

Protocolo 2(MRS-MUP) (MRS + CyHCl + Mupirocina)

Para el desarrollo del protocolo 2 se ejecutó según la metodología aportada por CHR- HANSEN con el nombre de “Enumeration of Bifidobacteria in fermented milk products – Guideline (CHR-Hansen, 2001)”.

Una vez concluida la esterilización del medio MRS (OXOID CM0361 (Anexo 1)), se colocó en un baño de agua a temperatura ambiente para enfriar hasta unos 40°C. Fueron adicionados por cada litro de medio 2,5 mL de Mupirocina y 5 mL de CyHCl inmediatamente antes de su uso.

Agitando continuamente fueron homogenizadas con el medio las soluciones antes adicionadas, seguidamente en cada una de las placas petri se vertieron aproximadamente 15ml de medio. Se inocularon las placas con 1 mL de las diluciones 10^{-5} , 10^{-6} y 10^{-7} de las muestras. Cada uno de los plaques de las diluciones fue montado por duplicado.

Se colocó una bolsa de AnaeroGen™ OXOID con su respectivo indicador de anaerobiosis en la jarra anaerobia para la incubación de las placas por 72 horas a 37 °C.

Al salir del periodo de incubación, fue realizada una tinción Gram de las colonias de diversas placas, tomando en cuenta las más diferentes entre sí. Esto para comprobar que todas las colonias presentes en todas las placas presentaran como única bacteria un bacilo Gram positivo de forma similar a *Bifidobacterium lactis*. Posterior a la comprobación, se llevó a cabo el conteo

de todas las placas que presentaron colonias en un ámbito de 15-300 colonias.

4.3.3 Validación del protocolo 2 (MRS + CyHCl + Mupirocina)

Repetibilidad

Para realizar la repetibilidad de este protocolo se usaron las dos diluciones dentro el ámbito contable (15-300) y se realizaron 10 repeticiones simultaneas por dilución para cada una de las muestras en estudio.

Se siguió bajo las mismas instrucciones dadas en el estudio de repetibilidad de los “*Cultivos iniciadores*”, usando las diluciones con ámbitos contables encontradas en el punto 3.3.2 para cada muestra.

La incubación se llevó a cabo en anaerobiosis durante 72 horas a 37 °C, como lo expresa el protocolo.

A los resultados obtenidos, se les determinó la desviación estándar. El resultado de esta fue comparado con el dato teórico de 0,12 y 0,20 unidades de logaritmo para las muestras líquidas y firmes respectivamente. (IDF 411).

Reproducibilidad

Al igual que en el estudio de los “*Cultivos Iniciadores*” la reproducibilidad, en términos de precisión intermedia, fue evaluada mediante un análisis independiente por tres analistas. Fueron elaboradas 2 repeticiones por muestra (A), de las cuales se sembraron dos diluciones (10^{-5} y 10^{-6}) y por duplicado, para un total de 8 placas por persona.

Los resultados obtenidos del conteo de cada analista fueron evaluados en conjunto mediante la desviación estándar. El resultado obtenido se comparó con límite de reproducibilidad de 0.39 unidades de logaritmo para muestras líquidas (IDF 411).

Veracidad

Un estándar de McFarland de 0.5, equivalente a $1,5 \times 10^8$ U.F.C/ml fue utilizado en este estudio. Posteriormente se preparo la suspensión bacteriana en un tubo de 5 mL conteniendo agua destilada estéril, tomando como patrón el estándar de 0.5.

El cultivo de *Bifidobacterium lactis* usado para tomar las colonias fue purificado por medio de un rayado.

Con las suspensiones listas, se realizaron las diluciones de 10^{-4} , 10^{-5} y 10^{-6} , para después sembrar en los medios MRS, RT y MRS+Mup+CyHCl por duplicado cada una de ellas.

5 RESULTADOS

5.1 Validación e implementación de un método de trabajo para la cuantificación de los cultivos “iniciadores” *L. bulgaricus* y *S. thermophilus*.

Resultado de la búsqueda de diluciones a utilizar para cada muestra.

En el cuadro 3 se encuentran plasmados los resultados obtenidos a partir de las pruebas para determinar las diluciones a utilizar durante el análisis.

Cuadro 3. Conteo para las diluciones utilizadas en la prueba para cada medio.

Muestra	A		B		C		D	
	Deligurt		Yogurt batido		Helado Yogurt		Paleta Yogurt	
Diluciones	M17	MRS	M17	MRS	M17	MRS	M17	MRS
10^{-2}	Inc	240/264	Inc	Inc	Inc	Inc	Inc	386/375
10^{-3}	Inc	33/39	Inc	Inc	Inc	128/142	Inc	49/39
10^{-4}	Inc	3/2	Inc	291/285	Inc	14/9	Inc	3/3
10^{-5}	Inc	-	Inc	43/47	Inc	0/1	Inc	-
10^{-6}	620/616	-	400/412	-	148/122	-	110/103	-
10^{-7}	59/63	-	54/62	-	12/16	-	16/11	-

Repetibilidad

A partir del análisis de repetibilidad aplicado para la validación en la enumeración de *L.delbrueckii subsp. bulgaricus* en Medio MRS acidificado a pH 4.6 se obtuvieron los datos expresados a continuación en el cuadro 4, en donde se encuentran resumidos.

Cuadro 4. Análisis de repetibilidad para cada una de las muestras utilizadas en el estudio de *L.delbrueckii subsp. bulgaricus* en medio MRS acidificado(pH 4,6).

Muestra	A			B			C			D		
	Deligurt Arandano			Yogurt Topping			Helado Yogurt			Paleta Yogurt		
Diluciones	10^{-2}	10^{-3}	Log UFC/g	10^{-4}	10^{-5}	Log UFC/g	10^{-3}	10^{-4}	Log UFC/g	10^{-2}	10^{-3}	Log UFC/g
Repetición												
1	99	2	4.00	296	42	6.49	145	10	5.16	64	4	3.81
2	78	4	3.89	285	47	6.48	115	14	5.06	40	7	3.60
3	74	2	3.87	296	42	6.49	128	12	5.11	63	6	3.80
4	74	2	3.87	279	54	6.48	142	19	5.16	50	6	3.70
5	80	3	3.90	289	43	6.48	123	14	5.09	62	9	3.79
6	99	5	4.00	293	47	6.49	127	21	5.13	51	4	3.71
7	61	0	3.79	299	45	6.50	128	18	5.12	40	6	3.60
8	45	2	3.65	276	45	6.47	141	11	5.15	45	6	3.65
9	42	1	3.62	272	50	6.47	119	12	5.08	61	12	3.79
10	35	4	3.54	268	40	6.45	127	17	5.12	52	5	3.72
Promedio(X)	3.81 Log			6.48 Log			5.12 Log			3.72 Log		
Desv.Std(S _r)	0.16			0.01			0.04			0.08		

En este cuadro se observa que para la muestra A se obtuvo una S_r de aproximadamente 0.16 unidades de logaritmo(Log), siendo esta la más variable de todas las muestras; sin embargo se encuentra dentro del máximo permitido que según ISO 7889 – IDF 117 es 0.20 Log, por lo que se puede catalogar como una repetibilidad aceptable. Para las muestras B, C y D se obtuvieron los valores de 0.01 Log, 0.04 Log y 0.08 Log respectivamente, lo cual nos indica que se encuentran muy por debajo del valor teórico antes mencionado y por lo tanto poseen una repetibilidad excelente.

Para lo que respecta a *S.thermophilus* el cuadro 5 indica los datos provenientes de su respectivo estudio, en donde se obtuvieron resultados satisfactorios en cuanto a la S_r de cada producto. Las muestras A, B y D presentaron una desviación de 0.06, 0.04 y 0.06 Log respectivamente, por lo

que son consideradas repetibilidades excelentes. Por otra parte la muestra C presentó una S_r de 0.11 Log, siendo esta la más cercana al límite de 0.20 Log establecido previamente. A pesar de esto sigue siendo un valor muy favorable para la validación del protocolo con dicha muestra.

Cuadro 5. Estudio de repetibilidad para cada una de las muestras utilizadas en la enumeración de *S.thermophilus* en Medio M17 complementado con lactosa.

Muestra	A			B			C			D		
	Deligurt InlineFres			Yogurt batido			Helado Yogurt			Paleta Yogurt		
Diluciones	10^{-6}	10^{-7}	Log	10^{-6}	10^{-7}	Log	10^{-6}	10^{-7}	Log	10^{-6}	10^{-7}	Log
Repetición			UFC/g			UFC/g			UFC/g			UFC/g
1	624	60	8.78	352	59	8.77	149	17	8.18	120	16	8.09
2	560	61	8.79	468	45	8.65	174	12	8.24	103	10	8.01
3	624	77	8.89	404	54	8.73	122	13	8.09	132	9	8.12
4	592	86	8.93	376	58	8.76	102	17	8.03	92	11	7.96
5	632	63	8.80	412	62	8.79	116	13	8.06	91	7	7.96
6	584	71	8.85	364	56	8.75	73	9	7.86	108	14	8.03
7	528	81	8.91	452	65	8.81	111	8	8.05	100	10	8.00
8	624	62	8.79	520	54	8.73	121	2	8.08	105	9	8.02
9	632	70	8.85	368	55	8.74	91	10	7.96	103	9	8.01
10	568	74	8.87	356	51	8.71	125	17	8.11	89	9	7.95
Promedio(X)	8.85 Log			8.75 Log			8.07 Log			8.02 Log		
Desv.Std(S_r)	0.06			0.04			0.11			0.06		

Reproducibilidad

El estudio de reproducibilidad fue desarrollado por tres analistas (RAA, CCV y JJR), cuyos resultados aparecen en el cuadro 6 y cuadro 7; para *L.delbrueckii subsp. bulgaricus(Lb)* y *S.thermophilus(St)* respectivamente. Se puede observar una buena reproducibilidad para ambos protocolos; obteniendo una S_{RLb} de aproximadamente 0.02Log (unidades de logaritmo) y una S_{RSt} de 0.04Log. Esto en comparación con la desviación estándar esperada según ISO 7889 –IDF 117 que es de 0.35Log.

Cuadro 6. Estudio de reproducibilidad para la enumeración y análisis de *L.delbrueckii subsp. bulgaricus* en medio MRS acidificado(pH 4,6).

Analista	RAA			CCV			JJR		
Muestra	Yogurt batido Fresa Lote:153 Hora:02:02 T:6103								
Diluciones	10^{-4}	10^{-5}	Log	10^{-4}	10^{-5}	Log	10^{-4}	10^{-5}	Log
Repetición			UFC/g			UFC/g			UFC/g
1	249	32	6.41	269	43	6.45	263	34	6.43
	264	32	6.43	253	29	6.41	240	32	6.39
2	246	33	6.40	257	31	6.42	256	28	6.41
	263	28	6.42	252	27	6.40	256	30	6.41
Promedio(X)	6.42 Log			6.42 Log			6.41 Log		
Desv.Std(S_r)	0.0122			0.0220			0.0157		
Promedio(X_R)	6.42 Log								
Dev.Std(S_R)	0.02								

Cuadro 7. Estudio de reproducibilidad para la enumeración y análisis de *S.thermophilus* en Medio M17 complementado con lactosa.

