



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**EVALUACIÓN DE LA VIABILIDAD DE PROBIÓTICOS DURANTE
LA VIDA DE ANAQUEL DE UN YOGURT FUNCIONAL**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA DE ALIMENTOS

P R E S E N T A

LAURA VILLARRUEL PARRA



México, D.F.

2011



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.

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE: Aurora Irma Ortegón Ávila

VOCAL: Martha Giles Gómez

SECRETARIO: Maricarmen Quirasco Baruch

1er. SUPLENTE: Norma Angélica Camacho de la Rosa

2° SUPLENTE: Valentín Gómez García

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:

Laboratorio 312, Departamento de Alimentos y Biotecnología, Conjunto E, Facultad de Química, UNAM, México, D.F.

ASESOR DEL TEMA:

Dra. Maricarmen Quirasco Baruch

SUPERVISOR TÉCNICO:

Dra. Carolina Peña Montes

SUSTENTANTE:

Laura Villarruel Parra

Agradecimientos

A Dios, por ser mi guía y por darme la fuerza necesaria para no rendirme en los momentos difíciles.

A mis padres Vicente y Laura Velia, por brindarme su apoyo en todo momento, por sus enseñanzas, sus consejos y todo el amor que me demuestran día a día. Gracias por esta familia tan maravillosa.

A mi hermano Alejandro, porque junto a él he compartido incontables alegrías y porque siempre ha sido un gran ejemplo para mí.

A la Dra. Maricarmen Quirasco, a quien admiro por su trayectoria profesional y por su gran calidad como persona. Agradezco su paciencia y orientación durante todo el proyecto.

A Dra. Carolina Peña, por su orientación tanto en el trabajo experimental como en la redacción de esta tesis.

A Verónica García, por sus enseñanzas y amistad.

A Rafael, por todo su amor, su apoyo y sobre todo por su habilidad innata para dibujar en mi rostro tantas sonrisas.

A mis abuelos y familiares, por todo su cariño y porque me desean lo mejor en todo momento.

A mi Universidad, por brindarme un poco del enorme conocimiento que dentro de ella se encuentra. Ha sido un gran orgullo para mí pertenecer a esta Institución.

A Valeria Juárez, por escucharme, ayudarme y aconsejarme cuando más lo he necesitado.

A Montserrat, Valeria y Stefanía, por los agradables momentos que hemos compartido.

A Hugo Ayala, por ser siempre un excelente compañero de trabajo y amigo. Espero que la vida nos brinde la oportunidad de volver a trabajar juntos.

A Cinthya Paola, Luisa, Mary, Alejandra y Verónica, por su agradable compañía y su valiosa amistad.

Dedico este trabajo a mis padres y a mi hermano...

...el mundo iluminado y yo despierta.

Sor Juana Inés de la Cruz

Contenido

AGRADECIMIENTOS	II
DEDICATORIAS	III
CONTENIDO	V
LISTADO DE FIGURAS	VII
LISTADO DE TABLAS	IX
RESUMEN	XI
CAPÍTULO I INTRODUCCIÓN Y MARCO TEÓRICO	1
1.1. Introducción	1
1.2. Marco teórico	2
1.2.1. YOGURT.....	3
1.2.1.1. Proceso de elaboración del yogurt.....	4
1.2.1.2. La microbiología y la bioquímica de la fermentación del yogurt	9
1.2.1.3. Aspectos nutricionales.....	11
1.2.1.4. Metodología para elaboración de yogurt simbiótico	11
1.2.2. BACTERIAS PROBIÓTICAS.....	13
1.2.2.1. Definición de probióticos	13
1.2.2.2. Beneficios a la salud.....	14
1.2.2.3. Dosis terapéutica.....	18
1.2.2.4. Criterios para la elección de cepas probióticas	19
1.2.2.5. Características de las cepas elegidas para el yogurt	21
1.2.2.6. Sustancias promotoras de crecimiento.....	23
1.2.3. MÉTODOS TRADICIONALES	23
1.2.3.1. Recuento en placa de bacterias probióticas.....	24
1.2.4. MÉTODOS MOLECULARES	25
1.2.4.1. Extracción de ADN	26
1.2.4.2. PCR Punto Final.....	29
1.2.4.3. PCR Tiempo Real	31
1.2.4.4. Monoazida de propidio (PMA)	36
CAPÍTULO II JUSTIFICACIÓN	39
CAPÍTULO III HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	41
3.1. Hipótesis	41

3.2. Objetivos	41
3.2.1. OBJETIVO GENERAL.....	41
3.2.2. OBJETIVOS PARTICULARES	41
CAPÍTULO IV METODOLOGÍA	43
4.1. Descripción de las muestras	45
4.1.1. INOCULACIÓN DE MICROORGANISMOS PROBIÓTICOS Y HOMOGENIZACIÓN	46
4.2. Métodos tradicionales	47
4.3. Métodos moleculares	49
4.3.1. TRATAMIENTO PARA RECUPERAR LAS CÉLULAS DEL YOGURT	49
4.3.2. EVALUACIÓN DE LA EFICIENCIA DEL REACTIVO PMA	51
4.3.3. EXTRACCIÓN DE ADN CON KIT FASTID	53
4.3.4. PCR TIEMPO REAL	55
4.3.5. CONSTRUCCIÓN DE CURVAS ESTÁNDAR	57
4.4. EVALUACIÓN DE LA VIABILIDAD DE PROBIÓTICOS DURANTE LA VIDA DE ANAQUEL DE UN YOGURT FUNCIONAL	58
CAPÍTULO V ANÁLISIS DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN	60
5.1. Métodos tradicionales	60
5.2. Métodos moleculares	65
5.2.1. TRATAMIENTO PARA RECUPERAR LAS CÉLULAS DEL YOGURT	65
5.2.2. EVALUACIÓN DE EFICIENCIA DEL REACTIVO PMA	67
5.2.3. EXTRACCIÓN DE ADN CON KIT FASTID	71
5.2.4. PCR TIEMPO REAL	72
5.2.5. CONSTRUCCIÓN DE CURVAS ESTÁNDAR	76
5.3. Evaluación de la viabilidad de probióticos durante la vida de anaquel de un yogurt funcional	78
CAPÍTULO VI CONCLUSIONES	87
ANEXO A SOLUCIONES, MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS EMPLEADOS ..	88
ANEXO B MÉTODOS DE RECUPERACIÓN CELULAR	91
ANEXO C TRATAMIENTO PARA ELIMINAR NO VIABLES EMPLEANDO PMA ..	95
ANEXO D METODOLOGÍAS DE MEDICIÓN DE PH Y ACIDEZ	97
ANEXO E CÁLCULO DE DOSIS TERAPEÚTICO	99
ANEXO F RESULTADOS DE EVALUACIÓN DE LA VIABILIDAD	100
REFERENCIAS	108

