

15
24/ 300627



UNIVERSIDAD LA SALLE

Escuela de Química
Incorporada a la U.N.A.M.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

"EVALUACION DEL MEDIO DE AGAR DE LEE PARA
LA DETERMINACION Y CUANTIFICACION DE
Lactobacillus bulgaricus Y Streptococcus thermophilus
EN YOGHURT."

Tesis Profesional

Que para obtener el título de:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P r e s e n t a :

Lia Celina Méndez Rodríguez



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE

	OBJETIVOS	1
	GENERALIDADES	2
CAPITULO 1	INTRODUCCION.....	4
	3.1 Historia del Yoghurt	4
	3.2 Producción	6
	3.3 Importancia de los Cultivos Iniciadores	10
	3.4 Función de <u>Streptococcus thermophilus</u> y <u>Lactobacillus bulgaricus</u> en el Yoghurt ...	12
	3.5 Recuento, aislamiento e identificación de <u>Streptococcus thermophilus</u> y <u>Lactobacillus</u> <u>bulgaricus</u>	17
CAPITULO 2	MATERIAL Y METODOS	25
	2.1 Material y Equipo	25
	2.2 Medios de Cultivo y Reactivos	28
	2.3 Muestras	34
	2.4 Metodología	35
	2.5 Procedimientos	38
CAPITULO 3	RESULTADOS	44
CAPITULO 4	DISCUSION DE RESULTADOS	49
CAPITULO 5	CONCLUSIONES	56
	BIBLIOGRAFIA	57

OBJETIVOS.

1. Determinar en el medio de Agar de Lee, las ventajas y desventajas que presenta para la cuantificación de Lactobacillus bulgaricus y Streptococcus thermophilus en Yoghurt, para ser utilizado en el control sanitario de este producto.

2. Cuantificar la presencia de Lactobacillus bulgaricus y Streptococcus thermophilus utilizando el agar de Lee, como agar de referencia para su cuantificación observando en que rangos de bacterias se encuentran estos productos en el mercado para tener una base que permita realizar un muestreo que nos lleve a su estandarización y con ello poder establecer una norma sanitaria que controle la calidad del Yoghurt, ya que no existe ninguna norma para este propósito.

GENERALIDADES.

La acidificación de la leche por medio de la fermentación, es uno de los métodos más antiguos para su preservación, impartiendo además, características organolépticas especiales que la favorecen y que la hacen del agrado del consumidor. (33)(38)

En varias partes del mundo hay diferentes métodos para lograr esta fermentación, denominándose a estos productos leches fermentadas. En esta categoría se encuentran: el kumiss, kefir, leche acidificada y yoghurt. Estos productos varían considerablemente en composición, sabor y textura, dependiendo de la naturaleza de los organismos fermentadores, el tipo de leche usada y el proceso de manufactura empleado. (19)(38)

El consumo del yoghurt se ha incrementado en varios países y su popularidad se ha propagado a través del mundo. (22)

Este aumento en la popularidad y consumo del Yoghurt se debe en gran parte por la introducción de una gran variedad de combinaciones con frutas y sabores que lo hacen

más agradable al paladar; además de sus conocidas propiedades nutricionales y terapéuticas, y en especial como tratamiento de desórdenes gastrointestinales.(6)(36)

Estas cualidades dependen de la naturaleza de los organismos fermentadores, que en el caso del Yoghurt se debe de tratar de Lactobacillus bulgaricus y Streptococcus thermophilus para que al producto se le pueda llamar Yoghurt, ya que como se ha mencionado, una de las diferencias entre los distintos tipos de leches fermentadas es el o los tipos de microorganismos utilizados para su obtención, de ahí la importancia de contar con metodología adecuada para efectuar un eficaz control de calidad en éstos que permita también poderlo diferenciar de leches acidificadas artificialmente.(13)(43)

INTRODUCCION.

1. HISTORIA DEL YOGHURT.

La elaboración de derivados lácteos, constituye toda una tradición, y un verdadero arte que se ha perfeccionado en el transcurso del tiempo, en las diferentes regiones impartándole en cada caso, su sello peculiar y característico.

El Yoghurt, es una leche ácida, cuya preparación data del año 5000 A.C. en la antigua Mesopotamia, fecha aproximada de la domesticación de la cabra. (38)

En los países del suroeste de Asia, y ciudades de Europa del sur, es un alimento o bebida tradicional, preparada con leche de búfala, vaca, burra, oveja o cabra (17). Sin embargo, su popularidad se ha extendido a Europa y a muchas otras partes del mundo, por lo que su consumo se ha venido incrementando en todas las ciudades en años recientes. Por lo anterior, es evidente que el Yoghurt juega un papel importante en la dieta, debido a su composición, en muchos países, principalmente en Bulgaria. (38)

El nombre que recibe este producto varía en cada país, tal como se puede observar en la tabla 1

TABLA 1
NOMBRES QUE RECIBE EL YOGHURT EN DIFERENTES PARTES
DEL MUNDO

NOMBRE TRADICIONAL	PAIS
Jugurt/Eyran	Turquia
Bussa	Turquestan
Kissel Mleka	Balcánico
Urgotnic	Montañas Balcánicas
Leben/Leban	Libano y algunos países árabes
Zabady	Egipto y Sudán
Mast/Dough	Irán y Afganistán
Roba	Irak
Dahi/Dadhi/Dahee	India
Mazun/Matzoo	Armenia
Tiacurti	Grecia
Cieddu	Italia
Mezzoradu	Sicilia
Tarho	Hungria
Fili	Finlandia
Filmjolk/Fillbunke/ Filbunk/Surmelk/ Taettemjolk/Tettemelk	Escandinavia
Skyr	Islandia
Yoghurt/Yogurt/Yaort/ Yourt/Yaourt/Yahourth/ Yogur/Yaghourt	En el resto del mundo "Y" es reemplazada por "J" en ocasiones

2. PRODUCCION

La palabra yoghurt proviene del vocablo turco "Jugurt". El producto original se elabora con leche de vaca concentrada por calentamiento largo a fuego directo, hasta en 2/3 de su volumen, se enfría y se añade una porción del yoghurt del día anterior como inóculo, dejando incubar a temperatura ambiente hasta la obtención de un coágulo firme.

Actualmente el yoghurt se prepara a nivel industrial científicamente controlado y es más sofisticado su proceso que el yoghurt producido en Balkanes. Se usa leche de vaca, en general muy descremada y a veces enriquecida con extracto seco por adición de leche en polvo, en una concentración de 2 a 3%; se homogeniza y calienta a 85-90° C por 15-30 minutos, enfriando a la temperatura de incubación de 41 °C siendo entonces inoculada con la mezcla de cultivos en proporción 1:1 de Lactobacillus bulgaricus y Streptococcus thermophilus. Cabe mencionar que el tratamiento térmico de la leche varía, desde una ordinaria pasteurización de 72 °C 15 segundos a 133 °C por un segundo, pero la práctica conveniente, a nivel industrial involucra un precalentamiento de la leche a 85 °C por 30 minutos para un proceso continuo.