Analista	RAA			RH			JJR		
Muestra	Deligurt Fresa 750ml Lote:89 Hora: 11:19 T:6104								
Diluciones	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	Log	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	Log	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	Log
Repetición			UFC/g			UFC/g			UFC/g
1	Inc	92	8.96	Inc	109	9.04	Inc	98	8.99
	Inc	101	9.00	Inc	78	8.89	Inc	107	9.03
2	Inc	93	8.97	Inc	92	8.96	Inc	85	8.93
	Inc	82	8.91	Inc	97	8.99	Inc	95	8.98
Promedio(X)	8.96 Log			8.97 Log			8.98 Log		
Desv.Std(S _i)	0.0372			0.0604			0.0413		
Promedio(X _R)	8.97 Log								
Dev.Std(S _R)	0.04								

Veracidad

En la determinación de la veracidad de cada protocolo, o en otras palabras la capacidad de recuperación del microorganismo en el medio, se obtuvo que para *S.thermophilus* se recuperó $4,5 \times 10^7$ U.F.C cuando en realidad se esperaba un valor que rondara los $1,5 \times 10^8$ U.F.C debido al estándar de Mcfarland de 0.5 utilizado para la prueba en cuestión. En los medios de RT y MRS no hubo crecimiento bacteriano.

En cuanto a la recuperación de *L.bulgaricus* con el medio MRS acidificado (pH 4,6), se encontró que este medio recuperó $9,1 \times 10^6$ U.F.C, por lo que está aún lejos del valor teórico esperado. Para este mismo organismo, en el medio MRS sin acidificar (estándar) se obtuvieron $8,0 \times 10^6$ U.F.C, y en el RT no hubo crecimiento.

Cuadro 8. Resultados de prueba de veracidad efectuada a los dos protocolos utilizados en el presente estudio.

Medios	<i>S.thermophilus</i>			<i>L.bulgaricus</i>		
	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}
M17	395	43	6	-	-	-
	439	46	7	-	-	-
•MRSac	-	-	-	Inc	89	6
	-	-	-	Inc	93	12
*MRS	0	0	0	Inc	88	11
	0	0	0	Inc	71	11
RT	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0
U.F.C	$4,5 \times 10^7$			$\bullet 9,1 \times 10^6$ *8,0 $\times 10^6$		
U.F.C Teórico	$1,5 \times 10^8$			$1,5 \times 10^8$		

5.2 Estudio de viabilidad de los cultivos “iniciadores” en yogurt y helado a lo largo de su vida útil utilizando protocolos implementados y validados.

Los resultados encontrados en el análisis de viabilidad de los microorganismos “Iniciadores” en los 4 productos de la Cooperativa de Productores de Leche Dos Pinos R.L. (Cuadro 9) utilizados para este estudio se encuentran a continuación en forma resumida.

Cuadro 9. Productos utilizados a lo largo de todo el análisis de viabilidad.

Muestra	Producto	Lote	Hora	Tanque	Vence	Duración del análisis
A	Deligurt Fresa 200mL	167	10:24	6101	26/7/09	7 semanas
B	Yogurt Fresa 150 g	167	08:45	6103	31/7/09	7 semanas
C	Helado de Yogurt Fresa 550 g	135	-	-	13/9/09	9 semanas
D	Paleta de Yogurt Mora 50 g	139	-	-	19/9/09	8 semanas



Figura 9. Muestras a utilizar durante el análisis, descritas en el cuadro 9.

Muestra A

Para el Deligurt de Fresa de 200 mL descrito como la muestra A (Cuadro 10) durante el estudio se obtuvo una disminución en la cantidad de *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* desde la primer semana 3.41 Log a la semana siete 2.52 Log , lo cual indica que la cantidad de bacterias viables se redujo casi 1.0 Log. Por otra parte para *S.thermophilus* se encontró un descenso no significativo que fue desde 9.04 Log en la semana uno a 8.91 Log en la séptima semana.

Con los anteriores resultados, a pesar de las reducciones observadas, se comprobó que los microorganismos “starters” en la muestra A se encuentran al final de su vida útil en una cantidad que excede a 1.0×10^7 U.F.C por gramo o mililitro. Siendo esta cantidad el mínimo exigido por la norma INTE 02-03-07-06 para el yogurt o productos elaborados a base de este.

Cuadro 10. Estudio de viabilidad de los microorganismos “starters” en la muestra A (Deligurt Fresa) durante las 7 semanas de su vida útil.

Iniciador	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> <i>subsp. bulgaricus</i>					<i>Streptococcus</i> <i>thermophilus</i>				Total de Iniciadores	
	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	UFC/g	Log UFC/g	10^{-6}	10^{-7}	UFC/g	Log UFC/g	UFC/g	Log UFC/g
1	-	24	1	2.6×10^3	3.41	Inc	109	1.1×10^9	9.04	1.1×10^9	9.04
	-	27	3			Inc	111				
2	-	32	1	3.4×10^3	3.53	Inc	100	1.0×10^9	9.01	1.0×10^9	9.01
	-	35	4			Inc	104				
3	-	16	0	1.9×10^3	3.28	Inc	97	1.0×10^9	9.02	1.0×10^9	9.02
	-	22	2			Inc	112				
4	-	12	3	1.5×10^3	3.18	Inc	119	1.2×10^9	9.08	1.2×10^9	9.08
	-	18	0			Inc	120				
5	-	3	0	5.5×10^2	2.74	Inc	95	9.3×10^8	8.98	9.3×10^8	8.98
	-	8	2			Inc	98				
6	47	9	-	4.3×10^2	2.63	Inc	87	9.0×10^8	8.95	9.0×10^8	8.95
	38	2	-			Inc	92				
7	35	4	-	3.3×10^2	2.52	Inc	84	8.2×10^8	8.91	8.2×10^8	8.91
	31	6	-			Inc	79				

Muestra B

Cuadro 11. Estudio de viabilidad de los microorganismos Starters en la muestra B (Yogurt Topping Chocolate) durante las 7 semanas de su vida útil.

Iniciador	<i>Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus</i>				<i>Streptococcus thermophilus</i>				Total de Iniciadores	
	10^4	10^5	UFC/g	Log UFC/g	10^6	10^7	UFC/g	Log UFC/g	UFC/g	Log UFC/g
1	201	25	2.1×10^6	6.33	Inc	114	1.1×10^9	9.03	1.1×10^9	9.03
	219	23			Inc	100				
2	270	38	2.7×10^6	6.43	Inc	100	1.14×10^9	9.05	1.14×10^9	9.05
	261	26			Inc	125				
3	299	44	3.1×10^6	6.48	Inc	91	8.1×10^8	8.91	8.1×10^8	8.91
	297	32			Inc	70				
4	297	31	3.0×10^6	6.48	Inc	89	8.4×10^8	8.92	8.4×10^8	8.92
	295	36			Inc	78				
5	263	17	2.5×10^6	6.40	Inc	47	4.1×10^8	8.61	4.1×10^8	8.61
	251	23			Inc	35				
6	164	9	1.7×10^6	6.24	268	35	2.8×10^8	8.44	2.8×10^8	8.44
	180	12			271	31				
7	77	9	8.2×10^5	5.91	279	33	2.7×10^8	8.43	2.7×10^8	8.43
	86	7			240	42				

En el cuadro 11 podemos observar los datos resumidos derivados del estudio de viabilidad de “Iniciadores” para la muestra B, que se trató de un yogurt batido de fresa. En dicho resumen se aprecia una disminución de la cantidad de *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* presente en el producto, pasando de 6.33 Log en la primer semana a 5.91 Log en la sétima.

De la misma forma, para *S.thermophilus* se determinó una baja en la cantidad de bacterias viables, demostrado por la diferencia dada entre la

primer semana (9.03 Log) y la última semana (8.43 Log). Sin embargo la suma de la cantidad de ambos microorganismos presentes en la muestra supera por más de 1.0 Log la cantidad requerida de 1.0×10^7 U.F.C.

Muestra C

Cuadro 12. Estudio de viabilidad de los microorganismos Starters en la muestra C (Helado Yogurt Fresa) durante 7 semanas.

Iniciador	<i>Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus</i>				<i>Streptococcus thermophilus</i>				Total de Iniciadores	
	10^{-2}	10^{-3}	UFC/g	Log UFC/g	10^{-6}	10^{-7}	UFC/g	Log UFC/g	UFC/g	Log UFC/g
1	49	3	$5,3 \times 10^3$	3,72	192	18	$1,9 \times 10^8$	8,27	$1,9 \times 10^8$	8,27
	57	5			185	18				
2	218	12	$2,1 \times 10^4$	4,32	191	15	$1,9 \times 10^8$	8,28	$1,9 \times 10^8$	8,28
	207	18			195	17				
3	248	25	$2,6 \times 10^4$	4,42	168	16	$1,7 \times 10^8$	8,22	$1,7 \times 10^8$	8,22
	271	31			165	17				
4	Inc	48	$5,3 \times 10^4$	4,72	175	15	$1,7 \times 10^8$	8,24	$1,7 \times 10^8$	8,24
	Inc	57			168	23				
5	Inc	96	$1,2 \times 10^5$	5,06	147	21	$1,6 \times 10^8$	8,21	$1,6 \times 10^8$	8,21
	Inc	136			162	27				
6	250	22	$2,7 \times 10^4$	4,43	168	29	$1,8 \times 10^8$	8,25	$1,8 \times 10^8$	8,25
	300	22			179	18				
7	Inc	33	$3,3 \times 10^4$	4,51	153	15	$1,4 \times 10^8$	8,15	$1,4 \times 10^8$	8,15
	Inc	32			121	21				
8	80	13	$8,3 \times 10^3$	3,92	146	16	$1,5 \times 10^8$	8,18	$1,5 \times 10^8$	8,18
	86	12			150	19				
9	255	30	$2,6 \times 10^4$	4,42	130	13	$1,3 \times 10^8$	8,10	$1,3 \times 10^8$	8,10
	264	28			121	8				
Final vida útil	Inc	406	$4,1 \times 10^5$	5,62	117	15	$1,4 \times 10^8$	8,13	$1,4 \times 10^8$	8,13
	Inc	420			136	31				

Para el helado de yogurt de fresa (Muestra C), una vez concluido el tiempo de análisis, se determinó un aumento en la cantidad de *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* como se puede observar en el cuadro 12, en donde paso de 3.72 *Log*(semana 1) a 4,42 *Log* en la novena, mostrando un pico en la quinta semana de 5.06 *Log*.

Por el contrario, el recuento de colonias para *S.thermophilus* a lo largo del estudio demostró un leve descenso en la población de bacterias viables presentes en la muestra. Siendo el resultado más bajo el de la novena semana con 8.10 *Log* con una diferencia de 0.17 *Log* con respecto a la semana de inicio (8.27 *Log*).