Listado de Figuras

Figura 1.1. Proceso de elaboración de yogurt batido.	4
Figura 1.2. Metodología para elaboración de yogurt.	12
Figura 1.3. Aspectos de seguridad para el empleo de probióticos.	20
Figura 1.4. Separación de fases durante la extracción de ADN empleando solventes orgánicos.....	27
Figura 1.5. Fases de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	30
Figura 1.6. Fases de PCR tiempo real. Determinación de Ct.....	32
Figura 1.7. Agente intercalante. SYBR Green.....	33
Figura 1.8. Elementos que componen sistema de sondas de hidrólisis o taqman. ...	34
Figura 1.9. Sondas de hidrólisis “Taqman” o actividad nucleasa 5´.	35
Figura 1.10. Gráfico de amplificación donde puede verse que las muestras diluidas superan el umbral más tarde.....	36
Figura 1.11. Principio de modificación del ADN por acción del PMA.....	38
Figura 4.1. Metodología general para cuantificación de microorganismos probióticos en yogurt.	43
Figura 4.2. Metodología para la cuantificación de microorganismos probióticos en yogurt por métodos tradicionales.	44
Figura 4.3. Metodología para la cuantificación de microorganismos probióticos en yogurt por métodos moleculares.	45
Figura 5.1. Morfología microscópica (A) <i>Lactobacillus casei</i> y (B) <i>Lactobacillus acidophilus</i>	62
Figura 5.2. Pérdida de viabilidad por exposición de <i>L. casei</i> a diferentes temperaturas por 15 min, evaluada por cuenta en placa.	69
Figura 5.3. Modificación de Ct como consecuencia del tratamiento térmico aplicado a células de <i>L. casei</i>	70
Figura 5.4. Curvas de amplificación de PCR tiempo real. (A) Células sin tratamiento térmico, (B) células tratadas a 50°C, (C) células tratadas a 60°C, (D) células tratadas a 70°C.	70

Figura 5.5. ADN total extraído de cultivos liofilizados: <i>Lactobacillus rhamnosus</i> I (R), <i>Lactobacillus casei</i> (C), <i>Bacillus subtilis</i> (S), <i>Bifidobacterium</i> (B), <i>Lactobacillus rhamnosus</i> II (O). Gel de agarosa al 1% (p/v) con 1µg/ml de BrEt. Vol. de carga: 5 µl de ADN total y 1 µl 6x orange. Marcador mas ruler de bajo rango de fermentas.....	71
Figura 5.6. Curvas de amplificación de NTC. No se observa contaminación.	74
Figura 5.7. Curva de amplificación del ADN de <i>L. casei</i> , (curvas 1 a 3). Las curvas 4 a 6 corresponden a la señal FAM, de la sonda para <i>L. acidophilus</i>	75
Figura 5.8. Curva de amplificación del ADN de <i>L. acidophilus</i> , (curvas 1 a 3). Las curvas 4 a 6 corresponden a la señal VIC, de la sonda para <i>L. casei</i>	75
Figura 5.9. Curva patrón por PCR tiempo real de <i>L. acidophilus</i> con una eficiencia de 105.86%.	76
Figura 5.10. Curva patrón por PCR tiempo real de <i>L. casei</i> con una eficiencia de 61.75%.	77
Figura 5.11. Curvas de amplificación de la curva patrón PCR tiempo real de <i>L. casei</i> (Duplicados de extracción de ADN). Concentraciones (A) 10 ⁹ UFC/mL, (B) 10 ⁸ UFC/mL, (C) 10 ⁷ UFC/mL, (D) 10 ⁶ UFC/mL.....	77
Figura 5.12. Resultados de parámetros fisicoquímicos y microbiológicos del yogurt simbiótico natural a lo largo de la vida de anaquel.....	82
Figura 5.13. Resultados de parámetros fisicoquímicos y microbiológicos del yogurt endulzado a lo largo de la vida de anaquel.	83
Figura 5.14. Resultados de parámetros fisicoquímicos y microbiológicos del yogurt con mango a lo largo de la vida de anaquel.....	84
Figura 5.15. Resultados de parámetros fisicoquímicos y microbiológicos del yogurt con frutos del bosque a lo largo de la vida de anaquel.	85
Figura B.1. Esquema general de los protocolos probados para la recuperación celular a partir de yogurt.....	91
Figura C.1. Protocolo para llevar a cabo el tratamiento con PMA.	95

Listado de Tablas

Tabla 1.1. Efectos benéficos y terapéuticos asociados a la aplicación de microorganismos probióticos en humanos	14
Tabla 1.2. Características de medios selectivos usados para recuento en placa.....	25
Tabla 4.1. Especificaciones de cultivos liofilizados.....	46
Tabla 4.2. Pruebas de verificación de selectividad de medios de cultivo para bacterias probióticas.	48
Tabla 4.3. Mezcla de reacción para PCR tiempo real (Ensayo normal).....	52
Tabla 4.4. Cebadores y sondas diseñadas para identificar a <i>Lactobacillus acidophilus</i>	55
Tabla 4.5. Cebadores y sondas diseñadas para identificar a <i>Lactobacillus casei</i>	56
Tabla 4.6. Componentes y concentraciones de la mezcla de reacción para PCR tiempo real (Ensayo dúplex).....	56
Tabla 4.7. Distribución de muestras de yogurt para evaluar la viabilidad de probióticos.....	58
Tabla 4.8. Medio de cultivo y condiciones de incubación para la cuantificación de los microorganismos probióticos en las 4 formulaciones de yogurt.	59
Tabla 5.1. Resultados de cuenta en placa en diferentes condiciones, para distinguir <i>L. acidophilus</i> de <i>L. casei</i> por separado.	60
Tabla 5.2. Resultados de cuenta en placa en diferentes condiciones, para distinguir <i>L. acidophilus</i> de <i>L. casei</i> mezclados.	61
Tabla 5.3. Morfologías coloniales en las diferentes condiciones de incubación.	62
Tabla 5.4. Resultados de pruebas de selectividad de medios de cultivo de probióticos en yogurt.	63
Tabla 5.5. Selectividad de los medios de cultivo probados.....	63
Tabla 5.6. Resultados de distintas metodologías para la recuperación de células...	66
Tabla 5.7. Resultados de la cuantificación/calidad ADN obtenida después del tratamiento con PMA.....	68
Tabla 5.8. Concentración y relación de absorbancias 260/280 obtenidas del ADN de cultivos liofilizados, extraído usando el kit FastID®.....	72