Estos microorganismos tienen una relación simbiótica durante la manufactura del yoghurt. Causan que el pH disminuya durante el proceso, obteniéndose al final un pH entre 3.7 y

4.3, debido principalmente a la producción de ácido láctico (11). Además de este compuesto hay producción de diacetil, que da al yoghurt un sabor butírico, además de acetaldehído, que ayuda a dar a éste su sabor característico. (13)(20)(23)

La composición del yoghurt es aproximadamente la misma que la de la leche usada para su elaboración, aunque es obvio que esta variará considerablemente de acuerdo al tipo de Yoghurt. Con todos los métodos de fortificación el porcentaje de proteína es incrementado, por lo que el yoghurt puede tener, casi invariablemente, un mayor porcentaje de proteína que la leche. Esto se puede observar en la tabla 2. (6)(13)

TABLA 2. COMPOSICION NUTRICIONAL PROMEDIO DE LECHE Y YOGHURT

CONSTITUYENTE (unidades/100)	LECHE		YOGHURT	
	ENTERA	DESCREMADA	DE ALTO CONTENIDO DE GRASA	DE BAJO CONTENIDO DE GRASA
Caloría	67	36	72	64
Proteínas (g)	3.5	3.3	3.9	4.5
Grasas (g)	4.25	0.13	3.4	1.6
Carbohidratos (g)	4.75	5.1	4.9	6.5
Calcio (mg)	119	121	145	150
Fósforo (mg)	94	95	114	118
Sodio (mg)	50	52	47	51
Potasio (mg)	152	145	186	192

Por otro lado, se llevan a cabo importantes cambios cuantitativos en los azúcares, especialmente en los oligosacáridos, durante la fermentación y almacenamiento del yoghurt. En algunos casos hay disminución de azúcares como por ejemplo de lactosa, pero en cambio se observa un incremento de galactosa y glucosa. (26)(40)(41)(42)

En cuanto a los ácidos grasos presentes en la leche, los cultivos lácticos no sólo altera la proporción de estos, sino también pueden producir gran cantidad de ácidos grasos y disminuir ligeramente los niveles de colesterol en el plasma, ya que se ha demostrado que los metabolitos producidos por el *S. thermophilus* al fermentar la leche producen este efecto, aunque no de una forma muy significativa. (27)(30)

Por otra parte, los estudios epidemiológicos han indicado que el consumo de altos niveles de productos lácteos fermentados pueden reducir el riesgo de ciertos tipos de cáncer, no se sabe por completo el mecanismo de acción de estos microorganismos, pero se ha sugerido que los *Lactobacillos* inhiben la carcinogénesis en estos sistemas por inactivación o inhibiendo la formación de compuestos carcinógenos en el tracto gastrointestinal, aunque no se sabe cuáles. (6)(8)

Para que se obtengan buenos resultados en la

preparación del yoghurt es muy importante que la leche que se vaya a utilizar como materia prima esté libre de antibióticos. los cuales pueden inhibir el crecimiento de los microorganismos empleados para la fermentación, además de que pueden ocasionar otros problemas en la persona que vaya a ingerir esa leche. Estos antibióticos llegan a la leche por su administración a vacas con mastitis u otra enfermedad, y que son eliminados del organismo a través de la leche, de ahí la razón de que ésta pueda contenerlos.(35)

3. IMPORTANCIA DE LOS CULTIVOS INICIADORES DEL YOGHURT.

La calidad del yoghurt depende de la leche, los aditivos empleados, los cultivos iniciadores, las condiciones de cultivo y el subsecuente manejo del producto. Muchas de las variables que afectan su calidad, pueden ser reguladas con el análisis adecuado de la calidad de la materia prima, con el control rigido del saneamiento y las condiciones del cultivo. Una de las grandes variables, puede ser el cultivo iniciador. Los procesos modernos en la industria láctea dependen de la manufactura de cultivos comerciales que abastecen de iniciadores adecuados para los productos lacteos cultivados.

Las cepas se seleccionan de acuerdo a 6 parámetros principales: temperatura de crecimiento, actividad, producción de sustancias aromáticas, variabilidad de las cepas, viscosidad de los cultivos y su sensibilidad a los fagos. Las especies solas, rara vez son suficientes ya que la producción de ácido es mayor al usar una combinación de cepas resultando una mejoría que va desde las características deseables del producto hasta en el valor nutricional. Así la fermentación controlada de la leche cuando se usan iniciadores seleccionados, presenta una oportunidad extraordinaria para el estudio de las interacciones de estos microorganismos.

(10)(12)(39)

En el caso de un yoghurt terminado es de gran importancia detectar las cepas iniciadoras para así poderlo diferenciar de aquellas leches acidificadas artificialmente que aparezcan en el mercado con el nombre de yoghurt, en el cual la importancia de los cultivos lácticos reside en el fuerte desplazamiento del pH hacia la zona ácida que va unida a la producción de cantidades elevadas de ácido; esto es característico del grupo al cual pertenecen el Streptococcus thermophilus y el Lactobacillus bulgaricus, que son los responsables de los cambios cuantitativos de los azúcares presentes en la leche, especialmente de los oligosacáridos, durante la fermentación, además de la formación de acetaldehído y glicina, importantes para el desarrollo del sabor característico del yoghurt. (18)

Se ha observado que el Lactobacillus bulgaricus produce una o más sustancias con poder antimicrobiano que evitan el crecimiento y desarrollo de varios microorganismos, por lo que ésta es otra razón por la que es conveniente que se encuentren en forma viable en el yoghurt. (1)

4. FUNCION DE Streptococcus thermophilus y Lactobacillus bulgaricus EN EL YOGHURT.

Son los microorganismos esenciales para la producción del yoghurt, los cuales son capaces de inducir una fermentación láctica en la leche y cuajarla, proporcionando en el momento adecuado la acidez, aroma, sabor y textura deseada. (38)

La participación de las bacterias lácticas en la elaboración de productos lácteos ha tenido auge a nivel industrial, de allí que se ha intensificado el estudio del yoghurt y desde el punto de vista microbiológico se tienen problemas para poner de manifiesto la proporción de los cultivos. Para obtener el óptimo en consistencia, sabor y olor, muchos investigadores afirman que estas especies debieron estar presentes en casi igual número en el cultivo, ya que la predominancia de una de las especies, altera las características del producto. De acuerdo con Davis y colaboradores el yoghurt comercial del hoy contiene aproximadamente igual proporción de Streptococcus thermophilus y Lactobacillus bulgaricus. Stoklin recomienda que la relación de cocos y bacilos puede ser mantenida en 1.1 ó 1.2. Platt describió un proceso continuo para la manufactura del yoghurt usando igual proporción (en términos de relación del inóculo). Pette y Lolkema reportaron que es deseable una relación de

cocos y bacilos de 1:1 en el producto terminado. Sellars y Babel recomendaron una relación similar. Schulz y Hingst reportaron que para un sabor típico de acetaldehído en el yoghurt, los cocos y bacilos deben tener una relación 3:1. Pette y Lolkema reportaron después que la proporción de los cultivos lácticos en el final es influenciado por la temperatura, acidificación del cultivo y relación del inóculo. (21)(22)

La observación de una relación simbiótica entre Streptococcus thermophilus y Lactobacillus bulgaricus en los cultivos iniciadores del yoghurt fue primeramente reportado por Orla-Jansen. Pette y Lolkema quienes observaron producción de acidez mas rápida por la mezcla de cultivos que por las cepas solas, debido al incremento en el número de estreptococos. Ello demuestra que se activa el crecimiento de S. thermophilus por factores estimulantes producidos por L. bulgaricus. Bautista y colaboradores, confirmaron que el Lactobacillus bulgaricus estimula al Streptococcus thermophilus y concluye que la glicina e histidina son los aminoácidos esenciales. Accolas y colaboradores estimularon el crecimiento con valina, leucina, histidina e isoleucina. Brackuart y colaboradores concluyeron que la omisión de Acido glutámico, valina, leucina, histidina y triptofano en el medio de crecimiento reduce la estimulación a un 50%. Galesloot investigó al respecto y obtuvo en conclusión que S.

thermophilus bajo condiciones anaerobias produce sustancias estimulantes para L. bulgaricus y una de ellas es el ácido fórmico. Además, después del tratamiento normal de la leche usada para yoghurt (85-90 °C), L. bulgaricus necesita definitivamente el factor estimulante producido por E. thermophilus. Veringa y colaboradores comprobaron que es el ácido fórmico el factor estimulante de L. bulgaricus. Higashio y colaboradores concluyen que además del ácido fórmico, el ácido pirúvico, también estimula a L. bulgaricus. (25)(31)(37)

Higashio y colaboradores concluyeron que algunos péptidos y aminoácidos libres no aromáticos resultantes de la digestión enzimática de la caseína o el hidrolizado tripsínico de la caseína pueden estimular a E. thermophilus (14)(34). Weinman y colaboradores sugirieron que L. bulgaricus puede ser estimulado por purina, adenina, guanina, uracilo, y adenosina.