Muestra D

En el análisis de la paleta de yogurt de mora identificada como muestra D se encontraron resultados similares a los del helado de yogurt de fresa, mostrando un aumento de *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* de la semana de inicio(4.48 *Log*) hacia la mitad del periodo de análisis en la semana 3 donde se pudo observar un pico (5.18 *Log*), para luego volver a descender hasta 4,38 *Log* en la semana 7, tal y como se puede apreciar en el cuadro 13. A la vez, la cantidad de *S.thermophilus* se mantuvo similar desde 8.04 *Log* en la primera semana de análisis hasta 7,94 *Log* en la última. Así, la suma de la cantidad de bacterias viables de ambos organismos sobrepasa la cantidad mínima requerida expresada anteriormente.

Cuadro 13. Estudio de viabilidad de los microorganismos Starters en la muestra D (Paleta de Yogurt Mora) durante 7 semanas.

Iniciador	<i>Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus</i>				<i>Streptococcus thermophilus</i>				Total de iniciadores	
	10 ²	10 ³	UFC/g	Log UFC/g	10 ⁶	10 ⁷	UFC/g	Log UFC/g	UFC/g	Log UFC/g
1	292	33	3,0x10 ⁴	4,48	111	5	1,1x10 ⁸	8,04	1,1x10 ⁸	8,04
	298	37			108	8				
2	Inc	62	5,8x10 ⁴	4,76	118	11	1,2x10 ⁸	8,06	1,2x10 ⁸	8,06
	Inc	54			108	16				
3	Inc	153	1,5x10 ⁵	5,18	91	9	9,2x10 ⁷	7,96	9,2x10 ⁷	7,96
	Inc	147			92	8				
4	325	65	7,7x10 ⁴	4,88	92	5	9,0x10 ⁷	7,95	9,0x10 ⁷	7,95
	354	88			88	11				
5	Inc	42	3,8x10 ⁴	4,57	75	13	7,9x10 ⁷	7,89	7,9x10 ⁷	7,89
	Inc	33			82	6				
6	201	23	2,1x10 ⁴	4,32	109	14	1,0 x10 ⁸	8,01	1,0x10 ⁸	8,01
	210	27			95	14				
7	235	27	2,4x10 ⁴	4,38	79	6	8,8x10 ⁷	7,94	8,8x10 ⁷	7,94
	240	23			97	3				
Final Vida útil	Inc	290	2,9x10 ⁵	5,47	87	7	8,8x10 ⁷	7,94	8,8x10 ⁷	7,94
	Inc	295			88	2				

5.3 Validación de un protocolo para la cuantificación de *Bifidobacterium lactis* BB-12, escogido comparando diversos factores entre dos protocolos propuestos por CHR HANSEN.

Pruebas para la escogencia de un protocolo

De las pruebas efectuadas para determinar el mejor protocolo a utilizar para la enumeración de *Bifidobacterium lactis* BB-12, se desprenden los resultados plasmados en el cuadro 14 en donde se puede observar que se incubaron las placas provenientes del protocolo 1 a 42 °C y las realizadas bajo la metodología del protocolo 2 a 37°C, con la sorpresa de que no se encontraron diferencias, ya que el recuento de ambos fue muy similar y además se confirmó mediante la tinción Gram que se trataba de la bacteria *Bifidobacterium lactis* BB-12 para los dos casos.

Cuadro 14. Resultados de la primera prueba para la escogencia del mejor protocolo para la enumeración de BB-12.

BB-12	Protocolo 1					Protocolo 2				
	MRS +LiCl + CyHCl + Dicloxacilina					MRS + Mupirocina + CyHCl				
Temperatura	(42±1)°C					(37±1)°C				
Muestra	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	UFC/g	Log UFC/g	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	UFC/g	Log UFC/g
A	Inc	373	46	5.1x10 ⁷	7,70	Inc	386	49	5.7x10 ⁷	7,79
	Inc	384	55			Inc	386	64		
B	117	6	2	1.1x10 ⁶	6,05	110	16	1	1.1x10 ⁶	6,06
	109	9	3			115	6	0		
Tinción	BB-12					BB-12				

Cuadro 15. Resultados de la segunda prueba para la escogencia del mejor protocolo para la enumeración de BB-12.

BB-12	Protocolo 1					Protocolo 2				
	MRS +LiCl + CyHCl + Dicloxacilina					MRS + Mupirocina + CyHCl				
Temperatura	(37±1)°C					(37±1)°C				
Muestra	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	UFC/g	Log UFC/g	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	UFC/g	Log UFC/g
A	Inc	Inc	289	2,9x10 ⁸	8,46	Inc	464	59	6,4x10 ⁷	7,80
	Inc	Inc	284			Inc	472	69		
B	Inc	Inc	Inc	-	-	Inc	78	16	8,9x10 ⁶	6,95
	Inc	Inc	Inc			Inc	87	15		
Tinción	<i>BB-12, S. thermophilus</i>					<i>BB-12</i>				

Cuadro 16. Resultados de la tercer prueba para la escogencia del mejor protocolo para la enumeración de BB-12.

BB-12	Protocolo 1					Protocolo 2				
	MRS +LiCl + CyHCl + Dicloxacilina					MRS + Mupirocina + CyHCl				
Temperatura	(37±1)°C					(37±1)°C				
Muestra	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	UFC/g	Log UFC/g	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	UFC/g	Log UFC/g
A	Inc	Inc	254	2,3x10 ⁸	8,35	Inc	Inc	61	6,23x10 ⁷	7,79
	Inc	Inc	201			Inc	Inc	62		
B	Inc	Inc	Inc	-	-	Inc	65	15	7,33x10 ⁶	6,86
	Inc	Inc	Inc			Inc	64	15		
Tinción	<i>BB-12, S. thermophilus</i>					<i>BB-12</i>				

En los cuadros 15 y 16 podemos observar que al incubar ambos métodos a una temperatura de 37 °C se resaltan diferencias muy marcadas y por medio

de la tinción se comprobó que con el protocolo 1 se encuentran otros microorganismos además de los bífidos por lo cual no es selectivo a esa temperatura de incubación.

Repetibilidad

Del análisis de repetibilidad aplicado para la validación en la enumeración de *Bifidobacterium lactis* BB-12 en Medio MRS complementado con hidrocloreuro de cisteína y mupirocina (Protocolo 2) se derivan los resultados expresados a continuación en el cuadro 17.

Cuadro 17. Resultados del estudio de repetibilidad para las dos muestras utilizadas para la validación del protocolo 2.

Muestra	A			B		
	Deligurt InlineFres			Petit Suisse		
Diluciones	10^{-5}	10^{-6}	Log	10^{-4}	10^{-5}	Log
Repetición			UFC/g			UFC/g
1	Inc	57	7.76	Inc	277	7.44
2	Inc	56	7.75	Inc	288	7.46
3	Inc	57	7.76	Inc	298	7.47
4	Inc	48	7.68	Inc	265	7.42
5	Inc	50	7.70	Inc	282	7.45
6	Inc	55	7.74	Inc	298	7.47
7	Inc	50	7.70	Inc	280	7.45
8	Inc	53	7.72	Inc	284	7.45
9	Inc	48	7.68	Inc	300	4.48
10	Inc	51	7.71	Inc	297	7.47
Promedio(X)	7.72 Log			7.46 Log		
Desv.Std(S _r)	0.03			0.02		

En el cuadro anterior se deja notar que para las 10 repeticiones realizadas para las dos muestras se desprende un resultado de repetibilidad muy favorable, mostrando una desviación de 0,03 *Log* para la muestra A y 0,02 *Log* para la B. En este caso al ser muestras en estado diferente, IDF 411 - 2007 muestra distintos límites de repetibilidad, brindando para productos líquidos un límite de 0,12 *Log* y para productos firmes como es el caso del petit suisse, un límite de 0,20 *Log*. En base a esto podemos concluir que la repetibilidad de cada muestra, plasmadas en el cuadro anterior son excelentes.

Reproducibilidad

La reproducibilidad, en términos de precisión intermedia fue evaluada mediante un análisis independiente por tres analistas, del cual se tomaron los resultados plasmados en el cuadro 18.

Cuadro 18. Resultados del estudio de reproducibilidad con la muestra A para la validación del protocolo 2.

Analista	RAA			CCV			JJR		
<i>Diluciones</i>	10^{-5}	10^{-6}	<i>Log</i>	10^{-5}	10^{-6}	<i>Log</i>	10^{-5}	10^{-6}	<i>Log</i>
Repetición			<i>UFC/g</i>			<i>UFC/g</i>			<i>UFC/g</i>
1	Inc	62	7.79	Inc	55	7.74	Inc	59	7.77
	Inc	66	7.82	Inc	65	7.81	Inc	64	7.81
2	Inc	63	7.80	Inc	64	7.81	Inc	60	7.78
	Inc	61	7.79	Inc	55	7.74	Inc	59	7.77
Promedio(X)	7.80 <i>Log</i>			7.77 <i>Log</i>			7.78 <i>Log</i>		
Desv.Std(S_r)	0,01			0,04			0,02		
Promedio(X_R)	7,79 <i>Log</i>								
Dev.Std(S_R)	0.03								

De los resultados anteriores se puede observar una reproducibilidad de 0,03 Log para la muestra A, el cual es un resultado efectivo para la validación de este protocolo, tomando en cuenta el límite de reproducibilidad brindado por IDF 411-2007 que es de 0.39 Log.

Veracidad

Cuadro 19. Resultados de prueba de veracidad efectuada al protocolo dos utilizado en el presente estudio.

Medio	<i>B.lactis</i> (BB-12)			U.F.C	
	<i>Diluciones</i>	10^{-4}	10^{-5}		10^{-6}
MRS(MUP)		139	16	2	1,5x10 ⁶
		151	9	3	
MRS		201	22	0	2,1x10 ⁶
		203	21	2	
RT		0	0	1	-
		0	0	0	
U.F.C Teórico	1,5x10 ⁸				

Para esta prueba de recuperación se obtuvo que el medio MRS(MUP) utilizado en el protocolo 2 recuperó 1,5x10⁶ U.F.C. Mientras tanto, en el medio MRS estándar se obtuvieron 2,1x10⁶ U.F.C. Ambos medios recuperaron menos de lo esperado según el dato teórico de 1,5x10⁸ U.F.C utilizando un estándar de Mcfarland de 0.5.

En el medio RT hubo presencia de bacterias, sin embargo en una cantidad ínfima por lo que no es posible tomarlo en cuenta.

6 DISCUSIÓN

6.1 Validación e implementación de un método de trabajo para la cuantificación de los cultivos “iniciadores” *L. bulgaricus* y *S. thermophilus*.

Búsqueda de las diluciones adecuadas para el análisis

Inicialmente se realizó una prueba para determinar la concentración bacteriana presente en cada uno de los productos, tomando en cuenta lógicamente solo los microorganismos *iniciadores*. Esto con el fin de establecer un punto de partida en cuanto a la viabilidad de dichos organismos tomando como referencia la legislación actual INTECO (2006) que indica una cantidad mínima de $1,5 \times 10^7$ UFC por gramo o mililitro para poder ser considerado como yogurt o derivado del mismo.