Tabla 5.9. Cebadores y sondas diseñadas para identificar a <i>Lactobacillus acidophilus</i> .	73
Tabla 5.10. Cebadores y sondas diseñadas para identificar a <i>Lactobacillus casei</i> ...	74
Tabla 5.11. Resultados de cuenta en placa de <i>L. casei</i> y <i>L. acidophilus</i> presentes en yogurt simbiótico natural almacenado a 4°C durante 50 días.	80
Tabla 5.12. Resultados de cuenta en placa de <i>L. casei</i> y <i>L. acidophilus</i> presentes en yogurt simbiótico endulzado almacenado a 4°C durante 50 días.	80
Tabla 5.13. Resultados de cuenta en placa de <i>L. casei</i> y <i>L. acidophilus</i> presentes en yogurt simbiótico con mango almacenado a 4°C durante 50 días.	81
Tabla 5.14. Resultados de cuenta en placa de <i>L. casei</i> y <i>L. acidophilus</i> presentes en yogurt simbiótico con frutos del bosque almacenado a 4°C durante 50 días.	81
Tabla A.1. Especificaciones de reactivos y medios de cultivo.	88
Tabla A.2. Agua peptonada.	89
Tabla A.3. Citrato trisódico 1 M.	89
Tabla A.4. DMSO 20% (v/v).	89
Tabla A.5. Etanol 75% (v/v).	89
Tabla A.6. Fenofaleína 1% (m/v).	89
Tabla A.7. Medio de cultivo MRS (MRS normal).	90
Tabla A.8. Medio de cultivo MRS (MRS enriquecido).	90
Tabla A.9. PMA 20 mM.	90
Tabla A.10. Solución salina 0.85% SSI (m/v).	90
Tabla A.11. Solución salina 1.5% (m/v).	90
Tabla F.1. Resultados de viabilidad de probióticos durante la vida de anaquel del yogurt natural.	100
Tabla F.2. Resultados de viabilidad de probióticos durante la vida de anaquel del yogurt endulzado.	102
Tabla F.3. Resultados de viabilidad de probióticos durante la vida de anaquel del yogurt con mango.	104
Tabla F.4. Resultados de viabilidad de probióticos durante la vida de anaquel del yogurt con frutos del bosque.	106

Resumen

El yogurt es el producto obtenido de la fermentación de la leche, estandarizada o no, por medio de los microorganismos *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, teniendo como resultado la reducción del pH. El yogurt además de su amplia aceptación como alimento nutritivo, sabroso y conveniente, ha sido utilizado en forma creciente como el principal vehículo para las bacterias probióticas, las cuales son capaces de proporcionar beneficios a la salud del consumidor. Sin embargo, para ejercer sus propiedades terapéuticas, es necesario que estos microorganismos se mantengan viables, activos y en una cantidad abundante a lo largo de toda la vida útil del producto.

En el laboratorio se desarrolló un yogurt para una empresa nacional, al cual se le agregó fibra soluble como prebiótico y las bacterias probióticas *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus casei* para distinguirlo como un alimento simbiótico. El presente trabajo tiene como objetivo comprobar la viabilidad de los probióticos *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus casei*, inoculados en dicho yogurt, a lo largo de la vida de anaquel del mismo.

La pérdida de viabilidad de las bacterias probióticas añadidas al yogurt se evaluó durante 50 días de almacenamiento a 4°C, en cuatro diferentes formulaciones del producto: yogurt natural, endulzado, con mango y con frutos del bosque. Se pretendía cuantificar los microorganismos siguiendo dos metodologías: la primera, tradicional, empleando cuenta en placa en condiciones selectivas para ambos microorganismos y la segunda estrategia, molecular, se basaba en la combinación del reactivo PMA con la técnica de PCR tiempo real, ya que este reactivo es capaz de distinguir entre las células vivas y las irreversiblemente dañadas.

La evaluación de la viabilidad de *Lactobacillus casei* por métodos tradicionales se llevó a cabo de manera directa, incubando en medio MRS en condiciones aerobias a 30°C durante 48 h. La cuantificación de *Lactobacillus acidophilus* se realizó indirectamente, incubando la dilución apropiada de yogurt simbiótico en medio MRS

en condiciones anaerobias a 37°C durante 72 h, para posteriormente restar al número de colonias contadas, las UFC obtenidas en el medio selectivo de *Lactobacillus casei*.

Durante la vida de anaquel del yogurt, *Lactobacillus casei* presentó buena estabilidad, sin embargo, *Lactobacillus acidophilus* presentó una disminución mayor a un orden de magnitud, lo cual puede atribuirse a la presencia de H₂O₂ producido por *Lactobacillus delbruekii* ssp. *bulgaricus*. La cuantificación por medio de los métodos moleculares no se llevó a cabo debido a que el método de extracción y purificación de ADN directamente de yogurt simbiótico presentó interferencia de la fibra soluble durante el aislamiento de las células, además se observó poca reproducibilidad en los resultados. Sin embargo, se logró corroborar que el PMA es capaz de discriminar el ADN de las células muertas en la técnica de PCR tiempo real.

La concentración total de microorganismos probióticos en el yogurt simbiótico después de 50 días de almacenamiento a 4°C fue de 10⁶ UFC/mL, esta cantidad cumple con las especificaciones de la NOM-181-SCFI-2010 y demuestra la resistencia de las BAL a ambientes de alta acidez.

Capítulo I

Introducción y Marco Teórico

1.1. Introducción

En los últimos años, las tendencias mundiales de la alimentación indican un interés acentuado de los consumidores hacia ciertos alimentos que además de su composición nutrimental aporten beneficios a las funciones fisiológicas del organismo humano. Estas variaciones en los patrones de alimentación dieron lugar al nacimiento de los alimentos funcionales (Martínez, 2005).

Dentro del campo de los alimentos funcionales se encuentra el grupo denominado probiótico (Pérez y Zamora, 2002), el más popular es el yogurt, que además de tener amplia aceptación en el mercado ha demostrado ser un buen vehículo para las bacterias probióticas, es por eso que algunas de las compañías productoras de yogurt y otros alimentos fermentados han reformulado sus productos para incluir este tipo de bacterias (Bertazzoni, 2004). Entre los beneficios de los microorganismos probióticos sobre los cuales existe información científica más sólida se encuentran: la disminución de la incidencia de infecciones gastrointestinales, incremento en la respuesta inmunológica, reducción en la concentración de colesterol en suero, disminución de la incidencia en cáncer de colon y reducción de la intolerancia a la lactosa. Sin embargo, los análisis clínicos indican que los probióticos aportan sus beneficios únicamente al ingerir una concentración 10^8 UFC/día de microorganismos probióticos viables y activos (Ng et al., 2010).