Moon y Reinbold demostraron que E. thermophilus puede inhibir a L. bulgaricus en la fase exponencial y estacionaria por limitación de nutrientes en el medio ya que es mejor competidor. (25)

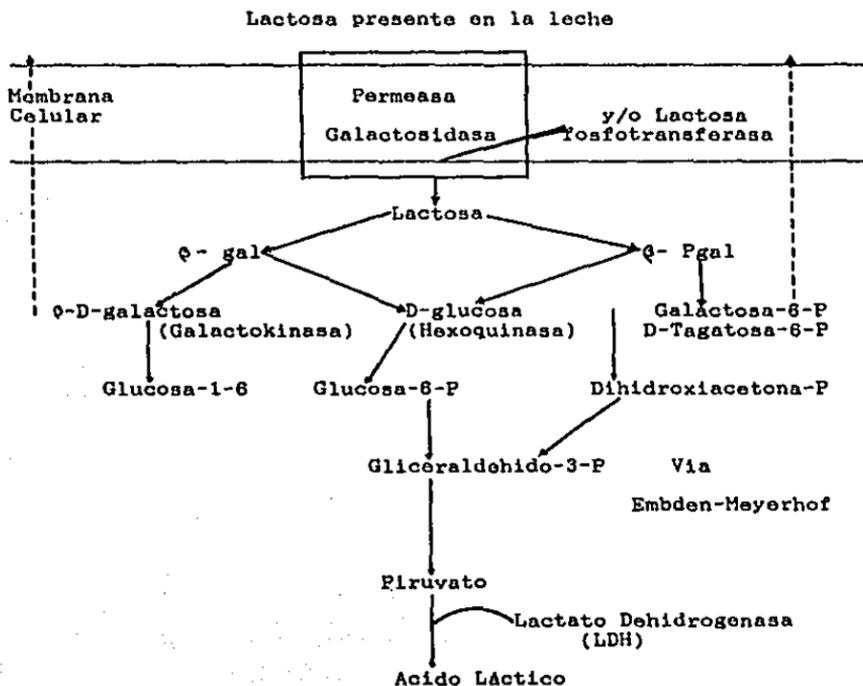
Otros factores que influyen en la relación simbiótica de estas especies son los sólidos totales y el tratamiento dado a la leche. Sellars y Babel (1978) notaron variaciones en la actividad de los medios de cultivo en diferentes leches (reconstituidas o frescas) usadas para su propagación. El porcentaje de sólidos no grasos, presencia o

ausencia de grasa y la concentración de sales minerales pueden influir en los niveles de producción de ácido por los microorganismos, y en el sabor y aroma desarrollados. (25)

El mecanismo más posible de la utilización de Lactosa por *S. thermophilus* y *L. bulgaricus*, por medio del cual se obtiene el ácido Láctico, es el siguiente:

Fig.1.

METABOLISMO DE LA LACTOSA EN EL *Streptococcus thermophilus*
y *Lactobacillus bulgaricus*.



5. RECUENTO, AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE Streptococcus thermophilus y Lactobacillus bulgaricus.

Debido a la importancia de mantener un equilibrio entre cocos y bacilos, hay necesidad de técnicas para determinar las proporciones relativas de S. thermophilus y L. bulgaricus cuando crecen juntos en la leche.(24)

Por otro lado la mecanización a gran escala y en consecuencia el acortamiento en los tiempos de producción se traducen en la disminución de los costos de operación, por lo mismo se da enorme importancia al diseño de métodos lo suficientemente confiables que permitan la obtención del producto final con las cualidades requeridas. Por medio de un examen microscópico se puede determinar la relación de estos microorganismos en el yoghurt, pero esta técnica no es suficiente, ya que las células muertas no pueden ser distinguidas de las vivas, por lo que este método se considera inadecuado (4). Existe un número elevado de caldos y medios de cultivos para la cuantificación o diferenciación de las bacterias ácido lácticas, lo cual da indicio de las dificultades existentes para su aislamiento, debido principalmente a las exigencias en cuanto a componentes nutricionales complejos requeridos por estos microorganismos, que van desde los carbohidratos, factores presentes en hidrolizados diversos hasta determinadas vitaminas, aminoácidos, bases púricas o pirimidicas o bien iones

orgánicos.

La posición taxonómica del Streptococcus thermophilus y del Lactobacillus bulgaricus se encuentra en la tabla 3.

Streptococcus thermophilus es uno de los estreptococos lácticos más difícil de cultivar ya que necesita factores diversos estimulantes del crecimiento que son vitaminas como el ácido pantoténico, la riboflavina y biotina y por lo menos 4 aminoácidos. Además requiere pequeñas concentraciones de calcio y disacáridos como la sacarosa y lactosa como fuentes de carbono. Guss y Delwiche obtuvieron su crecimiento en un medio con sacarosa o bien en digeridos tripticos de caseína y atribuyeron sus resultados a la naturaleza peptídica de los compuestos liberados en la hidrólisis. (2)(24)

Sus características bioquímicas se pueden observar en la tabla 4 y su morfología colonial y microscópica en la tabla 6.(1)

Lactobacillus bulgaricus es un microorganismo muy inestable; su principal factor estimulante nutricional es la riboflavina. (34)

Las condiciones de incubación y pH son otros de los factores importantes en el aislamiento de estas bacterias. Son anaerobios facultativos y no poseen sistema de citocromo, por lo que su desarrollo es mejor en atmósferas reducidas de CO_2 que son suministradas por $\text{N}_2 + \text{CO}_2$ ó $\text{H}_2 + \text{CO}_2$ en ausencia de O_2 la mayoría de las cepas son acidúricas y el pH óptimo está entre 5.4 y 8.8. (22)(32)

Sus características bioquímicas se pueden observar en la tabla 5 y su morfología colonial y microscópica en la tabla 8.

TABLA 3

POSICION TAXONOMICA DEL Streptococcus thermophilus y Lactobacillus bulgaricus.