A partir de dicha prueba se corroboró que todas las muestras destinadas a ser evaluadas cumplían claramente con esta concentración bacteriana mínima, inclusive, superándola por un logaritmo (Cuadro 3).

Prueba de repetibilidad

En cuanto a las pruebas de repetibilidad efectuadas se puede apreciar que en el caso de *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* las cuatro muestras evaluadas presentan una repetibilidad (S_r) claramente aceptable según lo establecido por ISO 7889-IDF 117 donde expresa como máximo permitido 0,20 Log. A pesar de esto, no se puede pasar por desapercibido que la S_r para la muestra A (yogurt líquido) es notoriamente mucho mayor mostrando un valor de 0,16 Log.

Dicho comportamiento se puede atribuir a la naturaleza de la muestra, que es heterogénea pero presentando una contextura líquida, a diferencia de las 3 muestras restantes. Además, el hecho de que el producto contenga partículas de frutos contribuye con la desviación estándar obtenida. Como menciona Hernández (2007), se cree que *L. bulgaricus* tiene como una de sus principales funciones en los productos fermentados dar una textura característica típica de los yogures batidos, pero en este caso al tratarse de un producto líquido se puede deducir que esa no es la principal función del microorganismo en dicho producto, y por lo tanto la cantidad de bacterias viables de esta especie se encuentran en menor proporción con respecto a otras muestras.

Esta situación puede que sea una de las causas de encontrar una S_r más baja en la muestra A, ya que el hecho de contener menos *L. bulgaricus*, hace que la muestra sea menos homogénea (los microorganismos se encuentran más dispersos) y por lo tanto esto pudo causar las variaciones mencionadas. Dicha tendencia la podemos observar en el Cuadro 4, en donde a mayor cantidad de *L. bulgaricus* viables presentes en la muestra, menor desviación estándar, en otras palabras, una mejor repetibilidad.

Dejando de lado a *L. bulgaricus* y enfocándonos en las pruebas de repetibilidad para *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus* encontramos que los valores de S_r obtenidos en las cuatro muestras son aceptables, sin embargo a pesar de que las concentraciones de este microorganismo eran semejantes en todas las muestras, si hubo un valor que resalta por encima de los demás de 0,11 Log perteneciente a la muestra C (Helado de yogurt).

En este caso, en el momento de realizar la prueba la muestra estaba almacenada a una temperatura cercana a los $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, y no se le dio ningún tratamiento previo, lo cual pudo ocasionar dicha variación, ya que a pesar de

que estas bacterias son capaces de soportar estas temperaturas extremas, a la hora de realizar las diluciones pertinentes quizás las bacterias se encontraban dañadas por la temperatura o bien debilitadas, impidiendo así el desarrollo y multiplicación de las mismas.

También la presencia de frutas en el helado es un factor a tomar en cuenta en la desviación estándar obtenida, ya que estas hacen que la muestra sea más heterogénea.

No se puede dejar de lado, para las pruebas de repetibilidad que las variaciones encontradas en ambos casos pueden deberse a errores humanos que pudieron afectar la metodología.

Prueba de reproducibilidad

Las pruebas realizadas para evaluar la reproducibilidad de los protocolos desplegaron información muy importante para efectos de la validación de estos. En donde encontramos que los resultados obtenidos por los tres analistas en las pruebas para la enumeración de *L.bulgaricus* utilizando el medio MRS acidificado (pH 4,6) fueron excelentes, ya que mostraron una desviación estándar (S_R) de tan solo 0.02 Log, muy por debajo de los 0.35 Log requeridos para validar este protocolo.

En cuanto a la prueba para *S.thermophilus* en el medio M17 con lactosa se presentó una situación muy similar a la anterior, a pesar de que en este caso el equipo de analistas vario un poco. El valor de la desviación estándar (S_R) obtenido fue de 0.04 Log, y por lo tanto, basados en el valor límite mencionado anteriormente podemos asegurar que este protocolo presenta una excelente reproducibilidad en términos de precisión intermedia.

Sin embargo, hay que tomar en cuenta que para esta prueba se dejaron de lado factores como realizarla en distintos laboratorios, con más analistas y otras variables que podrían hacer que la desviación estándar sea un poco mayor.

Prueba de veracidad

Como el objetivo de esta prueba fue conocer la capacidad de recuperación de ambos protocolos se utilizó un estándar de McFarland 0.5, que como se mencionó en otras secciones equivale a $1,5 \times 10^8$ UFC. Basados en este dato podemos observar que el medio M17 lactosado para la recuperación de *S.thermophilus* se quedó corto y presentó un valor de recuperación de $4,5 \times 10^7$ UFC.

Esta diferencia encontrada se puede atribuir a que en la suspensión bacteriana realizada en base al estándar 0.5, no se encontrara la cantidad de bacterias viables equivalentes según la turbidez presentada y por lo tanto por razones obvias no se recuperó lo esperado, debido a que la turbidez la aportan tanto bacterias viables como no viables. A pesar de que la turbidez de la suspensión fuera muy similar, el hecho de que el cultivo de *S.thermophilus* no fuera joven debido a que ya contaba con 48 horas antes de realizar dicha suspensión puede que haya afectado a las bacterias debilitándolas o bien inactivándolas e influyendo así en la recuperación final esperada para este medio.

Por otra parte, se montaron pruebas con los medios de Recuento Total Aerobio (RT) y el MRS como refuerzo a esta prueba de recuperación, encontrando un crecimiento nulo en ambos medios. La falta de lactosa de estos, fue la principal causa de la ausencia de los microorganismos. Esto debido a que la lactosa es fundamental en el metabolismo de *S.thermophilus*

ya que es su principal fuente de carbono y energía (Foucaud y Poolman, 1992).

En cuanto a las pruebas de recuperación para *L.bulgaricus* mostraron un pobre crecimiento con base en el valor teórico. Obteniendo un valor de $9,1 \times 10^6$ UFC en el medio MRS acidificado y un valor similar de $8,0 \times 10^6$ UFC en el medio de MRS estándar, valores que difieren hasta en 2,0 Log del valor esperado.

En este caso la principal causa de esta baja recuperación puede ser la temperatura de incubación. En primera instancia el protocolo para el recuento de *L.bulgaricus* requería de un pH 5,4 y una temperatura de 37°C. Al mostrar poca selectividad bajo estas condiciones, las mismas fueron cambiadas a pH 4,6 y 43°C que son las condiciones más extremas a las cuales el microorganismo se puede desarrollar. Precisamente la incubación de las bacterias a estos valores de temperatura y acidez permiten el desarrollo de estas, sin embargo, al ser valores extremos es posible que éstas no se desarrollen en forma óptima y presenten un bajo crecimiento en placa (Mateos, 2005).

En cuanto al medio RT no hubo crecimiento ya que, si bien es cierto dicho medio recupera muchos tipos de microorganismos con requerimientos nutricionales simples, el caso de *L.bulgaricus* no encaja dentro de estos al igual que la mayoría de bacterias ácido-lácticas.

6.2 Estudio de viabilidad de los cultivos “iniciadores” en yogurt y helado a lo largo de su vida útil utilizando protocolos implementados y validados.

La disminución de bacterias encontrada en las muestra A y B (yogurt) en el transcurso de las 7 semanas establecidas como vida de anaquel obedece a un comportamiento descrito por Briceño et al. (2001) describiendo una disminución de las bacterias lácticas durante el almacenamiento a bajas temperaturas mostrando una curva típica de crecimiento para estos organismos, en donde inmediatamente después de su manufactura y las primeras semanas de almacenamiento presentan un incremento de la población y posteriormente un descenso a lo largo de la vida útil del producto.

Esta situación está directamente relacionada con la producción de ácido láctico por parte de estos organismos. A medida que avanza el tiempo de almacenamiento se nota una disminución de ambas bacterias, sin embargo estas lo hacen en condiciones diferentes. La población de *S.thermophilus* empieza a mermar cuando el medio muestra valores de pH cercanos a 4,0 por lo que detiene su crecimiento. En cambio en estas condiciones *L.bulgaricus* aún tiene la capacidad de multiplicación ya que su crecimiento se interrumpe a valores de pH entre 3,5-3,8. Por este motivo aún cuando los cocos se encuentren en disminución, puede darse el caso de que estos bacilos mantengan o incrementen su población hasta que los valores de acidez se lo permitan (Briceño et al., 2001).

Este comportamiento se presenta en la muestra A plasmado en el cuadro 10 en el cual se puede observar que a partir de la semana 4 hay una disminución de las poblaciones de ambas bacterias, donde posiblemente la acidificación del yogurt por parte de las mismas bajó los niveles de pH

afectando así su fase de multiplicación. Por otra parte, en la muestra B (cuadro 11) es notoria la disminución de *S.thermophilus* en la tercera semana mientras que *L.bulgarius* lo hace hasta en la semana 7. Estos comportamientos se encuentran plasmados en las figuras 10 y 11. A pesar de estas disminuciones, se comprobó que todas las muestras cumplen con la cantidad mínima requerida de microorganismos iniciadores al final de su vida útil.

Ya es conocido que la posterior acidificación por ácido láctico que sufre el yogurt en almacenamiento afecta la viabilidad de las LAB, principalmente a *S.thermophilus* que es menos ácido tolerante, y debido a las lesiones que sufren estos microorganismos hay un descenso notorio en el ácido fórmico, produciendo la disminución también de *L.bulgarius*, ya que este es un factor estimulante para los mismos (Aldana, 1988; Hernández, 2007).

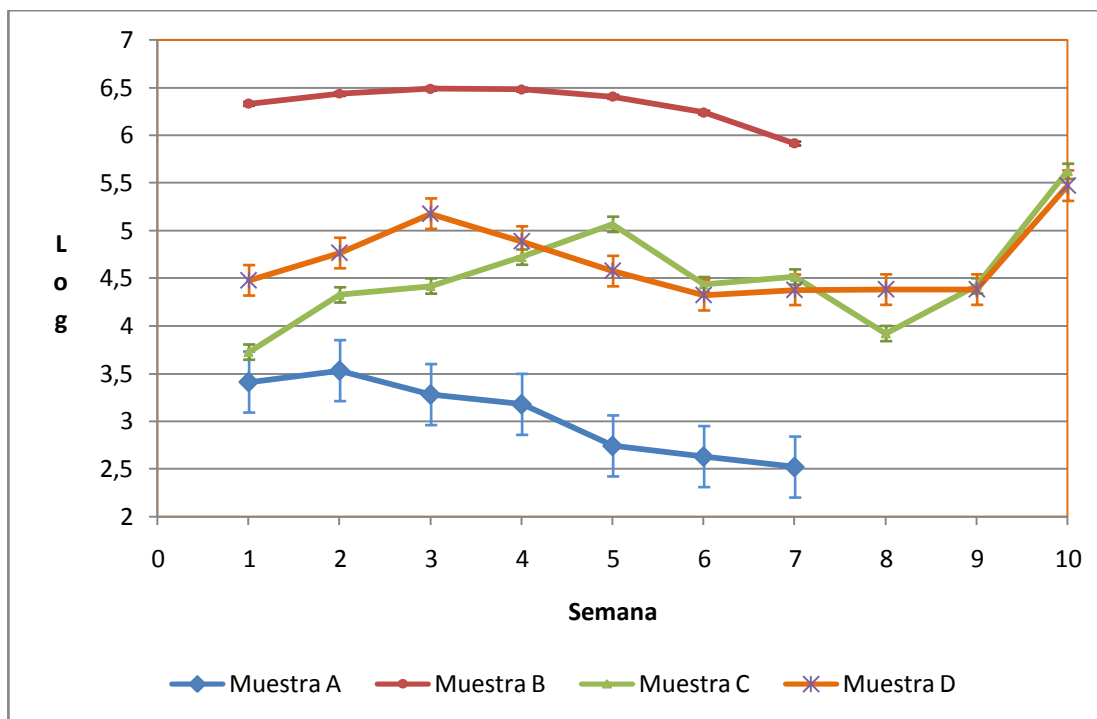


Figura 10. Viabilidad de *L.bulgarius* en las cuatro muestras en estudio durante su periodo de almacenamiento.