En el laboratorio se desarrolló un yogurt simbiótico, el cual fue complementado con fibra soluble y las bacterias probióticas *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus casei*. La evaluación de la viabilidad de las bacterias probióticas durante la vida de anaquel de dicho yogurt, representa un reto debido a que las especies presentes se

encuentran muy relacionadas filogenéticamente. Una alternativa para llevar a cabo este análisis es el empleo de medios de cultivo selectivos; y por otro lado, se encuentra la utilización de métodos basados en el análisis de ADN, como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Una limitante de este último método es que al analizar el ADN extraído de los microorganismos presentes en el yogurt, no se puede distinguir entre el ADN proveniente de las células vivas, del de las muertas, lo que llevaría a una estimación incorrecta de la concentración de los microorganismos probióticos. Para llevar a cabo esta diferenciación, se encontraron reportes de la utilización de monoazida de propidio (fenantridio, 3-amino-8-azida-5-[3-(dietilmetilamonio) propilo]-6-fenil dicloro) (PMA), el cual es un reactivo capaz de discriminar el ADN de las células muertas (Nocker et al., 2006).

Entre las ventajas de los métodos independientes de cultivo, están la velocidad y especificidad de análisis, así como la capacidad de procesamiento de un gran número de muestras; sin embargo, durante la extracción de ADN se pueden presentar dificultades debido a la interferencia de los componentes del yogurt. Por otra parte, los métodos dependientes de cultivo son confiables, pero implican mayor inversión de tiempo y recursos.

1.2. Marco teórico

Los alimentos fermentados son productos preparados con materiales crudos o tratados térmicamente, que adquieren propiedades características (sabor, aroma, apariencia, textura, consistencia) por un proceso en el cual está implicado el crecimiento de microorganismos (Academia del Área de Plantas Piloto de Alimentos, 2004).

La fermentación es una práctica muy antigua, la cual seguramente fue provocada sin intención durante el almacenamiento de la leche líquida. A través de esta fermentación se pueden acumular metabolitos como el ácido láctico, el etanol y muchos otros que le imparten características organolépticas distintivas. La transformación de la leche en estos alimentos fermentados tiene varias ventajas, algunas de las cuales recientemente se han venido valorando a la luz de nuevos

estudios. La más evidente de éstas es la conservación, ya que estos productos presentan menor riesgo de contaminación que el producto fresco, debido a los distintos compuestos antimicrobianos producidos por las bacterias que intervienen en la fermentación, los cuales inhiben el desarrollo de microorganismos patógenos y productores de toxinas.

Desde el punto de vista nutricional y de salud, las leches fermentadas aportan nutrimentos adicionales a los del producto fresco, como son vitaminas del complejo B y una mayor cantidad de proteínas en productos concentrados como el yogurt. Además, las proteínas se digieren con mayor facilidad debido a la hidrólisis que sufren por las proteasas producidas por las bacterias lácticas. También la grasa y la lactosa de estos productos resultan más digeribles, por la acción de las enzimas microbianas (López et al., 2002).

1.2.1. Yogurt

Según las fuentes históricas, el yogurt tuvo su origen en el Medio Oriente hace muchos siglos; sin embargo, los productos a los que se refieren en esa época son en realidad varias leches fermentadas en forma empírica, con la participación de los microorganismos presentes en la leche o en el medio ambiente, ya que el descubrimiento de los microorganismos y su caracterización se llevó a cabo a finales del siglo XVII. Pero no fue hasta el siglo XIX en que se detectó y desarrolló la utilidad y funciones de estos microorganismos.

Desde su origen, las leches fermentadas han sido ingeridas por sus propiedades medicinales para el alivio de desórdenes estomacales, intestinales y del hígado. Durante la primera mitad del siglo XX, el bacteriólogo ruso Ilya Metchnikoff relacionó la buena salud y longevidad de los campesinos de los Balcanes con el consumo de un producto fermentado, a partir de leche, al cual le llamaban *Yahourth*. Por este motivo, se considera que dichas leches fermentadas fueron las precursoras de lo que hoy se conoce como yogurt.

Después de la Segunda Guerra Mundial, la tecnología del yogurt tuvo un avance muy significativo. Actualmente, el consumo del producto está muy difundido a escala mundial. En el mercado nacional, el yogurt es fabricado y distribuido por varias

industrias; cada una de ellas ofrece al consumidor una gran variedad de sabores, consistencias y presentaciones (Hernández et al., 2003).

Actualmente, la NOM-181-SCFI-2010 define al yogurt como el producto obtenido de la fermentación de la leche, estandarizada o no, por medio de los microorganismos *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, teniendo como resultado la reducción del pH (Dirección General de Normas, 2011).

1.2.1.1. Proceso de elaboración del yogurt.

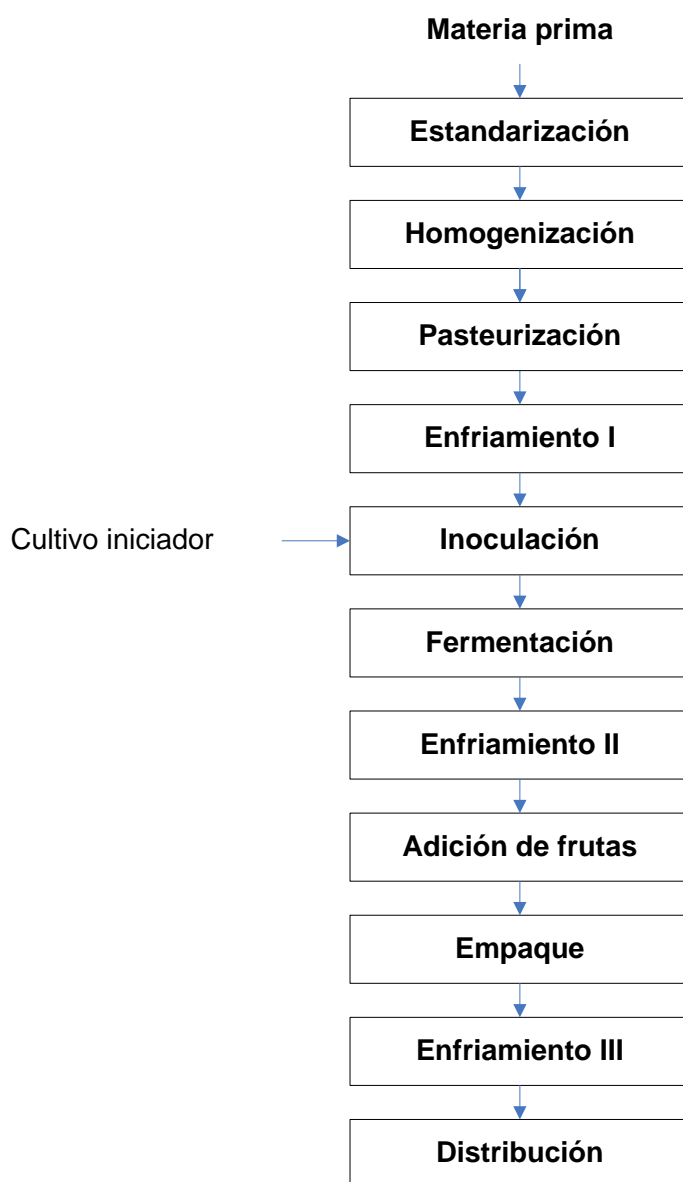


Figura 1.1. Proceso de elaboración de yogurt batido (Hernández et al., 2003).