Familia	Anaerobiosis	Género	Grupo	Especies principales	Observaciones
Streptococcaceae	facultativa	<u>Streptococcus</u>		<u>S. pneumoniae</u> <u>S. pyogenes</u> , <u>agalactiae</u> , <u>uberis</u>	parásitos patógenos
			piógeno	<u>S. lactis</u> , <u>cremoris</u> , <u>diacetylactis</u>	
			láctico	<u>S. thermophilus</u> , <u>bovis</u>	Fermentos lácticos
		<u>Pediococcus</u>	termófilo	<u>S. faecalis</u> , <u>liquefaciens</u>	especies de los mostos
		<u>Leuconostoc</u>	enterococos	<u>P. cerevisiae</u> <u>L. citrovarum</u> , <u>kefir</u>	Fermentos lácticos
Lactobacillaceae	estricta	<u>Peptostreptococcus</u>	mesófilo	<u>Ps. anaerobius</u> , <u>foetidus</u> <u>L. casei</u> , <u>plantarum</u> , <u>leichmannii</u>	parásitos
			Termófilo	<u>L. lactis</u> , <u>helveticus</u> , <u>bulgaricus</u> , <u>acidophilus</u> , <u>delbrueckii</u>	Fermentos lácticos
	facultativa	<u>Lactobacillus</u>	mesófilo	<u>L. brevis</u> , <u>pastorianus</u> <u>L. fermenti</u> , <u>caucasicum</u>	
	estricta	<u>Eubacterium</u> <u>Catenobacterium</u> <u>Ramibacterium</u> <u>Cillobacterium</u>		parásitos patógenos	

TABLA 4.

CARACTERISTICAS BIOQUIMICAS DEL

Streptococcus thermophilus

PRUEBA BIOQUIMICA	RESULTADO
- Fermentación de Glucosa	(+)
- Fermentación de Sacarosa	(+)
- Fermentación de Raffinosa	(-)
- Fermentación de Galactosa	(-)
- Fermentación de Xilosa	(-)
- Hidrólisis de Gelatina	(-)
- Hidrólisis de Almidón	(+)
- Hidrólisis de Hipurato	(-)
- Hidrólisis de Esculina	(-)
- Hidrólisis de Arginina	(-)
- Crecimiento a 15°C	(-)
- Crecimiento a 37°C	(+)
- Crecimiento a 45°C	(+)
- Catalasa	(-)

Ref. (3)(5)

TABLA 5

CARACTERISTICAS BIOQUIMICAS DEL
Lactobacillus bulgaricus

PRUEBA BIOQUIMICA	RESULTADO
- Fermentación de glucosa	(+)
- Fermentación de Trealosa	(-)
- Fermentación de fructuosa	(+)
- Fermentación de Lactosa	(+)
- Fermentación de Galactosa	(+)
- Fermentación de Sacarosa	(-)
- Fermentación de Arabinosa	(-)
- Fermentación de Celobiosa	(-)
- Hidrólisis de Esculina	(-)
- Fermentación de Celobiosa	(-)
- Crecimiento a 15°C	(-)
- Crecimiento a 37°C	(+)
- Crecimiento a 45°C	(+)
- Catalasa	(-)

Ref. (3)(5)

TABLA 6.

CARACTERISTICAS	<i>S. thermophilus</i>	<i>L. bulgaricus</i>
Color	Amarilla	beige
Tamaño	4 mm	5 mm
Forma	Redonda	Redonda
Bordes	Irregulares	Irregulares
Elevación	Còncava	plano-convexa
Aspecto	Húmedo	Húmedo
Consistencia	Butirosa	Butirosa
Luz Transmitida	Opaca	Opaca
Luz Reflejada	Brillante	Brillante
Gram	Cocos Gram (+)	Bacilos Gram (+)

Lee y colaboradores desarrollaron un medio de agar para la cuantificación diferencial de bacterias iniciadoras de yoghurt. Al desarrollar este medio se estudió, cuidadosamente la fermentación de los carbohidratos de varios cocos y bacilos. Con una apropiada combinación de sacarosa y lactosa, la producción de ácido por S. thermophilus es estimulada, cuando solo una cantidad muy limitada de azúcar utilizable (lactosa) para L. bulgaricus es aprovechada, la producción de ácido por el bacilo es restringido. Sin embargo la cantidad de lactosa, es ajustada de forma que se favorezca la formación de buenas colonias en el agar. (22)

Para la detección visual de los diferentes niveles de fermentación, se utiliza un indicador que es el púrpura de bromocresol, además se agrega al agar carbonato de calcio, el cual previene la difusión del ácido através del medio y localiza el ácido producido por cada colonia. (5)(26)

MATERIAL Y METODO.

1) MATERIAL Y EQUIPO.

Estufa a 15° C, 37° C y 45° C.

Balanza analitica.

Balanza Granataria.

Autoclave.

Cuenta colonias Solbat. Aparatos Cientificos.

150 Cajas Petri.

750 Tubos de Ensaye.

16 Espátulas.

15 Varillas.

350 pipetas de dos mililitros.

1 Pipeta de 10 ml.

2 Mecheros.

2) Medios de Cultivo y Reactivos.

a) Medios de Cultivo.

AGAR LEE

TRIPTONA	10.0 g
EXTRACTO DE LEVADURA	10.0 g
LACTOSA	5.0 g
SACAROSA	5.0 g
CARBONATO DE CALCIO	3.0 g
FOSFATO DIPOTASICO	0.5 g
PURPURA DE BROMOCRESOL	0.2 g
AGAR	18.0 g
AGUA DESTILADA	1000 ml

Ref. (22)

PREPARACION.

Se disuelven los ingredientes en agua destilada con calentamiento suave, ajustando el pH del medio a 7.0 ± 0.2 antes de la esterilización, la cual se efectúa por 20 minutos a 15 lb de presión y a 121°C . Ya finalizada, cuidadosamente se enfría a 45°C el medio fundido, y se vacía en cajas estériles, obteniendo una capa de 4-5 mm de espesor.

A G A R M R S
(Man Ragossa Sharp)

PEPTONA	10.0 g
EXTRACTO DE CARNE	10.0 g
EXTRACTO DE LEVADURA	5.0 g
GLUCOSA	20.0 g
BORBITAN- mono oleato twen 80	1.0 ml
ACETATO DE SODIO TRIHIDRATADO	5.0 g
CITRATO DIAMONICO	2.0 g
SULFATO DE MAGNESIO HEPTAHIDRATADO	0.2 g
SULFATO DE MANGANESO TETRAHIDRATADO	0.05 g
AGAR	18.0 g
AGUA DESTILADA	1000 ml
	ref. (4)

PREPARACION:

Se disuelven los componentes en agua hirviendo.

Se enfrían a 50°C y se agrega ácido acético glacial para ajustar el pH a 5.4.

Transferir porciones de 100 ml. en frascos con capacidad de 250 ml.

Se esteriliza en autoclave a 121° C (15 lb de presión) durante 20 minutos.

Tanto para la elaboración de las cajas que contengan el agar de Lee o el agar MRS, se dejan en una estufa a 37° C por 24 horas. esto por dos razones:

- 1) Para comprobar que el medio esté estéril y
- 2) Evitar que se forme el agua de condensación dentro de las cajas.

Este procedimiento último se siguió para todas las cajas con que se trabajó en este estudio.

b) Solución Amortiguante de Fosfatos.

Solución stock:

KH_2PO_4	34 g.
Agua destilada	500 ml.

PROCEDIMIENTO.