Esta influencia que tienen los valores de acidez sobre las poblaciones de *LAB* se atribuye a que el pH intracelular de las mismas ronda el valor de 6,6 y cuando el medio muestra valores inferiores a este, se origina un gradiente de pH en la membrana celular. En esta situación la bacteria bombea protones de la parte externa consumiendo así ATP, sin embargo, al final de la fase exponencial de crecimiento la cantidad de ATP se ve limitada y desaparece este sistema de protección, dando como resultado la disminución de la actividad de enzimas proteolíticas y por lo tanto inhibiendo las bacterias (Aldana, 1988).

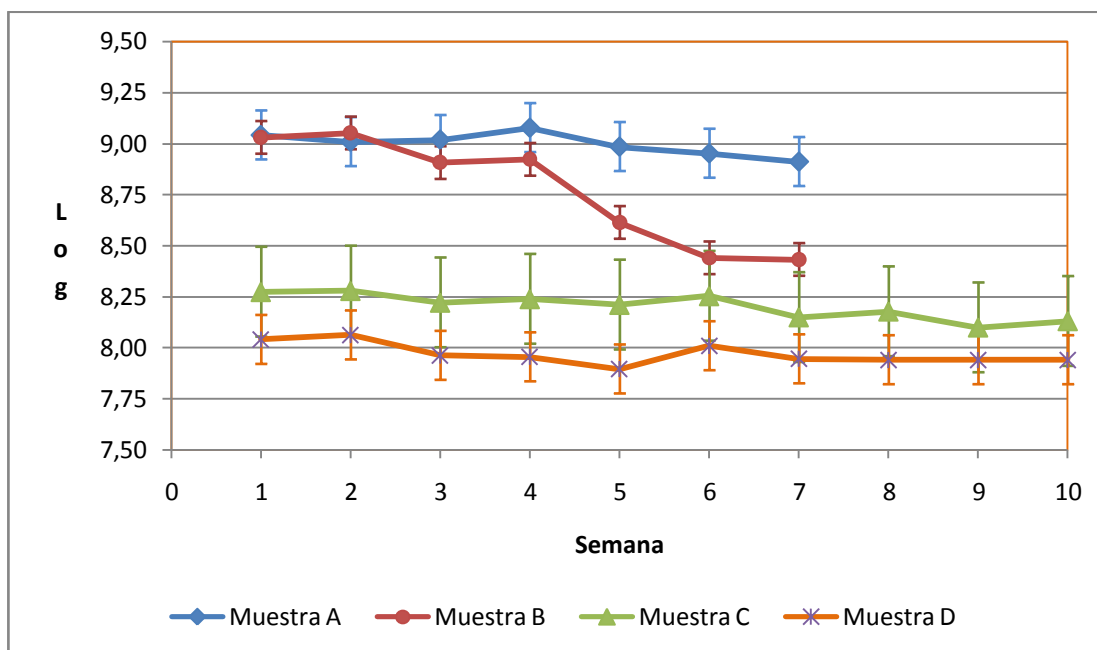


Figura 11. Viabilidad de *S.thermophilus* en las cuatro muestras en estudio durante su periodo de almacenamiento.

Para las muestras C y D no se aplica lo mencionado anteriormente, ya que en estas, en las poblaciones de *S.thermophilus* la disminución observada es mínima, manteniéndose constante (basados en las barras de error que constan de dos desviaciones estándar obtenidas a partir del estudio de

repetibilidad) durante todo el tiempo de análisis y en el caso de *L.bulgaricus* se puede apreciar que el recuento de la última semana de análisis supera por 1,0 Log ó más la primer semana.

Al tratarse ambas muestras de helado, se puede atribuir este comportamiento a las características físico químicas del mismo, siendo una importante el nivel de pH de este, que suele ser mucho más cercano a la neutralidad que otros productos funcionales como los yogures. Por lo tanto, la vida útil del helado, se ve favorecida ya que estas condiciones influyen de forma directa en la capacidad de sobrevivencia de estas LAB (Martín, 1996).

Sin embargo, a pesar de que las poblaciones de los bacilos fueron mayores al final del análisis, durante el mismo se encontraron fluctuaciones de dichas poblaciones. Fenómeno que se puede atribuir entre otras cosas al tratamiento previo que se les dio a las muestras de helado, colocándolas en baño maría por 5 minutos a 40°C para homogenizar mejor.

Este proceso por el cual se pasaron estas muestras, además de facilitar la homogeneidad del producto, lo que buscaba también revertir en cierta forma consecuencias de la temperatura de almacenamiento del helado (-20°C) que normalmente son la formación de cristales, desnaturalización de proteínas, entre otros (Hawkins, 1993).

Otra forma de entender estas fluctuaciones son las variaciones poblacionales causadas por la descongelación del producto y su nueva congelación, ya que se conoce que bacterias aún activas mantenidas a -18°C y posteriormente descongeladas inician una nueva fermentación y pueden llegar a aumentar hasta 1,0 Log(Danone, 2000).

Sin embargo, a la hora de congelar nuevamente puede que las bacterias sufran lesiones, ya que este proceso de enfriamiento a diferencia del de producción (en la elaboración del helado el proceso de congelamiento es sumamente rápido) es lento, lo cual favorece consecuencias como las que menciona Hawkins (1993) y esto puede ser lo que ocasione este vaivén poblacional.

En el caso de la muestra C, al tratarse de un solo recipiente contenedor del producto, era necesario descongelarlo cada vez que se tomaba la muestra y por lo tanto las situaciones descritas anteriormente concuerdan con la forma en que se llevó a cabo el análisis de este helado.

La efectividad de los estabilizadores también influyen de sobremanera en este comportamiento, ya que en presencia de estos a una temperatura de -18°C la actividad β -galactosidásica intracelular se mantiene, lo cual indica que esta enzima soporta la congelación. No así los productos congelados sin estabilizador, en donde la supervivencia de población de *S.thermophilus* al cabo de tres meses es del 75% y *L.bulgaricus* presenta solo un 22% en este mismo tiempo en condiciones de conservación de -18°C (Dadone, 2000).

6.3 Validación de un protocolo para la cuantificación de Bifidobacterium lactis BB-12, escogido comparando diversos factores entre dos protocolos propuestos por CHR HANSEN

La primera prueba efectuada para la escogencia de un protocolo proporcionó información (Cuadro 14) importante en cuanto a la efectividad de ambos procedimientos, ya que los mismos presentaron resultados semejantes. Sin

embargo, el protocolo 1 especifica que se debe incubar a una temperatura de 42 °C en caso de que las bacterias acompañantes de *Bifidobacterium lactis* fueran mesófilas y a 37 °C cuando se trataba de termófilas. En el primer caso, la temperatura sería el factor inhibitorio de la flora acompañante y los antibióticos en el segundo.

Una segunda prueba fue efectuada buscando un resultado similar al anterior pero con una temperatura de incubación para el protocolo 1 de 37 °C. Esto debido a que en el laboratorio no se contaba con una incubadora fija que permaneciera a 42 °C. De esta forma se obtuvieron resultados completamente diferentes (Cuadro 15), ya que la comparación entre ambos procedimientos favorece al protocolo 2, debido a que el primero perdió su efectividad inhibitoria al mostrar en la tinción Gram cadenas de cocos muy similares a *S.thermophilus* además de los bífidos esperados.

En forma de comprobación se hizo una tercer prueba (Cuadro 16) bajo las mismas condiciones que la segunda, mostrando exactamente los mismos resultados.

Con lo descrito anteriormente, es notorio que para que el protocolo 1 sea completamente selectivo para BB-12 influyen no solo los antibióticos utilizados sino que además se encontró que la temperatura juega un rol fundamental, ya que por sí sola la dicloxacilina, aún permite el crecimiento de estos cocos antes mencionados.

La dicloxacilina pertenece a la familia de los betalactámicos, y es una penicilina resistente a la enzima penicilinasas. Su efectividad se restringe hacia las bacterias Gram + y ejerce su acción bactericida sobre el crecimiento y división de la pared celular bacteriana. Aunque no se conoce

el mecanismo utilizado, otras penicilinas actúan inactivando las bacterias mediante su unión a transpeptidasas, proteínas fijadoras de penicilinas, que se encuentran en la superficie interior de la cubierta bacteriana y de esta manera inhiben el paso final de la unión de peptidoglicano. Por lo tanto despojan a las bacterias de su pared celular rígida que las protege contra la ruptura osmótica (Zhou et *al.*, 2005).

Diversos estudios como el de Zhou et *al.* (2005) han demostrado la resistencia que presenta *B. lactis* (BB-12) a este tipo de antibiótico y el hecho de que las bacterias ácido lácticas acompañantes de BB-12 sean Gram + sugiere la completa selectividad del medio. Sin embargo, los estudios anteriores mencionan únicamente la susceptibilidad de los *Lactobacillus sp.*

Amaya et *al.* (1993) por su parte, realizaron pruebas de erradicación bacteriológica con *Streptococcus sp.* utilizando dicloxacilina y se obtuvo un porcentaje de supervivencia cercano al 13%.

Por lo mencionado en los párrafos anteriores, la presencia de *S. thermophilus* en las pruebas de “selectividad” no es de extrañar.

Por su parte, el protocolo 2 usa como agente selectivo la mupirocina, que según Martínez y Sánchez (2007) actúa inhibiendo la sintetasa de isoleucil-ARNt, una enzima que cataliza la formación de isoleucil-ARNt a partir de isoleucina y ARNt. La mupirocina impide la incorporación de isoleucina a los péptidos en formación y determina el bloqueo de la síntesis proteica.