Existe una gran variedad de yogures que difieren entre sí por varios factores, entre ellos: el proceso de elaboración, la adición de saborizantes y la forma de presentación.

El yogurt firme y el batido son dos tipos de yogurt que difieren en el proceso de elaboración. En el yogurt firme, la leche inoculada con los microorganismos se debe empacar en los recipientes definitivos antes de que se inicie la fermentación, es decir, la fermentación se lleva a cabo en el mismo recipiente en el que será distribuido el producto. Si se desea agregarle frutas, se adicionan en el fondo del envase antes de la leche. El yogurt batido es producido en tanques de fermentación y se empaca una vez que las frutas o los saborizantes han sido mezclados con el yogurt.

En la Figura 1.1, se presentan las etapas del proceso general para la elaboración de yogurt batido.

1.2.1.1.1. *Materia prima*

El yogurt se elabora tanto con leche entera como descremada, preferiblemente de vaca. La leche debe estar libre de antibióticos, porque su presencia inhibe el desarrollo de los microorganismos que llevan a cabo la fermentación.

1.2.1.1.2. *La estandarización*

Para aumentar el contenido de sólidos totales en la leche, primero es necesario estandarizar la cantidad de grasa. El contenido de grasa del yogurt debe alrededor de 0.5% en el caso del descremado, y el 3.5%, en el caso del entero.

El contenido de sólidos totales (ST) es vital en el proceso de elaboración de este producto. En general, el contenido de ST adecuado para la elaboración de yogurt es de 15 a 16%; entre mayor sea su contenido, mayor será su viscosidad. Como la leche contiene un 13% de ST en promedio, esta cantidad se debe aumentar. Es posible elaborar yogurt sin aumentar el contenido promedio de sólidos totales de la leche, pero el gel que se forma es muy débil y se rompe con mucha facilidad, lo que provoca la separación del suero de la leche. Para elevar la cantidad de sólidos

totales, existen varias opciones. Tradicionalmente, se concentraba la leche disminuyendo su volumen en una tercera parte, por medio de la evaporación del agua presente en ella. Actualmente, se prefiere agregar leche en polvo hasta alcanzar el contenido de sólidos totales requerido, porque es un proceso más práctico y barato. Otros métodos utilizados, aunque con menor frecuencia, son la ultrafiltración y la ósmosis inversa.

Para contrarrestar los efectos negativos sobre la viscosidad y la fuerza del gel, por causa del bajo contenido de sólidos totales en la leche, también se recurre a la adición de estabilizantes, que mejoran el cuerpo, la textura y la apariencia del yogurt. Algunos comúnmente utilizados son el almidón, la carragenina, los alginatos, la goma de algarrobo, la gelatina y la pectina. Los estabilizantes se deben agregar durante la estandarización de la materia prima. El contenido de los estabilizantes en el yogurt no debe superar el 0.3%, porque provocan consecuencias adversas en el sabor.

1.2.1.1.3. *La homogenización*

La etapa de homogenización generalmente se lleva a cabo antes de la pasteurización, pero puede ser realizada después. Consiste en someter la leche a altas presiones con el fin de disminuir el tamaño de las gotas de grasa y otros constituyentes y, así, que se dispersen mejor. El resultado es un yogurt más viscoso, más estable y con mejores características organolépticas.

1.2.1.1.4. *La pasteurización*

La pasteurización es una de las etapas más importantes de este proceso porque se elimina la mayor parte de la microbiota contenida en la leche. La disminución de los microorganismos asociados a la leche permite el crecimiento de los microorganismos productores del yogurt (o iniciadores) libres de competencia, con todos los nutrimentos de la leche a su disposición. Con este proceso, también se logra la inactivación de enzimas que afectan las características organolépticas del yogurt.

Las elevadas temperaturas de la pasteurización desnaturalizan las proteínas de la leche, con lo cual, se liberan péptidos que contribuyen al crecimiento de los microorganismos inoculados. Además, la modificación de la estructura de las proteínas favorece su agregación, lo que mejora la viscosidad del yogurt y su capacidad de retención de agua, e impide la separación del suero de la leche.

Existe una gran gama de temperaturas y tiempos asociados a la pasteurización de la leche, de acuerdo con el proceso de fabricación del yogurt y el equipo disponible para realizarla. Algunos ejemplos son: 80 a 85°C por treinta minutos, y a 90°C por cinco minutos. El calentamiento débil de la leche genera un yogurt bajo en viscosidad, mientras que un sobrecalentamiento puede provocar textura granular y una tendencia a la separación del suero (Hernández et al., 2003), además de que en ocasiones, se puede inhibir la proteólisis debido a asociaciones de $\text{I}\kappa\text{-caseína}$ con las proteínas del suero (López et al., 2002).

1.2.1.1.5. *El enfriamiento posterior a la pasteurización*

Después de la pasteurización, la leche debe ser enfriada hasta la temperatura necesaria para el crecimiento óptimo de los microorganismos, que oscila entre los 40°C y 45°C.

1.2.1.1.6. *La inoculación y fermentación*

El cultivo iniciador se encuentra compuesto por los microorganismos *S. thermophilus* y *Lactobacillus ssp. bulgaricus* en una relación 1:1 o 2:1, las cuales garantizan una consistencia adecuada y un aroma agradable.

El cultivo iniciador se inocula en una proporción que oscila entre el 1% y el 5% v/v de la cantidad de leche inicial que se utiliza. Se debe mezclar muy bien con la leche para asegurar una adecuada distribución de los microorganismos. En este momento, empieza el proceso de fermentación. La fermentación se realiza durante un promedio de tres a seis horas, a una temperatura entre los 40 y 45°C. El tiempo de fermentación depende de la temperatura de incubación y de la capacidad de producción de ácido láctico de los microorganismos. El proceso se debe detener

cuando se alcanza una concentración de ácido láctico entre 0.70 y 1.1% p/v. En este rango de concentración de ácido láctico el valor del pH se encuentra entre 4.6 y 3.7 (Hernández et al., 2003).

La formación del coágulo durante la elaboración del yogurt, obedece al hecho de que a un pH cercano a 4.6 las micelas de caseína de la leche coalescen en forma de cadenas o conglomerados para formar una estructura tridimensional en la cual queda atrapado el suero. A pH altos (>5.4) las micelas de caseína mantienen su estado nativo (100-250 nm), pero cuando el pH alcanza valores de 5.1, las partículas sufren disociaciones parciales formando subpartículas de 30-40 nm, y cuando se alcanza pH del orden de 4.8-4.3 las partículas de caseína forman grandes conglomerados que atrapan la grasa y el suero, y que son responsables de las altas viscosidades del producto (López et al., 2002).