Disolver el fosfato en agua destilada y ajustar el pH a 7.2 con hidróxido de sodio 1N. Llevar a un litro con agua destilada. Esterilizar durante 20 minutos a 121 C (15 lb de presión). Conservar en refrigeración. Tomar 1.25 ml de solución stock y llevar a un litro con agua destilada, ésta es la solución de trabajo.

c) Para la realización de la identificación bioquímica de los microorganismos estudiados, se utilizaron los siguientes medios:

1. PARA IDENTIFICAR Lactobacillus bulgaricus.

CALDO MRS

(Man Ragossa Sharp)

PEPTONA	10.0 g
CARBOHIDRATO	20.0 g
EXTRACTO DE LEVADURA	5.0 g
TWEEN 80	1 ml
K_2HPO_4	2.0 g
$CH_3COONa_2 \cdot 3H_2O$	5.0 g
$MgSO_4 \cdot H_2O$	0.2 g
$MnSO_4 \cdot H_2O$	0.05 g
ROJO DE CLOROFENOL (0.2%)	20 ml
AGUA DESTILADA	1000 ml

(Ref.4)

PREPARACION

Disolver los ingredientes en agua destilada. Ajustar el pH 6.2 - 6.5. Esterilizar a 115 C durante 20 minutos ó 121 C durante 15 minutos (a 15 lb de Presión).

Los carbohidratos utilizados para asegurar la identidad del Lactobacillus bulgaricus fueron:

1. GLUCOSA
2. TREALOSA
3. FRUCTOSA
4. LACTOSA
5. GALACTOSA
6. SACAROSA

2. PARA IDENTIFICAR Streptococcus thermophilus

CALDO BASE DE LEE.

TRIPTONA	10.0 g
EXTRACTO DE LEVADURA	10.0 g
CARBOHIDRATO	10.0 g
CARBONATO DE CALCIO	3.0 g
FOSFATO DIPOTASICO	0.5 g
PURPURA DE BROMOCRESOL	0.2 g
AGUA DESTILADA	1000 ml

(Ref. 22)

PREPARACION.

Se disuelven los ingredientes en agua destilada con calentamiento suave, ajustando el pH del medio a 7.0 ± 0.2 antes de la esterilización, la cual se efectúa por 20 minutos a 121°C (a 15 lb de presión).

Se prepara el caldo basal como se indica, agregándose el carbohidrato que se desee para la identificación del microorganismos estudiado en la cantidad ya indicada.

Los carbohidratos utilizados en este caso fueron:

1. GLUCOSA
2. SACAROSA
3. RAFFINOSA
4. XILOSA
5. GALACTOSA

3) Muestras:

Para el estudio, se analizaron 5 marcas diferentes de yoghurt, que fueron las siguientes:

- 10 yoghurts marca Darel
- 10 yoghurts marca Delsa
- 10 yoghurts marca Chambourcy
- 10 yoghurts marca Danone
- 10 yoghurts marca Alpura

Todos los Yoghurts eran al natural, es decir, no contenían ni sabían a alguna fruta.

Para efectuar el estudio a cada yoghurt se le manejó asignándole una clave, las cuales fueron:

MARCA	YOGHURT
1	DANONE
2	CHAMBOURCY
3	DELSA
4	ALPURA
5	DAREL

MUESTREO.

Durante el muestreo, el único parámetro que se siguió fue que el Yoghurt a analizar no hubiera llegado a su fecha de caducidad.

METODOLOGIA.

1) Preparación de la muestra.

Las muestras que se analizaron eran semiliquidas por lo que se agitaron para homogenizarlas antes de abrirlas y con la ayuda de unas tijeras estériles se quitaron las tapas o lo que cubriera al producto.

Se pesó 1 gr. de la muestra y se le agregó 9 ml de de solución amortiguante de pH 7. Se homogenizó durante 1 minuto manualmente esta suspensión correspondió a la dilución 1:10.

Es muy importante que la muestra esté en contacto con la solución diluyente menos de 20 minutos, puesto que pasado este tiempo, la cantidad de microorganismos en la muestra empieza a disminuir.(18)

Se continuaron las diluciones decimales transfiriendo por medio de pipetas estériles 1 ml. del homogenizado a 9 ml. de solución diluyente, tal como se

muestra en el esquema 2.

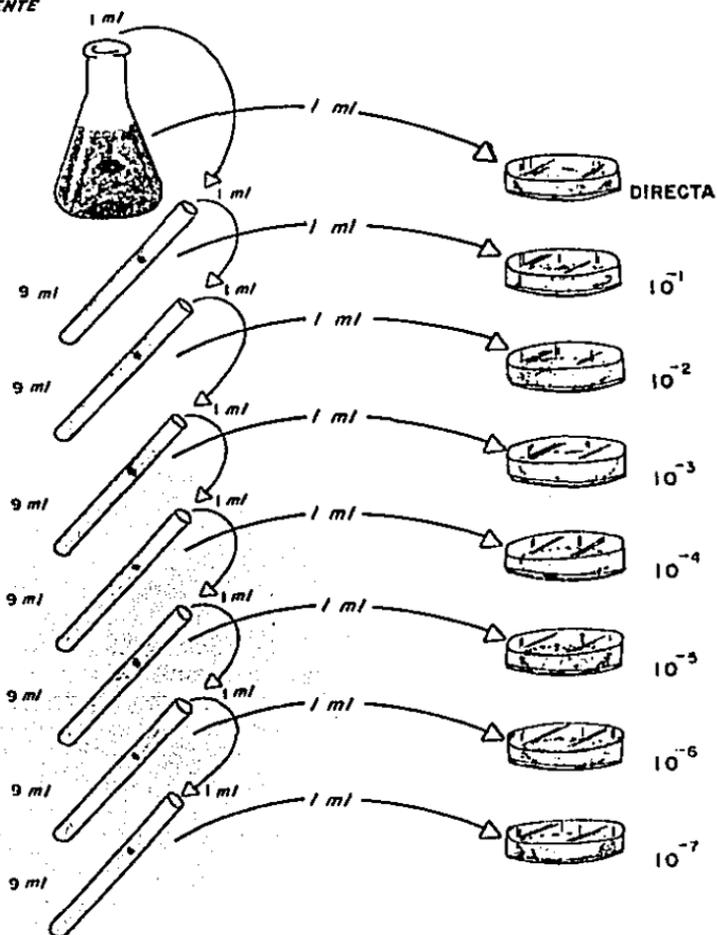
Se hicieron por cada muestra 7 diluciones, las cuales fueron necesarias para obtener en la cajas cuentas que oscilaran entre 30 y 300 colonias.

El procedimiento se encuentra esquematizado en la figura 2.

VOLUMEN
DEL
DILUYENTE

VOLUMEN INOCULADO

DILUCION



ESQUEMA 2 PREPARACION DE DILUCIONES E INOCULACION DE CAJAS.

PROCEDIMIENTO.

Ya realizadas las diluciones, se transfirió 1 ml de las últimas cuatro diluciones en cajas petri que ya contenían el agar de Lae; así como se muestra en el esquema 2.

Se evitó todo tipo de contaminación con los bordes de las cajas petri y tubos.

En el momento de vaciar el contenido de la pipeta al medio fué necesario dejar un pequeño espacio entre el medio y la pipeta para no romper el medio.

Se usó una pipeta para cada dilución.

Con una varilla doblada estéril se extendió la muestra uniformemente sobre el agar, hasta que esta se hubiera secado.

Se incubaron las placas en una atmósfera parcial de CO durante 48 horas a 37°C. Esto se logró utilizando una caja de anaerobiosis dentro de la cual se colocan las cajas ya sembradas. Antes de cerrarla, se coloca y se prende una vela, la cual se apaga cuando la cantidad de oxígeno ya no es suficiente para que continúe prendida.