Estudios como el de Rada (1997), dejan evidenciar la efectividad que presenta este antibiótico contra otras bacterias ácido lácticas como los *Lactobacillus sp.* y menciona la existencia de pocas bacterias resistentes a este método de acción de la mupirocina. Se cree que la resistencia que

presenta *B. lactis* se ve mediada por un sistema de protección que hace uso de los plásmidos, sin embargo, este sistema aún no se conoce detalladamente (Rada, 1997).

Sáenz y Sánchez (2005) se refieren a la susceptibilidad que muestra el género *Streptococcus sp.* ante la presencia de este antibiótico, lo que concuerda con los resultados obtenidos durante las pruebas.

Una vez estudiados los resultados anteriores, se encontró que el protocolo 2 se adapta mejor a los requerimientos y limitaciones del Laboratorio de Microbiología de la Cooperativa de Productores de leche Dos Pinos R.L., debido a que el uso de la mupirocina le brinda un amplio poder selectivo bajo una temperatura de incubación de 37 °C.

En el proceso de validación del protocolo escogido, que consistía en pruebas de repetibilidad, reproducibilidad y veracidad, se desprenden resultados muy favorables para la finalidad del mismo. Se obtuvo una desviación estándar en términos de repetibilidad (S_r) de 0.03 Log para la muestra A y 0.02 para la B, siendo los valores reportados por IDF 411 (2007) de 0,12 para muestra líquida y 0,20 Log para muestra firme.

La diferencia de la repetibilidad según la contextura de la muestra se debe a la influencia que esta tiene en el conteo final, en donde al ser muestras de diferente viscosidad, las técnicas de manipulación como el pipeteo y manejo con cristalería se pueden ver afectadas, o bien porque la misma textura del producto impide la homogenización a la hora de inocular (IDF 411, 2007).

En cuanto a la reproducibilidad (S_R), efectuada solamente a la muestra A, el valor encontrado cumple también con lo esperado, dejando muy en claro la efectividad del protocolo escogido.

Por su parte la prueba de veracidad no mostró grandes diferencias en la recuperación del medio, donde el medio MRS (MUP) recuperó $1,5 \times 10^6$ UFC y el medio MRS estándar $2,1 \times 10^6$ UFC; ambos valores 2 unidades de logaritmo por debajo del inóculo teórico aproximado de $1,5 \times 10^8$ UFC según el estándar de McFarland utilizado. Sin embargo, se puede observar que la mupirocina no fue la causa de la baja recuperación del medio al presentar ambos medios valores dentro del mismo logaritmo.

En este caso el hecho de que la bacteria a suspender es anaerobia, y que la suspensión se llevara a cabo en condiciones aerobias puede ser causante también de este pobre porcentaje de recuperación.

7 CONCLUSIONES

- Mediante los procesos de validación se demostró que los protocolos propuestos por ISO 7889-IDF 117 desprenden resultados confiables debido a su excelente repetibilidad y reproducibilidad.
- Con el estudio realizado se comprueba que las cuatro muestras en cuestión cumplen satisfactoriamente con la cantidad de cultivos iniciadores que propone CODEX STAN 243-2003 a lo largo de toda su vida de anaquel.
- Factores como el pH y la temperatura juegan un papel muy importante en la viabilidad de las bacterias ácido lácticas
- En las muestras A y B de Yogurt se observa una tendencia a la disminución en la cantidad de *iniciadores* viables conforme avanzan las semanas en almacenamiento a 3 °C.
- La población de *S.themophilus* prácticamente se mantiene constante, mientras *L.bulgaricus* presenta fluctuaciones y un ascenso en la cantidad de bacterias viables hacia el final del almacenamiento, esto para las muestras C y D de helado a -20° C.
- Una congelación lenta del helado puede afectar la cantidad de *cultivos iniciadores* viables, debido a las lesiones por formación de cristales, desnaturalización de proteínas, entre otros.
- A pesar de que en la prueba de veracidad no se observan buenos resultados debido a que los resultados obtenidos siempre fueron menores a los esperados, se puede asegurar que el método de análisis de viabilidad de los

iniciadores funciona perfectamente para demostrar que los productos cumplen con las especificaciones y lo que esta baja recuperación genera es una subestimación de los resultados.

- La dicloxacilina no resultó ser un agente selectivo indicado para la enumeración de *B.lactis* a 37°C, ya que con el uso del mismo se encontró la presencia de colonias de cocos en las placas.
- El protocolo 2 fue el método escogido para la enumeración de *B.lactis*, gracias a que las bacterias acompañantes de la misma, mostraron una alta susceptibilidad a la Mupirocina a 37°C.

8 RECOMENDACIONES

- Complementar esta investigación con un análisis molecular para evidenciar la presencia de *L.bulgaricus*, esto para evitar confusiones por su similar apariencia con *L.acidophilus*.
- Determinar el pH cada vez que se extrae la muestra del producto para así poder asociar los cambios poblacionales con el mismo.
- Cuantificar la cantidad de ácido láctico producido por las LAB para evaluar su influencia en la acidificación de los productos.
- En la medida de lo posible, utilizar muestras individuales para el análisis del producto C de helado de yogurt, para evitar estar descongelando y causando de esta forma variaciones en las poblaciones de los *cultivos iniciadores*.
- Para el caso de los helados, realizar un análisis de viabilidad desde la semana de producción de los mismos.
- Incluir más variables en el estudio de reproducibilidad tales como diferentes equipos, medios de cultivo preparados por diferentes analistas y en la medida de lo posible diferentes laboratorios.
- Buscar un medio y condiciones adecuadas para hacer las suspensiones bacterianas de *L.bulgaricus* y *B.lactis* con el fin de obtener mejores resultados en las pruebas de veracidad.
- Hacer un estudio para la enumeración de *B.lactis* con un antibiótico genérico de mupirocina para evaluar su efectividad y disminuir el costo del análisis.
- Realizar una comparación de costos entre los protocolos 1 y 2 para optimizar la enumeración de *B.lactis*.

9 LITERATURA CITADA

- ABRAHAM, A.; DE ANTONI, G. Y ANON, M. 1993. Proteolytic Activity of *Lactobacillus bulgaricus* Grown in Milk. J. Dairy Sci. 76:1498-1505.
- ALDANA, S. 1988. Estudio de algunos factores a considerar en el recuento de las bacterias lácticas en yogurt. Trabajo especial de grado. Universidad Simón Bolívar. Venezuela.
- AMAYA, G.; AGUIRRE, G.; ANDRADE, J.; PEREDO, G.; MORFIN, R.; ESPARZA, S. y RODRIGUEZ, E. 1993. Once-daily azithromycin in the treatment of adult skin and skin-structure infections. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 31:129-135.
- ARUNACHALAM, K. 2000. Enhancement of natural immune function by dietary consumption of *Bifidobacterium lactis* (HN019). European Journal Clinical Nutrition. 54: 263-267.
- AXELSSON, L. 1998. Lactic acid bacteria: Classification and Physiology. In *Lactic acid bacteria. Microbiology and functional aspects* (Wright, S. S. a. A. v., ed.), Marcel Dekker Inc., New York. pp: 1–72.
- BARREDA, P. 2005. Desarrollo de la flora intestinal normal. *Pediatraldia*. Disponible en: <http://www.pediatraldia.cl/flora_intestinal_normal.htm> (20-05-09).
- BJORKSTEN, B.; SEPP, E.; JULGE, K.; VOOR, T. Y MIKELSAAR, M. 2001. Allergy development and the intestinal flora during the first year of life. J Allergy Clin Immunol 108: 516–520.

- BRICEÑO, A.; MARTÍNEZ, R. Y GARCÍA, K. 2001. Viabilidad y actividad de la flora láctica (*Streptococcus salivarius* ssp *thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii* ssp *bulgaricus*) del yogurt en Venezuela. Acta científica venezolana. 52:46-54.
- BUCHENHŸSKES, H. 1993. Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as starter cultures for various food commodities. FEMS Microbiology. 12:253.
- CALLEGARI, M.; FERRARI, S.; BESSI, E.; CATTIBELLI, D.; SOLDI, S.; MORELLI, L.; FEUILLERAT, N. Y ANTOINE, J. 2006. Survival of Yogurt Bacteria in the Human Gut. Applied Environmental Microbiology. 72: 5113-5117.
- CARRANZA, E. 2001. Vida útil del helado duro batido de Coopeleche RL desde el punto de vista mercadológico. Coopeleche RL, San Ramón. Comunicación personal. Citado por: Corrales, A.; Henderson, M. y Morales, I. 2007. Sobrevivencia de microorganismos probióticos en helado batido *Lactobacillus acidophilus* y *Bifidobacterium lactis* en helado batido. Rev. chil. nutr. 34(2): 157-163.
- CASTILLO, M.; BORREGALES, C.; SÁNCHEZ, M. 2004. Influencia de la pectina sobre las propiedades reológicas del yogurt. Rev. Fac. Farm. (Merida). 46(2):33-37.
- CHEN, R.; WU, J.; LEE, C.; HUANG, A. Y WU, H. 1999. Increase of Intestinal *Bifidobacterium* and Suppression of Coliform Bacteria with Short-Term Yogurt Ingestion. Journal of Dairy Science. 82(11): 2308-2314.
- CHR-HANSEN. 2001. L.acidophilus, L.casei and Bifidobacteria in fermented milk products-Guidelines. Method for counting probiotic bacteria.

- CHR-HANSEN. 2007. Enumeration of Bifidobacteria in fermented milk products- Guideline. Technical bulletin p-11.
- CODEX STAN. 2003. Norma del codex para leches fermentadas. 243-2003. 1-5.
- COGAN, T. 1996. History and taxonomy of starter culturas. En: Fox, P. Cheese: chemistry, physics and microbiology. Vol.1. Ed. Elsevier Applied Science, London, UK. p179-249.
- CORCORAN, B.; ROSS, P.; FITZGERALD, G. Y STANTON, C. 2004. Comparative survival of probiotic lactobacilli spray-dried in the presence of prebiotic substances. Journal of Applied Microbiology 96:1024–1039.
- CORRALES, A.; HENDERSON, M. Y MORALES, I. 2007. Sobrevivencia de microorganismos probióticos en helado batido *Lactobacillus acidophilus* y *Bifidobacterium lactis* en helado batido. Rev. chil. nutr. 34(2): 157-163.
- CURTIS, H.; BARNES, N.; SCHNEK, A. Y FLORES, G. 2000. Biología. 6° Edición. Editorial México Panamericana–España. 1442p.
- DADONE. 2000. World Newsletter 20. Disponible en <http://www.alimentariaonline.com/apadmin/img/upload/MLC011_YOGUR_HELADO_L.pdf> (20-05-10).
- DEMAN, J.; ROGOSA, M. Y SHARPE, M. 1960. A médium for the cultivation of lactobacilli. J. of Applied Bacteriology. 23:130-135.

DOMÉNECH, E. Y MAÑÉ, J. 2006. Uso de probióticos en la prevención y el tratamiento de enfermedades digestivas. Butlletí d'informació terapèutica. 18(3): 13-18.

FARNWORTH, E. 2003. Handbook of fermented functional foods. Crc press. 390pp.