1.2.1.1.7. *El enfriamiento posterior a la fermentación*

Cuando se alcanza la acidez deseada, se debe detener el proceso de fermentación disminuyendo la temperatura, ya que los microorganismos involucrados en el proceso no son capaces de crecer a temperaturas inferiores a 10°C; además, a bajas temperaturas, se suspende la actividad de las enzimas generadas por estos microorganismos. La temperatura recomendada es la de refrigeración (4°C). El enfriamiento, a la vez, tiene un efecto positivo, porque aumenta la firmeza del gel.

1.2.1.1.8. *La agitación y la adición de frutas*

La adición de frutas al yogurt le confiere una mayor aceptación por parte del consumidor. La fruta se adiciona en forma de trozos o puré, en porcentajes que varían desde el 5 al 25% del producto final. Las frutas deben recibir tratamiento térmico previo para evitar la proliferación de hongos y levaduras que contaminarían el yogurt y disminuirían su vida útil (Hernández et al., 2003).

El yogurt es un fluido tixotrópico, por lo que la agitación excesiva durante la incorporación de la fruta, puede producir una caída sustancial de la viscosidad del

producto, lo que ocasiona un detrimento de su calidad. Por esta razón, el batido del yogurt se debe hacer cuidadosa y lentamente (López et al., 2002).

1.2.1.1.9. *El empaque*

Cuando el yogurt se ha enfriado y se le han agregado las frutas, el producto se empaca. Los recipientes deben ser resistentes, impermeables y de un material que no reaccione con el producto para protegerlo de alteraciones físicas, químicas y de microorganismos. Después de empacado, el yogurt se debe conservar en refrigeración con el fin de aumentar su vida útil, que se calcula es de 30 días (Hernández et al., 2003). El almacenamiento del producto terminado debe hacerse a 5°C como máximo; temperaturas más altas pueden ocasionar defectos en el sabor, por ejemplo, sabor amargo; temperaturas menores a 5°C pueden provocar la formación de cristales de hielo (López et al., 2002).

1.2.1.2. La microbiología y la bioquímica de la fermentación del yogurt

Lactobacillus delbruekii ssp. *bulgaricus* es un bacilo homofermentativo Gram-positivo, largo, no móvil el cual produce ácido D-(-) láctico. Es capaz de fermentar fructosa, galactosa, glucosa y lactosa, pero no así maltosa y sacarosa. Puede crecer a temperaturas superiores a 45°C, pero normalmente tiene su óptimo entre 40°C y 43°C; no es capaz de crecer a temperaturas menores de 15°C. Tiene la habilidad de crecer a pH inferiores a 5.0, y presenta metabolismo fermentativo aun en presencia de aire. En tanto, *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus* es una bacteria Gram-positiva, esférica, la cual se observa en pares o en cadenas; es homofermentativo y produce ácido L-(+) láctico a partir de glucosa, fructosa, lactosa y sacarosa. Tiene una temperatura óptima de crecimiento de 40 a 45°C, aunque puede crecer hasta a 50°C, pero no a menos de 20°C (López et al., 2002).

Ambos microorganismos tienen requerimientos nutricionales complejos que se encuentran en la leche; utilizan la lactosa como fuente de energía y la transforman en ácido láctico. Durante el metabolismo de los microorganismos, además del ácido láctico, se producen algunos metabolitos que son los responsables del aroma

característico del yogurt; entre ellos los más importantes son: el acetaldehído, el diacetilo y la acetoína. También, se obtienen ácidos volátiles, tales como: el fórmico, el acético, el propiónico, el butírico, el isovalérico y el caproico, los cuales junto con los metabolitos mencionados originan el aroma característico del yogurt. El acetaldehído se produce por la vía de Embden-Meyerhof y es la sustancia responsable del aroma que se encuentra en mayor concentración en el yogurt (entre 23 a 55 ppm, considerándose óptima de 23 a 41 ppm) (Hernández et al., 2003).

L. bulgaricus y *S. thermophilus* se estimulan mutuamente en una relación protooperativa; mientras la primera hidroliza activamente las proteínas, la otra le corresponde produciendo ácido fórmico y bióxido de carbono los cuales son estimulantes para *L. bulgaricus*. Este efecto sinérgico resulta en un incremento en el crecimiento y en la producción de ácido láctico y acetaldehído. También se ha sugerido que la glicina producida por el bacilo, como un subproducto de la conversión de treonina a acetaldehído, estimula a la otra bacteria (López et al., 2002). Ambas especies pueden crecer en un pH bajo, pero *S. thermophilus* crece mejor al inicio de la fermentación cuando el pH es alto. El pH disminuye durante la fermentación, por la producción de ácido láctico, hasta alcanzar un valor inferior a 5.5. La acidez, el consumo de oxígeno y la liberación de sustancias volátiles que produce *S. thermophilus*, crean las condiciones ideales para que se desarrolle *L. bulgaricus*.

Desde el punto de vista bioquímico, la lactosa es hidrolizada dentro de la célula bacteriana por una lactasa, en unidades de glucosa y galactosa. La glucosa es metabolizada por la vía de Embden-Meyerhof, hasta ácido pirúvico, el cual se convierte en ácido láctico por la acción de la deshidrogenasa láctica presente en ambos microorganismos (Hernández et al., 2003). Cada especie produce un enantiómero diferente; la proporción del isómero L en el yogurt es de 55% a 60% con respecto al ácido láctico total, y sólo este enantiómero es asimilable por los mamíferos incluyendo al hombre, aunque no hay ninguna evidencia de que el enantiómero D resulte tóxico (López et al., 2002). Por otro lado, ambas bacterias carecen de la enzima alcohol deshidrogenasa, por lo que son incapaces de transformar el acetaldehído en etanol.

La cantidad de inóculo y el tiempo de fermentación también influyen en las características del yogurt. Para producir un yogurt a 42°C durante dos horas y media, con una relación final de microorganismos de 1:1, es necesario inocular con una cantidad de cultivo equivalente al 3% v/v de la leche en que se desea fermentar. Si el yogurt se produce en tres horas, se inocula la leche con un 2% del cultivo (en relación con la cantidad de leche empleada) (Hernández et al., 2003).

1.2.1.3. Aspectos nutricionales

Algunas personas no toleran la leche debido a que su consumo les causa desórdenes estomacales, esta situación se debe a que no poseen en su sistema digestivo una enzima conocida como lactasa, encargada de descomponer la lactosa en sus monosacáridos constituyentes. Este problema de intolerancia a la leche no se presenta al consumir yogurt, ya que, durante la fermentación de la leche, la lactosa es utilizada por los microorganismos como fuente de energía y, por lo tanto, su contenido se reduce. Varios estudios han revelado que la lactosa residual del yogurt es hidrolizada por las bacterias lácticas dentro del ser humano.