Transcurridas las 48 horas, se escogieron las cajas con la dilución que tuviera entre 30 y 300 colonias para leer, para así obtener un promedio del número de Lactobacillus bulgaricus y Streptococcus thermophilus que debe haber en una muestra de yoghurt. Las colonias se diferenciaron, por morfología colonial y microscópica, guiándose con la reportada en la bibliografía y que ya se ha mencionado en la introducción,

Las colonias típicas se reanalaron por separado. El Lactobacillus bulgaricus en el agar MRS, que es especial para su desarrollo y el Streptococcus thermophilus en agar de Lec por haberse observado que se desarrollaba perfectamente en él, ya que es difícil su desarrollo en otros medios.

La comprobación de la identidad de los microorganismos manejados se hizo empleando las siguientes pruebas bioquímicas:

1) Para Lactobacillus bulgaricus:

PRUEBA BIOQUIMICA

- Fermentación de glucosa
 - Fermentación de Trealosa
 - Fermentación de fructuosa
 - Fermentación de Lactosa
 - Fermentación de Galactosa
 - Fermentación de Sacarosa
 - Crecimiento a 15°C
 - Crecimiento a 45°C
 - Catalasa
-

Tabla tomada de Alais, Ch. Ciencia de la leche (3)

2) Para Streptococcus thermophilus:

PRUEBA BIOQUIMICA

- Fermentación de Glucosa
 - Fermentación de Sacarosa
 - Fermentación de Raffinosa
 - Fermentación de Galactosa
 - Fermentación de Xilosa
 - Crecimiento a 15°C
 - Crecimiento a 45°C
 - Catalasa
-

Tabla tomada de Alais, Ch. Ciencia de la leche (3)

La prueba de catalasa realizada a los 2 microorganismos estudiados se puede realizar de 2 formas:

PROCEDIMIENTO

1. Cubrir la placa de cultivo con el peróxido de hidrógeno al 35%. observar la formación de burbujas. Las colonias que no presenten formación de gas son catalasa negativa.
2. Transferir con un asa, una pequeña porción de la colonia seleccionada para ser estudiada, a una gota de peróxido de hidrógeno en un portaobjetos y observar la formación de burbujas.

En este caso se utilizó el segundo procedimiento para asegurarse de que la colonia escogida obtuviera el resultado esperado.

El crecimiento a las 2 temperaturas observadas (45 y 15 C) se efectuó escogiendo de las cajas las colonias que cumplieran con la morfología indicada, se sembraron en Agar Lee los Streptococcus thermophilus y en Agar MRS Lactobacillus bulgaricus y se observó, si ha dichas temperaturas había crecimiento.

Para diferenciar el L. bulgaricus del S. thermophilus se hizo mediante la morfología colonial y microscópica de estos microorganismos las cuales debían corresponder a las características que se presentan en el siguiente cuadro:

CARACTERISTICAS	<u>S. thermophilus</u>	<u>L. bulgaricus</u>
Color	Amarilla	beige
Tamaño	4 mm	5 mm
Forma	Redonda	Redonda
Bordes	Irregulares	Irregulares
Elevación	Cóncava	plano-convexa
Aspecto	Húmedo	Húmedo
Consistencia	Butirosa	Butirosa
Luz Transmitida	Opaca	Opaca
Luz Reflejada	Brillante	Brillante
Gram	Cocos Gram (+)	Bacilos Gram (+)

RESULTADOS.

LECTURAS DEL *Streptococcus thermophilus* en el Agar de lee.

Millones de colonias/g.

MUESTRA	MARCA 1	MARCA 2	MARCA 3	MARCA 4	MARCA 5
1	152	168	113	410	99
2	86	149	47	216	432
3	105	510	36	560	298
4	340	830	484	671	912
5	550	568	200	240	524
6	477	1380	33	372	63
7	120	510	54	17	208
8	1280	280	540	246	448
9	390	14	420	194	188
10	196	38	140	368	354

LECTURAS DE *Lactobacillus bulgaricus* en el Agar de Lee.

Millones de colonias/g

MUESTRA	MARCA 1	MARCA 2	MARCA 3	MARCA 4	MARCA 5
1	325	110	58	116	33
2	35	68	33	57	148
3	40	220	14	183	118
4	174	320	360	223	620
5	660	230	141	80	440
6	376	830	13	100	21
7	64	197	18	15	87
8	1120	140	360	88	338
9	70	5	200	49	54
10	72	10	69	96	130

CUENTA TOTAL DE Lactobacillus bulgaricus y Streptococcus thermophilus en el Agar de Lee.

Millones de colonias/g

MUESTRA	MARCA 1	MARCA 2	MARCA 3	MARCA 4	MARCA 5
1	222	278	169	526	132
2	121	217	80	273	580
3	145	730	50	743	414
4	514	1150	844	894	1532
5	1210	798	341	320	964
6	853	2210	46	472	84
7	184	707	65	32	285
8	2400	420	900	334	786
9	715	19	620	243	242
10	288	48	209	464	484

b) En cuanto a la utilización del agar de Lee se observó que las colonias si corresponden a la morfología esperada, teniendo algunos problemas que se discuten en el siguiente capítulo.

c) En cuanto a las pruebas bioquímicas, se escogieron de cada caja 3 colonias que cumplieran con la morfología colonial indicada en la bibliografía, obteniendose un 98% de concordancia con los resultados esperados.

Los resultados de las bioquímicas, fueron los siguientes:

1) Para Streptococcus thermophilus.

PRUEBA	BIOQUIMICA	RESULTADO
-	Fermentación de Glucosa	(+)
-	Fermentación de Sacarosa	(+)
-	Fermentación de Raffinosa	(-)
-	Fermentación de Galactosa	(-)
-	Fermentación de Xilosa	(-)
-	Crecimiento a 15 C	(-)
-	Crecimiento a 45 C	(+)
-	Catalasa	(-)

2) Para Lactobacillus bulgaricus

PRUEBA	BIOQUIMICA	RESULTADO
-	Fermentación de glucosa	(+)
-	Fermentación de Trealosa	(-)
-	Fermentación de fructuosa	(+)
-	Fermentación de Lactosa	(+)
-	Fermentación de Galactosa	(+)
-	Fermentación de Sacarosa	(-)
-	Crecimiento a 15 °C	(-)
-	Crecimiento a 45 °C	(+)
-	Catalasa	(-)

DISCUSION DE RESULTADOS.

A los datos obtenidos de la cuenta de Lactobacillus bulgaricus, Streptococcus thermophilus y por consiguiente de la suma de ambos, se les realizó un tratamiento estadístico para observar que tan significativos eran estos datos para que a partir de ellos se indique el número de colonias que puede contener un yoghurt que se encuentre a la venta .

Se realizó un Análisis de Varianza por haberse realizado un muestreo aleatorio, es decir, en fechas distintas procurándose que fueran de lotes diferentes, para así desechar la posibilidad de analizar un solo lote que pudiera haber tenido problemas en el número de estos microorganismos desde un principio.

Los resultados fueron los siguientes:

A) *Lactobacillus bulgaricus*

a) Entre tratamientos.

Número de datos en total: 50

Número de datos en cada tratamiento: 10

FUENTE	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS DE LIBERTAD	VARIANZA	F	P
ENTRE TRATAMIENTOS	232855.0000	4	58213.750	1.189	0.329
ERROR RESIDUAL	2203473.000	45	48966.067		

b) En cada tratamiento.