FELIS, G. Y DELLAGLIO, F. 2009. Taxonomy of Lactobacilli and Bifidobacteria. Curr. Issues Intestinal Microbiol. 8: 44-61.

FERNANDEZ, A.; BORGES, F.; THIBESSARD, A.; GINTZ, B.; DECARIS, B. Y LEBLOND-BOURGET, N. 2003. Characterisation of *Streptococcus thermophilus* CNRZ368 oxidative stress resistant mutants: involvement of a potential Rgg-like transcriptional regulator. Lait 84 (2004): 77–85.

FERNANDEZ-ESPLA, M. Y RUL, F. 1999. PepS from *Streptococcus thermophilus*: A new member of the aminopeptidase T family of thermophilic bacteria. Eur. J. Biochem. 263: 502-510.

FOUCAUD, C. Y POOLMAN, B. 1992. Lactose transport system of *Streptococcus thermophilus*. Functional reconstitution of the protein and characterization of the kinetic mechanism of transport. J. Biol. Chem. Vol. 267(31): 22087-22094.

FOX, P.; GUINEE, T.; COGAN, T. Y MCSWEENEY, P. 2000. Fundamentals of cheese science, An Aspen Publication, USA. Disponible en <
<http://books.google.co.cr/books?hl=es&lr=&id=-oRp5VCVTQQC&oi=fnd&pg=PR9&dq=Fox,+P.,+Guinee,+T.,+Cogan,+T.+y+McSweeney,+P.+2000.+Fundamentals+of+cheese+science,+An+Aspe>

n+Publication,+USA.++&ots=P_sXCBf2jr&sig=DQ5BtjKcxDypORmcLg_Y
pxmmr04#PPR9,M1>(20-05-09).

FULLER, R. 1994. History and development of probiotics. Christian Hansen, Denmark.

GONZÁLEZ, A. 2001. Vida útil del helado duro batido de Indulac SA desde el punto de vista mercadológico. San Antonio de Belén. Citado por: Corrales, A.; Henderson, M. y Morales, I. 2007. Sobrevivencia de microorganismos probióticos en helado batido *Lactobacillus acidophilus* y *Bifidobacterium lactis* en helado batido. Rev. chil. nutr. 34(2): 157-163.

GUARNER, F. 2002. El colon como órgano habitad de la flora bacteriana. Nutr. Hosp.17(2):7-10.

GUARNER, F. Y SCHAAFSMA, G. 1998. Probiotics. Int. J. Food Microbiology. 39: 237-238.

HASSAN, A. Y FRANK, J. 2001. Starter cultures and their use. En Marth, H. y Steele, L. Applied dairy microbiology. Second Edition. Ed. Marcel Dekker. INC. New York.

HAWKINS, S. 1993. Bifidobacteria in dairy products. Cultured dairy products Journal. 28(4): 16-24.

HERNANDEZ, A. 2007. Aislamiento, caracterización y detección precoz de bacteriófagos de *Streptococcus Thermophilus* en la industria láctea. IPLA. CSIC Oviedo.

- HIRAYAMA, K. y RASFETER, J. 2000. The role of probiotic bacteria in cancer prevention. *Microbes Infection*. 2(6): 681-686.
- HOOVER, D. 1993. Bifidobacteria: activity and potential benefits. *Food Technology* 47(6):120-124.
- HUGHES, D. y HOOVER, D. 1991. Bifidobacteria: their potential for use American dairy products. *Food Technology* 41(1):75-81.
- IDF 411. 2007. Selective enumeration of Bifidobacteria in Dairy Products: Development of a Standar Method. *Bulletin of the International Dairy Federation*.
- INTECO. 2006. Norma general para yogurt. INTE 02-03-07-06.
- ISO 7889 / IDF 117. 2003. Yogurt-Enumeration of characteristic microorganisms- Colony count technique at 37 °C.
- KAHN, M.; FUENTES, F. y VILLARROEL, G. 2009. Probióticos en diarrea aguda infecciosa. *Rev. chil. pediatr.* 80(2): 129-136.
- LEONG-MORGENTHALER,P.; ZWAHLEN, M. y HOTTINGER, H. 1991. Lactose Metabolism in *Lactobacillus bulgaricus*: Analysis of the Primary Structure and Expression of the Genes Involved. *Journal of Bacteriology*. 173(6):1951-1957.
- LILLY, D. Y STILLWELL, R. 1995. Probiotics growth promoting factors produced by microorganisms. *Science*. 147: 747-748.

- LÓPEZ, M. 2005. Estrategias en el tratamiento y manejo nutricio del paciente con diarrea: fibra dietética y probióticos. *Rev Gastroenterol Mex.* 70(3).
- LUDWIG, W. Y SCHLEIFER, K. 1994. Bacterial phylogeny based on 16S and 23S rRNA sequence analysis. *FEMS Microbiol Rev.* 15(1):55-73.
- MACEDO, G. 2002. Los alimentos funcionales, un reto para el siglo XXI. *Nutrición Clínica* 5(3):121-2.
- MARTINEZ, J. Y SANCHEZ, F. 2007. Mecanismo de acción de los antibióticos. *JANO* 1660:28-34.
- MARTÍNEZ, M.; PACHO, S. Y VICARIO, S. 2007. Probioticos: Potencial para prevenir y curar. *RCCV*.1(2): 573-583.
- MATEOS, J. 2005. Tecnología de la leche fermentada 15 jul. 2006. Disponible en: <<http://www.sabadelluniversitat.org/Cat/SBD/Universitat/documents/JAMateos-S7-p.pdf>> (15-7-06).
- MAYEUX, J.; SANDINE, W. Y ELLIKER, P. 1962. A selective médium for detecting leuconostoc organisms in mixed strain starter cultures. *J. of Dairy Science.* 45: 655-656.
- MENDOZA, L. 2007. Proceso de Elaboración de Yogur Batido. Disponible en< <http://www.textoscientificos.com/alimentos/yogur>>. (27-08-09).
- MINISTERIO DE SALUD. 2003. Política Nacional de Salud 2002-2006. *Boletín Epidemiológico* 3(2). Disponible en<<http://www.netsalud.sa.cr/>>(25-01-2009).

MOHAN, R.; KOEBNICK, C.; SCHILDT, J.; MUELLER, M.; RADKE, M. Y BLAUT, M. 2008. Effects of Bifidobacterium lactis supplementation on body weight, fecal pH, acetate, lactate, calprotectin and IgA in preterm infants. *Pediatr Res.* Disponible en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18552710?ordinalpos=1&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_DefaultReportPanel.Pubmed_RVDocSum> (11-02-09).

MORAIS, J. 2004. Estudio de adecuación de cepas lácticas autóctonas aisladas de leche cruda de oveja guirra para la elaboración de queso. Universitat autònoma de Barcelona. 134p.

NAIDU, A.; BIDLACK, W. Y CLEMENS, R. 1999. Probiotic spectra of lactic acid bacteria(LAB). *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 38(1): 13-126.

PARVEZ, S. 2006. Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. *Journal of Applied Microbiology* 100: 1171-1185.

PÉREZ, M. Y RAMÍREZ, N. 2007. Utilización de las bacterias lácticas termoresistentes como probióticos en productos cárnicos conocidos. *NACAMEH* 1(2): 87-96.

PIÑERO, D.1995. De las bacterias al hombre: La evolución. Fondo de cultura económica. Mexico D.F. <<http://www.bionica.info/Biblioteca/Pi%C3%B1ero1996DeLasBacteriasAlHombre.pdf>> (20/05/09).

SAENZ, E. y SANCHEZ, L. 2005. Antibióticos tópicos. *Dermatología peruana.* 15(1).

- SANDERS, M. 1999. Probiotics. *Food Technology* 53(11): 67-75.
- SANDINE, W. 1979. *Lactic Starter Culture Technology*. Pfizer Cheese Monographs. Pfizer Inc., New York. Vol. VI.
- SCHREZENMEIR, J. Y DE VRESE, M. 2001. Probiotics, prebiotics and synbiotics approaching a definition. *American Journal of Clinical Nutrition*.73(2): 361-364.
- SHAH, N. 1997. Bifidobacteria: characteristics and potential for application in fermented milk products. *Milchwissenschaft* 52(1): 16-21.
- SHAH, N. 2001. Functional foods from probiotics and prebiotics. *Food Technology* 55(11): 46-53.
- SIUTA-CRUCE, P. Y GOULET, J. 2001. Improving probiotic survival rates. *Food Technology* 55(10):36-42.
- SODINI, I.; LUCAS, A.; OLIVEIRA, M.; REMEUF, F. Y 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): 2479-2488.
- STANLEY, G. 1998. *Microbiología de los productos lácteos fermentados*. Ed. Acribia. Zaragoza, España.
- STINGELE, F.; NEWELL, J. Y NEESER, J. 1999. Unraveling the Function of Glycosyltransferases in *Streptococcus thermophilus* Sfi6. *J Bacteriol.* October; 181(20): 6354–6360.

- TAHRI, K.; GRILL, J. Y SCHNEIDER, F. 1996. Bifidobacteria strain behavior toward cholesterol coprecipitation with bile salts and assimilation. *Current Microbiology* 33: 187-193.
- TARANTO, M.; MÉDICI, M. Y FONT DE VALDEZ, G. 2005. Alimentos funcionales probióticos. *Rev. Química viva* 1(4). Disponible en <<http://www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar/v4n1/taranto.htm>>(10-09-09).
- TEIXEIRA, P.; CASTRO, M.; MALCATA, F. Y KIRBY, R. 1995. Survival of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *Bulgaricus* Following Spray-Drying. *Journal of Dairy Science* 78:1025-1031.
- TERZAGHI, E. Y SANDINE, W. 1975. Improved medium for lactic streptococci and their bacteriophages. *Applied Microbiology* 29:807-813.
- TRAPP, C.; CHANG, C.; HALPERN, G.; KENT, C. Y GERSHWIN, M. 1993. The influence of chronic yogurt consumption in population of young and elderly adults. *Int. J. Immunother.* 9:53-64.
- VANDERHOOF, J Y YOUNG, R. 1998. Use of probiotics in childhood gastrointestinal disorders. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition.* 27(3).

10 ANEXOS

Anexo 1.

Composición de los medios utilizados en el proyecto.