La digestibilidad de las proteínas presentes en la leche aumenta por la acción proteolítica de las enzimas producidas por los microorganismos iniciadores (Hernández et al., 2003). Además, este producto no provoca caries ya que las bacterias lácticas de la microbiota bucal no sintetizan dextranos pegajosos a partir de la lactosa, y por tanto, no forman placa dental. También se recomienda el consumo de yogurt, después de algún desorden intestinal o después de un tratamiento de antibióticos, pues ayuda en la regeneración de la microbiota intestinal (Walstra, 2001).

1.2.1.4. Metodología para elaboración de yogurt simbiótico

El yogurt empleado en la presente tesis, fue parte del trabajo desarrollado en el laboratorio, a petición de una empresa mexicana. Este yogurt está complementado por fibra soluble y las bacterias probióticas *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus acidophilus*. La vida de anaquel determinada en el laboratorio (Mancilla, 2011) es de 30 a 40 días y las etapas para su elaboración se resumen en la Figura 1.2.

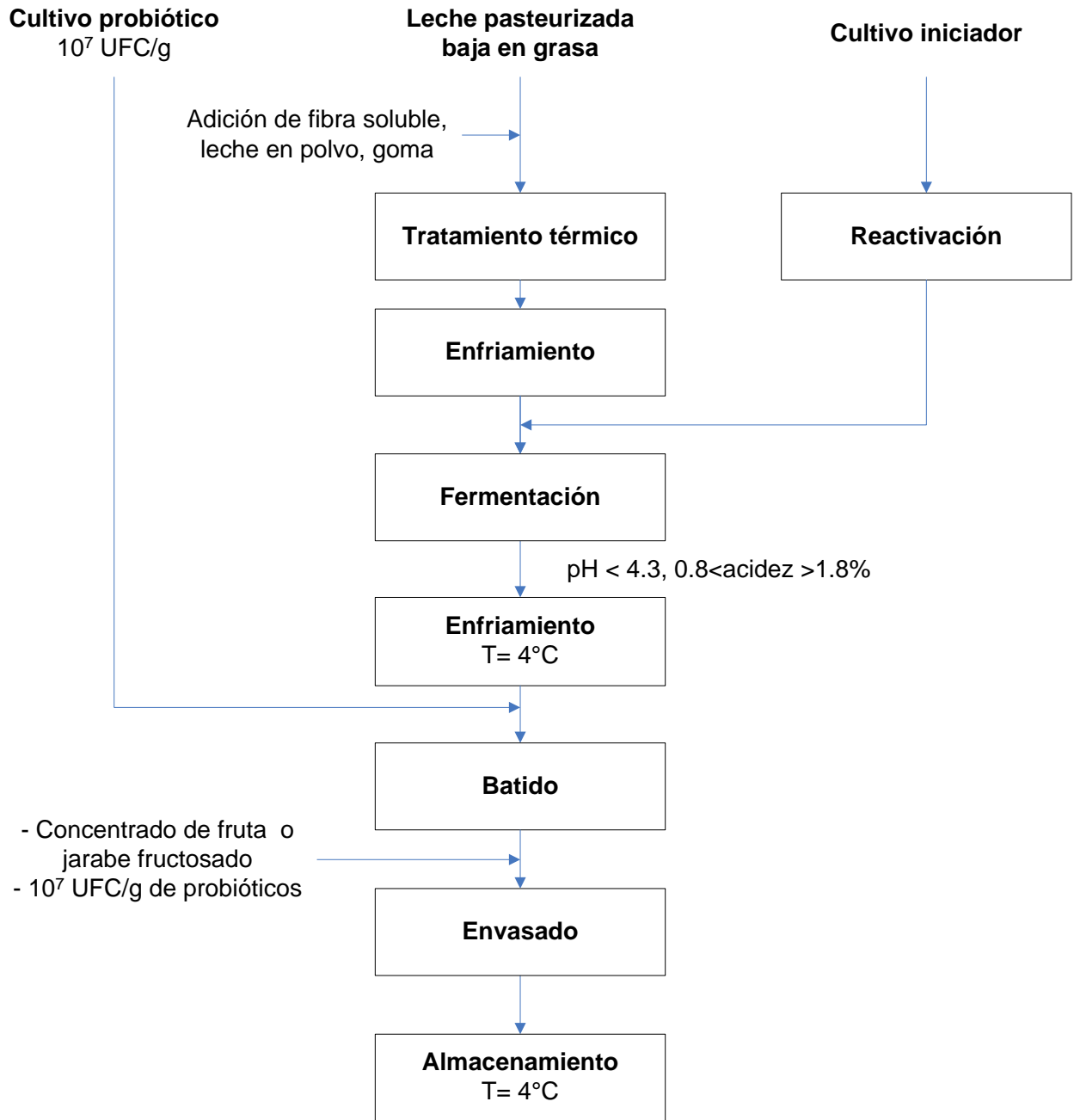


Figura 1.2. Metodología para elaboración de yogurt (Mancilla, 2011).

1.2.2. Bacterias probióticas

La microbiota del tracto intestinal humano constituye un ecosistema complejo, actualmente se han identificado más de 400 especies de bacterias en las heces fecales de un individuo. La población bacteriana en el intestino grueso es muy alta y alcanza un máximo de 10^{12} UFC/g, en el intestino delgado las cuentas de bacterias son considerablemente menores, 10^4 - 10^8 UFC/g, mientras que en el estómago únicamente han sido encontradas entre 10^1 - 10^2 UFC/g debido al bajo pH.

Actualmente se considera que un balance óptimo en la población microbiana dentro del tracto digestivo humano es bueno para la nutrición y para la salud, sin embargo existen factores que pueden influir negativamente en la interacción de los microorganismos intestinales, por ejemplo, el estrés y la dieta, los cuales dan lugar a efectos perjudiciales en la salud. Los microorganismos asociados primordialmente con el balance óptimo son lactobacilos y bifidobacterias.

Cada vez más pruebas indican que el consumo de microorganismos “probióticos” puede ayudar a mantener un perfil microbiológico adecuado, además estos microorganismos están relacionados con efectos terapéuticos. En los últimos años se ha observado un aumento en la incorporación de bacterias probióticas a los alimentos como complementos dietéticos. El bioyogurt es uno de los productos lácteos más populares para proporcionar las células probióticas viables, al intestino humano (Lourens y Viljoen, 2001); de hecho, NOM-181-SSAI-2010 permite adicionar al yogurt otros cultivos alternativos del género *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, con una concentración mínima de 10^6 UFC/g (Dirección General de Normas, 2011).

1.2.2.1. Definición de probióticos

La palabra “probiótico”, proviene del griego que significa “para la vida” (Lourens y Viljoen, 2001). Actualmente la definición más adecuada indica que son aquellos microorganismos vivos que cuando son administrados en cantidades adecuadas, pueden conferir un efecto benéfico a la salud del hospedero (Saarela et al., 2000).