	MEDIA	DESVIACION STANDART	INTERVALO DE CONFIANZA
MARCA 1	293.6	17.1347	259 - 328
MARCA 2	213.0	14.5945	184 - 242
MARCA 3	125.7	11.2116	103 - 148
MARCA 4	100.7	10.0349	81 - 121
MARCA 5	198.8	14.1031	171 - 227
TOTAL	186.38	13.6521	159 - 214

b) Streptococcus thermophilus

Número de datos en total: 50

Número de datos en cada tratamiento: 10

FUENTE	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS DE LIBERTAD	VARIANZA	F	P
ENTRE TRATAMIENTOS	298716.820	4	74679.230	0.842	0.506
ERROR RESIDUAL	3988825.400	45	88640.564		

b) En cada tratamiento.

	MEDIA	DESVIACION STANDAR	INTERVALO DE CONFIANZA
MARCA 1	369.6	19.2249	331 - 408
MARCA 2	444.7	21.0879	402 - 486
MARCA 3	207.7	14.4118	179 - 236
MARCA 4	329.4	18.1493	293 - 366
MARCA 5	353.4	18.7989	316 - 391
TOTAL	340.96	18.4651	304 - 378

c) SUMA DE *Lactobacillus bulgaricus* y
Streptococcus thermophilus.

Número de datos en total: 50

Número de datos en cada tratamiento: 10

FUENTE	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS DE LIBERTAD	VARIANZA	F	P
ENTRE TRATAMIENTOS	34821.720	4	208705.430	0.802	0.530
ERROR RESIDUAL	.117106E+08	45	260235.047		

b) En cada tratamiento.

	MEDIA	DESVIACION STANDAR	INTERVALO DE CONFIANZA
MARCA 1	663.2	25.7526	612 - 715
MARCA 2	657.8	25.6476	606 - 709
MARCA 3	333.4	18.2592	297 - 370
MARCA 4	430.1	20.7388	389 - 471
MARCA 5	552.3	23.5010	505 - 599
TOTAL	527.34	22.9638	481 - 573

Con estos resultados se puede observar que estadísticamente la diferencia no es significativa entre cada grupo, es decir, casi no hay diferencia entre los datos obtenidos entre las diferentes marcas, pero aunque tampoco se observe una diferencia significativa en un mismo grupo, se puede notar valores muy diferentes entre las cuentas de un mismo grupo, lo cual se puede deber a las siguientes razones:

- 1) A que en el muestreo hubo desde yoghurts recién salidos a la venta hasta yoghurts a punto de caducar.
- 2) Que el productor no lleve ningún control sobre el número de estos microorganismos en el producto, lo que puede ocasionar que haya muestras que contengan un número bajo, desde su producción

Debido a que se deseaba manejar adecuadamente el agar de Lee y su modo de uso, sólo se analizaron 50 muestras.

De todas maneras se puede observar que todas las cuentas caen en el rango de 10^6 por lo que podemos darnos cuenta del número de microorganismos que un Yoghurt tiene en el mercado, con lo cual se puede diseñar un método de muestreo y manejo del producto para así realizar un estudio estadístico que permita establecer una norma sanitaria.

En las muestras analizadas se encontró las siguientes medias:

1. Para Lactobacillus bulgaricus: 186×10^6 con un intervalo de confianza entre 159 a 214 millones de colonias/g
2. Para Streptococcus thermophilus: 341×10^6 con un intervalo de confianza de 304 a 378 millones de colonias/g.

Por otro lado, con lo que respecta al agar de Lee, se observó como ya se ha mencionado, que la morfología colonial coincide con la de la literatura, pero se encontró que al momento de leer las cajas, hay una cierta dificultad, ya que los Lactobacillus bulgaricus, solo se observan al incidir la luz en forma oblicua en el agar, es decir, no se llegan a distinguir muy claramente al observarse directamente sobre el cuenta colonias, aunque en si si hay una diferencia clara entre las colonias de L. bulgaricus y una colonia de S. thermophilus morfológicamente.

En la composición del medio de cultivo, este utiliza el indicador púrpura de bromocresol, el cual vira de rojo a púrpura al producirse una determinada cantidad de ácido por el Streptococcus thermophilus en el medio, esto es para que se pueda detectar las colonias de este microorganismo al realizarse el conteo de cada colonia y poderse diferenciar más fácilmente entre ellos; pero al momento de realizarse el análisis se encontró que este principio no se cumple del todo

cuando no se han controlado estrictamente las condiciones de incubación, ya que aunque si sucede el vire de color, el área que comprende no solo es alrededor del Streptococcus thermophilus sino que también se extiende y cubre el área de los Lactobacillus bulgaricus, en ocasiones cambiándose el color de casi toda la caja. Esto se puede deber a que hay una excesiva producción de ácido en toda la caja por lo que obviamente vira una zona mayor. Esto no dificulta la lectura de las cajas, ya que las colonias inmediatamente se distinguen morfológicamente.

La gran ventaja de este agar fue que permite el crecimiento de ambos microorganismos y que aunque presente las dificultades ya mencionadas al momento de la lectura, si es fácil distinguir una colonia de otra.

CONCLUSIONES.

De la evaluación realizada al medio de Agar de Leo, se concluyó que es un medio que contiene los sustratos necesarios para el crecimiento y desarrollo, tanto del Lactobacillus bulgaricus como del Streptococcus thermophilus, obteniéndose colonias fácilmente distinguibles entre sí, permitiendo por lo tanto realizar la determinación y cuantificación de estos microorganismos en un Yoghurt comercial, siempre y cuando se cumplan las condiciones adecuadas de temperatura y tiempo de incubación.

BIBLIOGRAFIA

- 1) ABDEL-BAR, N., N.D. HARRIS, AND R.L.RILL. 1987. Purification and Properties of an Antimicrobial Substance Produced by Lactobacillus bulgaricus. Journal of food Science. 52(2):411-415.
- 2) AKPEMADO, K.M. and P.A. BRACQUART. 1983. Uptake of Branched-Chain Amino Acids by Streptococcus thermophilus. Applied and Environmental Microbiology. 45(1):138-140.
- 3) ALAIS, CH. 1980. Ciencia de la Leche. Principios de Tecnica Lechera. 1a. Ed. Compañia Editorial Continental, S.A. México.
- 4) AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. 1978. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. 2a. Ed. American Public Health Association, Inc., Washington, D.C.
- 5) BUCHANAN, R.E. and N.E. GIBBONS. 1975. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 8th. Ed. Williams and Wilkins Co., Baltimore, U.S.A.
- 6) DEETH, H.C. and A.Y. TAMIME. 1981. Yogurt: Nutritive and Therapeutic Aspects. Journal of food protection. 44(1):78-86.
- 7) ESCARTIN, E. 1981. Microbiologia Sanitaria de Agua y Alimentos. vol.1. Universidad de Guadalajara, México.

- 8) FRIEND, B.A. and K. M. SHAHANI. 1984. Antitumor Properties of Lactobacilli and Dairy Products Fermented by Lactobacilli. Journal of Food Protection. 47(9):717-723.
- 9) FUJITA, T., MONK, R.P. and WADSO, I. 1978. Calorimetric identification of several strains of lactic acid bacteria. Journal of Dairy Research. 45:457-463.
- 10) GILLILAND, E.S. and H.S. KIM. 1984. Effect of Viable Starter Culture Bacteria in Yogurt on Lactose Utilization in Humans. Journal of Dairy Science. 47(1):1-6.
- 11) GIORI, G.S., G.F. de VALDEZ, A.P. de RUIZ HOLGADO and G. OLIVER. 1985. Effect of pH and Temperature on the Proteolytic Activity of Lactic Acid Bacteria. Journal of Dairy Science. 68(9):2180-2184.
- 12) GREENBERG, N.A. and R.R. MAHONEY. 1982. Production and Characterization of β -Galactosidase from Streptococcus thermophilus. Journal of Food Science. 47(6):1824-1828.
- 13) HAMANN, W.T., and MARTH, H.E. 1984. Survival of Streptococcus thermophilus and Lactobacillus bulgaricus in Commercial and Experimental Yogurts. Journal of Food Protection. 47(10):781-786.
- 14) HEMME, D., SCHMAL, V. and AUCLAIR, J. 1981. Effect of the addition of extracts of thermophilic lactobacilli on acid production by Streptococcus thermophilus in milk. Journal of Dairy Research. 48:139-148.