Medio MRS (de Man, Rogosa y Sharpe)

Componente	g/L
Peptona 1	10.0g
Extracto de carne	8.0g
Extracto de levadura (seca)	4.0g
Glucosa (C ₆ H ₁₂ O ₆)	20.0g
Tween 80 ()	1.0ml
Fosfato monoácido de Potasio (K ₂ HPO ₄)	2.0g
Acetato de Sodio Trihidratado (CH ₃ CO ₂ Na·3H ₂ O)	5.0g
Citrato Diamónico (C ₆ H ₆ O ₇ (NH ₄) ₂)	2.0g
Sulfato de Magnesio Heptahidratado (MgSO ₄ ·7H ₂ O)	0.2g
Sulfato de Manganeso Tetrahidratado (MnSO ₄ ·4H ₂ O)	0.05g
Agar	10.0g
Agua hasta completar 1L	1000ml

*pH ajustado a 4,6 para el estudio de *Lactobacillus bulgaricus*

*pH ajustado a 6,8 para el estudio de *Bifidobacterium lactis*

Medio M17

Componente	g/L
Peptona 1 (digerido tríptico de caseína)	5.0g
Peptona 2 (Digerido péptico de carne)	5.0g
Peptona 3 (Digerido de papaína de soya)	5.0g
Extracto de levadura (seca)	2.5g
β- Glicerofosfato (sal dosódica) (C ₃ H ₇ O ₆ PNa ₂)	19.0g
Sulfato de Magnesio Heptahidratado (MgSO ₄ ·7H ₂ O)	0.25g
Ácido Ascórbico (C ₆ H ₈ O ₆)	0.50g
Agar	11.0g
Agua hasta completar	950ml

*Se adicionaron 50 mL de una solución de lactosa 10% por cada 950 mL de Medio para el estudio de *Streptococcus thermophilus*.

Fuente: ISO 7889/IDF 117.2003.

Anexo 2.

Principales características de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus*, *L. delbrueckii* subsp. *Lactis*, *L. helveticus* y *L. acidophilus*

Attributes	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>	<i>L. helveticus</i>	<i>L. acidophilus</i>
Morphology	Rods with round ends. Variable according to age, medium, strain, Numerous metachromatic bodies in cells of old culture stained with methylene blue.	As for <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> .	Poymorphism of old cultures not so marked as with <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> and <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> . No metachromatic bodies.	Rods with round ends, singly, in pairs or short chains, No metachromatic bodies.
Catalase reaction	-	-	-	-
CO ₂ production from glucose	-	-	-	-
Growth at 15°C ± 1 °C Growth at 45 °C ± 1 °C	- +	- +	- +	- +
Fermented sugars				
— fructose	+	+	+/-	+
— galactose	-	+/-	+	+
— glucose	+	+	+	+
— lactose	+	+	+	+
— maitose	-	+	+/-	+
— mannose	+/-	+	+/-	+
— sucrose	-	+	-	+
— trehalose	-	+	+/-	+/-
— gluconate	-	-	-	-
— ceflobiose	-	-	-	+
— esculine	-	-	-	+
Lactic acid enantiomers	D(-)	D(-)	DL	DL
<p>+ = positive reaction for 90 % or more strains. - = negative reaction for 90 % or more strains. +/- = variable reaction, weak, siow or negative. These sugar fermentation patterns refer to results achievable with a commercially available diagnostic kit for the identification of lactic acid bacteria. See Annex B.</p>				

Fuente: ISO 7889/IDF 117.2003

Principales características de *S.thermophilus*

Attributes	Appearance	Remarks
Morphology	Spherical or ovoid cells in pairs or long chains, strong polymorphism in old cells	
Catalase reaction	-	
Growth at 10 C ± 1 °C Growth at 45 C ± 1 °C	- +	Lactococci grow at 10 °C Lactococci do not grow at 45 °C, Group D streptococci grow at both 10°C and 45 °C.
Reaction on Litmus milk — rapid acidification — coagulation — very slow and often incomplete	A C	Lactococci and Group D streptococci react RAC.
Reduction of litmus	R	
Growth in presence of NaCl (6,5 %)	-	<i>S. thermophilus</i> is very sensitive to sodium chloride. Group D streptococci can grow in the presence of 6,5 % NaCl.
+ =positive reaction for 90 % or more strains. - = reaction always negative.		

Fuente: ISO 7889/IDF 117.2003.

Anexo 3. "Enumeration of Bifidobacteria in fermented milk products – Guideline (CHR-Hansen, 2001)".

CHR HANSEN

Enumeration of Bifidobacteria in fermented milk products - Guideline

Technical bulletin P-11

This guideline describes media and methods for counting of Chr. Hansen's Bifidobacterium BB-12 as single strain and in different culture combinations in fermented milk. The method is based on Draft for International standard ISO/WD 1 IDF 220 but is adapted for counting of Bifidobacterium BB-12. This guideline can be used in combination with P-9 Guideline for sample preparation, dilution and plating of microorganisms in fermented milk products.

Bifidobacteria as single culture

Medium	MRS agar with addition of 5 ml of CyHCl stock solution* pr. liter of medium
Technique	Pour plate Anaerobic incubation, 37°C (99°F), 3 days

Bifidobacteria in products fermented with AB, BC, BY, ABC, ABT, ABY, BCT culture blends or with B mixed with mesophilic lactic acid bacteria.

Medium	MRS agar with addition of 5 ml CyHCl stock solution* and 2.5 ml Mupirocin stock solution** pr. liter of medium.
Technique	Pour plate Anaerobic incubation, 37°C (99°F), 3 days
Comments	All colonies are counted as bifidobacteria Mupirocine inhibit most lactic acid bacteria.

Generally it is always recommended to verify some of the colonies by microscopy to ensure that they represent the correct bacteria.

Abbreviations:

A: *Lactobacillus acidophilus*
B: Bifidobacteria
C: *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*
T: *Streptococcus thermophilus*
Y: Yoghurt culture with *Lactobacillus bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus*

P-11 Bifidobacteria enumeration mupirocin nov2007.doc/1:2

Chr. Hansen A/S, 10-12 Bøge Allé, DK-2970 Hørsholm. Tel: +45 45 747474. Fax: +45 45 748813. Web: chr-hansen.com

Enumeration of Bifidobacteria in fermented milk products - Guideline

Technical bulletin P-11

CHR. HANSEN

Preparation of media and stock solutions

Preparation of MRS agar:

Suspend 70 gram of MRS Agar powder (Difco 288210) in 1000 ml of distilled water. Heat to boiling point with frequent agitation until a complete solution is obtained. Distribute the medium into bottles and sterilise by autoclaving at 121 °C (250 °F) for 15 min.

pH after autoclaving: 6.5 ± 0.2 at 25 °C

The prepared MRS Agar may be stored dark for 3 months at 5 ± 3 °C.
Poured plates may be stored dark for 10 days at 5 ± 3 °C.

*Preparation of cystein hydrochloride (CyHCl) stock solution

Cysteine hydrochloride	10 g	Merck No 2839
Distilled water to make	100 ml	

Sterilise by autoclaving

The solution should be stored at room temperature. Shelf life is maximum 2 month and solution should be discarded if precipitated.

**Preparation of mupirocin stock solution:

Li-Mupirocin	100 mg	(www.lgcpromochem.com , art.no: EPM3806000)
Distilled water to make	10 ml	

Sterilize by filtration (0.45 µm)

If solution is not used immediately, distribute into small sterile cryotubes and keep the tubes at -20 °C.

Note: When adding different solutions to the agar, please note that the agar must be used immediately after preparation.

References:

DRAFT ISO/WD... I IDF 220 2007-01-23: Milk products - Enumeration of presumptive bifidobacteria - Colony count technique at 37 °C

The information contained herein is to our knowledge true and correct and presented in good faith. However, no warranty, guarantee or freedom from patent infringement is implied or inferred. This information is offered solely for your consideration and verification.

P-11 Bifidobacteria enumeration mupirocin nov2007.doc/2:2

Anexo 4. “*L.acidophilus*, *L. casei* and *Bifidobacteria* in fermented milk products – Guideline (CHR-Hansen, 2001)”.

L. acidophilus, L. casei and Bifidobacteria in fermented milk products - Guidelines

Method for counting probiotic bacteria

CHR HANSEN

Lactobacillus casei gives white, round colonies.

Comments The aerobic conditions prevent Bifidobacteria from growing
Lactobacillus acidophilus does not grow at 20°C (68°F).
Streptococcus thermophilus does not grow on MRS agar
All colonies are counted as *Lactobacillus casei*.

Bifidobacteria as single culture or mixed with other thermophilic lactic acid bacteria

Medium MRS-IM agar with glucose and addition of the solutions A, B and C as described later in this guideline.

Technique Pour plate
Anaerobic incubation, 37°C (99°F), 3 days

Comments All colonies are counted as bifidobacteria.
The solutions A, B and C inhibit most lactic acid bacteria.

Bifidobacteria mixed with mesophilic lactic acid bacteria

Medium MRS-IM agar with glucose and addition of the solutions A, B and C

Technique Pour plate
Anaerobic incubation, 43°C (109°F), 3 days

Comments All colonies are counted. An incubation temperature of 43°C (109°F) suppresses the mesophilic flora.

Generally it is always recommended to verify some of the colonies by microscopy to make sure that they represent the correct bacteria.

Preparation of MRS-IM agar:

Tryptone	10 g	Oxoid L 42
Yeast extract	5 g	Oxoid L 21
Tween 80	1 g	
di-Potassium hydrogen phosphate	2.6 g	Merck No 5104
Sodium acetate, 3 H ₂ O	5 g	Merck No 6267
di-Ammonium hydrogen citrate	2 g	Merck No 1154
Magnesium sulphate, 7 H ₂ O	0.2 g	Merck No 5882
Manganese(II)-sulphate, H ₂ O	0.05 g	Merck No 5960
Agar	13 g	SO-BI-GEL

Suspend the ingredients in 1000 ml distilled water. Boil to dissolve the medium completely. Dispense into bottles and sterilise by autoclaving at 121°C (250°F) for 15 min.

pH after sterilisation: 6.9 ± 0.1

L. acidophilus, L. casei and Bifidobacteria in fermented milk products - Guidelines

Method for counting probiotic bacteria

CHR HANSEN

Preparation of MRS-IM agar with maltose

1000 ml MRS-IM agar, which is melted and subsequently cooled to 47°C (117°F) ± 1°C (34°F), is added:
100 ml sterile 20% maltose solution

Preparation of 20% (w/v) maltose solution

Maltose	20 g
Distilled water to make	100 ml

Sterilise by filtration (0.45 µm)

Cold storage

Preparation of MRS-IM agar with glucose and solutions A, B and C added

1000 ml MRS-IM agar, which is melted and subsequently cooled to 47°C (117°F) ± 1°C (34°F), is added:

100 ml sterile 20% glucose solution

5 ml sterile solution of A

10 ml sterile solution of B

5 ml sterile solution of C

→ Preparation of 20% (w/v) glucose solution

Glucose	20 g
Distilled water to make	100 ml

Sterilise by filtration (0.45 µm)

Cold storage

Preparation of solution A

Dichloroxallin	10 mg	Sigma D-9016
Distilled water to make	100 ml	

Sterilise by filtration (0.45 µm)

Cold storage, shelf life max two weeks.

Preparation of Solution B

LiCl	2 g	Merck No 5679
Distilled water	18 g	

Stir continuously until it is completely dissolved.

Sterilise by filtration (0.45 µm)

Preparation of solution C

Cysteine hydrochloride	10 g	Merck No 2839
Distilled water to make	100 ml	

Sterilise by autoclaving

Cold storage, shelf life max two weeks

When adding sugar and/or different solutions to the agar, please note that the agar must be used right after preparation.

ABr/Probiotic counting/nov2001/3:4