- 15) HITCHINS. A.D., F.E. Mc DONOUGH, N.P. WONG, and R.E. HARGROVE. 1983. Biological and Biochemical Variables Affecting the Relative Values for Growth and Feed Efficiency of Rats fed Yogurt or Milk. Journal of Food Science. 48(6): 1836-1840.
- 16) JENSEN. P.J and W.J. HAUSLER, JR. 1976. Contribution of KH_2PO_4 to Toxicity in Phosphate Buffered Dilution Water Systems. Journal of Milk Food Technology. 39(12):852-853.
- 17) KEHAGIAS. C.H. and T.N. DALLES. 1984. Bacteriological and Biochemical Characteristics of Various Types of Yogurt Made from Sheeps and Cow's Milk. Journal of Food Protection. 47(10):760-761
- 18) KOSIKOWSKI.F.V. 1981. Properties of Commercial Flavored Frozen Yogurts. Journal of Food Protection. 44(11):853-856.
- 19) LABROPOULOS.A.E., COLLINS W.F., and W.K.STONE. 1983. Effects of Ultra-High Temperature and Vat Processes in Heath-Induced Rheological Properties of Yogurt. Journal of Dairy Science. 67(2):405-408.
- 20) LEES, G.B. and JAGO, G.R. 1976. Formation of acetaldehyde from threonine by lactic acid bacteria. Journal of Dairy Research. 43:75-83
- 21) LEES, G.J and JAGO, G.R. 1978. Role of Acetaldehyde in Metabolism: A Review. 2. The Metabolism of Acetaldehyde in Cultured Dairy Products. Journal of Dairy Science. 61(9):1216-1224.

- 22) LEE .S.Y., E.R. VEDAMUTHU, C.J. WASHAM and G.W. REINBOLD. 1974. An Agar Medium for the Differential Enumeration of Yogurt Starter Bacteria. Journal of Milk Food Technology. 37(5):272-276.
- 23) MARSHALL, V. and W. COLE. 1983. Threonine aldolase and alcohol dehydrogenase activities in Lactobacillus bulgaricus and Streptococcus thermophilus and their contribution to flavour production in fermented milks. Journal of Dairy Research. 50:375-379.
- 24) MATALON, M. E. and W. E. SANDINE. 1986. Improved Media for Differentiation of Rods and Cocci in Yogurt. Journal of Dairy Science. 69(10):2569-2576
- 25) MOON, N.J. and G.W. REINBOLD. 1976. Commensalism and Competition in Mixed Cultures of Lactobacillus bulgaricus and Streptococcus thermophilus. Journal of Milk Food Technology. 39(5):337-341.
- 26) O'LEARY, V. J. WOYCHIK. 1976. Utilization of Lactose, glucose and Galactose by a Mixed Culture of Streptococcus thermophilus and Lactobacillus bulgaricus in Milk Treated with Lactase Enzyme. Applied and Environmental Microbiology. 32(1):89-94.
- 27) PULUSANI, S.R. and D.R. RAO. 1983. Whole Body, Liver and Plasma Cholesterol Levels in Rats fed Thermophilus, Lactobacillus and Acidophilus Milks. Jouran of Food Science. 48:280-281.

- 28) PULUSANI, S.R. and D.R. RAO. 1984. Stimulation by Formate of Antimicrobial Activity of Lactobacillus bulgaricus in Milk. Journal of Food Science. 49(2):652-653
- 29) RADKE-MITCHELL, L. and W E. SANDINE. 1986. Influence of Temperature on Associative Growth of Streptococcus thermophilus and Lactobacillus bulgaricus. Journal of Dairy Science. 69(10):2558-2568.
- 30) RAO, D.R., J.C. REDDY. 1984. Effects of Lactic Fermentation of Milk on Milk Lipids. Journal of Food Science. 49(3):748-750.
- 31) RAO, D.R., A.V. REDDY, S.R. PULUSANI, and P.E. CORNWELL. 1984. Biosynthesis and Utilization of Folic Acid and Vitamin B by Lactic Cultures in Skim Milk. Journal of Dairy Science. 67(6):1169-1174.
- 32) SALJI, P.J. and A.A ISMAIL. 1983. Effect of Initial Acidity of Plain Yogurt on Acidity Changes during Refrigerated Storage. Journal of Food Science. 48: 258-259
- 33) SELLARS, R.L. 1981. Fermented Dairy Foods. Journal of Dairy Science. 64(6):1070-1076.
- 34) SINGH, J and B. RANGANATHAN. 1978. A comparison of the activity of Lactobacillus bulgaricus and one of its mutants in different types of milk. Journal of Dairy Research. 45:123-125.
- 35) SOZZI, T. and SMILEY, M. 1980. Antibiotic Resistances

- of Yoghurt Starter Cultures Streptococcus thermophilus and Lactobacillus bulgaricus. 40(5):862-865.
- 36) SPECK, M.L. and J.W. GEOFFRION. 1980. Lactase and Starter Culture Survival in Heated and Frozen Yogurts. Journal of Food Protection. 43(1):26-28
- 37) SUZUKI, I., KATO, S., KITADA, T., YANO, N., and MORICHI, T. 1985. Growth of Lactobacillus bulgaricus in Milk. 1. Cell Elongation and the Role of Formic Acid in Boiled Milk. Journal of Dairy Science. 69(2):311-320.
- 38) TAMIME, A.Y. AND R.K. ROBINSON. 1985. Yoghurt. Science and Technology. 1a. Ed. Pergamon Press. England.
- 39) TERENCE, T., and V. CROW. 1984. Selection of Galactose-Fermenting Streptococcus thermophilus in Lactose-Limited Chemostat Cultures. Applied and Environmental Microbiology. 48(1):186-191.
- 40) TOBA, T., WATANABE, A. and S. ADACHI. 1983. Quantitative Changes in Sugars, Especially Oligosaccharides, during fermentation and Storage of Yogurt. Journal of Dairy Science. 68(1):17-20.
- 41) TOBA, T., ARIHARA, K. and ADACHI, S. 1986. Quantitative Changes in Oligosaccharides During Fermentation and Storage of Yogurt Inoculated Simultaneously with Starter Culture and β -Galactosidase Preparation. Journal of Dairy Science. 69(5):1241-1245.

42) TURNER, K. MARTLEY. 1983. Galactose Fermentation and Classification of Thermophilic Lactobacilli. Applied and Environmental Microbiology. 45(6):1932-1934

43) TROP, M. 1984. Simulation of Bacterial Fermentation of Milk and Possible Acylation of its Proteins by Acidogen Hydrolysis. 67(7):1381-1389.

44) WRIGHT, C.T. and T.R. KLAENHAMMER. 1983. Survival of Lactobacillus bulgaricus During Freezing and Freeze-Drying After Growth in the Presence of Calcium. Journal of Food Science. 48:773-777