1.2.2.2. Beneficios a la salud

El consumo de microorganismos probióticos es asociado a una serie de efectos terapéuticos, los cuales son resumidos en la Tabla 1.1 (Lourens y Viljoen, 2001).

Tabla 1.1. Efectos benéficos y terapéuticos asociados a la aplicación de microorganismos probióticos en humanos (Lourens y Viljoen, 2001).

EECTOS BENÉFICOS	APLICACIONES TERAPÉUTICAS
Mantiene saludable la microbiota intestinal. Inhiben el crecimiento de patógenos. Estimulan el sistema inmune. Evitan problemas asociados a la intolerancia a la lactosa. Reducen los niveles de colesterol. Tienen actividad anticancerígena. Mejoran el valor nutricional de los alimentos.	Previene infecciones en las vías urinarias. Previene diarrea infantil. Alivia el estreñimiento. Previene la hipercolesterolemia. Reduce la diarrea inducida por los antibióticos. Protección contra el cáncer de colon y vejiga. Previenen la osteoporosis.

1.2.2.2.1. *Propiedades de adhesión*

Uno de los requisitos más importantes de los microorganismos probióticos para ejercer algunos de los efectos benéficos, es la adhesión a la superficie intestinal y la subsecuente colonización del tracto gastrointestinal. La adhesión provee una interacción con la mucosa superficial, la cual facilita el contacto con el tejido linfoide asociado al intestino mediante efectos inmunes locales y sistémicos.

Las bacterias que persisten durante más tiempo en el tracto gastrointestinal tienen mayores posibilidades de presentar efectos metabólicos e inmunomodulatorios que las cepas no persistentes. Por lo tanto, sólo los probióticos adherentes son capaces de inducir efectos inmunes y estabilizar la mucosa intestinal.

1.2.2.2.2. *Efectos preventivos y terapéuticos contra la diarrea*

Diferentes estudios han demostrado que la duración de los síntomas de la diarrea infantil producida por rotavirus, se reduce cuando se consumen ciertos lactobacilos. También se observa un incremento en el nivel de inmunoglobulinas específicas para rotavirus, creando un mecanismo de defensa inmune que acompaña al efecto antidiarreico. En adultos se ha observado la reducción de la diarrea asociada con tratamiento antibiótico, mientras que la evidencia para el tratamiento de la diarrea aguda y crónica, se muestra inconsistente (Saarela et al., 2000).

1.2.2.2.3. *Propiedad inmunomoduladoras*

Estudios de intervención humana con probióticos han aportado evidencia de la modulación del sistema inmunológico al incrementar los niveles de células secretoras de anticuerpos. Estos microorganismos estimulan la producción de citocinas (interferón Y) por linfocitos, proliferación de células B y NK, anticuerpos IgM e IgG y actividad fagocítica de leucocitos (Martínez, 2005). Sin embargo se ha demostrado que existen diferencias en los efectos inmunomodulatorios entre cada cepa de bacterias probióticas (Saarela et al., 2000).

1.2.2.2.4. *Disminución en la síntesis de sustancias de putrefacción*

Las bacterias probióticas son capaces de disminuir la síntesis sustancias nocivas para el organismo (amonio, fenoles, ácido sulfhídrico, metabolitos de triptófano y tirosina, indoxil sulfato, p-cresol).

1.2.2.2.5. *Enfermedad intestinal inflamatoria*

La enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa son enfermedades inflamatorias crónicas del intestino delgado y grueso, difíciles de tratar con éxito con medicamentos, siendo comunes las recaídas. Hay evidencias que muestran que los probióticos mejoran dichas enfermedades.

1.2.2.2.6. Alergias

Se ha sugerido que las características inmunomoduladoras de los probióticos podrían ser utilizadas en patologías humanas en las que está implicado el sistema inmune, en concreto, en relación con las enfermedades alérgicas. Numerosos estudios de laboratorio y de experimentación clínica demuestran ciertos efectos de los probióticos para dificultar o impedir el desarrollo del mecanismo alérgico, para prevenir o minimizar la aparición de alergopatías. Hasta el momento los resultados son controvertidos y no se conocen los mecanismos de acción (Martínez, 2005)

1.2.2.2.7. Propiedades antagónicas

Las bacterias probióticas han demostrado tener una capacidad inhibitoria frente muchos de los patógenos transmitidos por los alimentos. Los mecanismos de inhibición de patógenos atribuidos a los microorganismos probióticos son:

- Producción de sustancias antimicrobianas como: ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno, bacteriocinas, antibióticos y ácidos biliares desconjugados.
- Su papel como antagonistas competitivos, es decir, la competencia por sitios de adhesión, por los nutrientes y haciendo el medio poco favorable para el crecimiento de las bacterias invasoras.
- Estimulación del sistema inmune.

Las bacterias probióticas pueden producir bacteriocinas, cuyo papel en la inhibición de patógenos *in vivo* se encuentra limitada ya que las bacteriocinas tradicionales tienen un efecto inhibitorio únicamente contra especies muy relacionadas filogenéticamente como otros lactobacilos. Sin embargo, los metabolitos de bajo peso molecular (peróxido de hidrógeno, ácido acético, láctico y otros compuestos aromáticos) y metabolitos secundarios han mostrado una capacidad inhibitoria hacia microorganismos patógenos como *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Clostridium* y *Helicobacter*. *L. rhamnosus* produce un compuesto antimicrobiano de bajo peso molecular, posiblemente un ácido graso de cadena corta que inhibe

microorganismos anaerobios como *Bacteroides*, *Clostridium* y *Bifidobacterium*, además impide el desarrollo de bacterias como *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus* y *Streptococcus*, sin afectar a otros lactobacilos.

Los sobrenadantes de cultivo de *L. acidophilus* disminuyen la viabilidad de *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Thyphimurium, *Shigella flexneri*, *Escherichia coli*, *Kelbsiella pneumoniae*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacter* spp. En estudios *in vitro* el compuesto antimicrobiano de bajo peso molecular no identificado, no tiene efecto en lactobacilos y bifidobacterias.

Por otro lado, la producción de ácidos orgánicos debido al metabolismo de los probióticos, disminuye el pH y altera el potencial óxido-reductor del intestino, lo cual combinado con el contenido reducido de oxígeno en el intestino, resulta en una actividad antimicrobiana (Lourens y Vijoen, 2001).

1.2.2.2.8. Reducción de intolerancia a la lactosa

Algunas de las bacterias utilizadas como cultivos iniciadores en la leche y algunas bacterias probióticas producen β -D-galactosidasa, esta enzima hidroliza lactosa, resultando en un aumento en la tolerancia hacia los productos lácteos.

También ayudan al mejoramiento de la digestibilidad de la lactosa debido a la hidrólisis de la lactosa en el tracto digestivo después de consumir la leche fermentada con probióticos.

1.2.2.2.9. Reducción de los niveles de colesterol en suero

El consumo de leches fermentadas reduce significativamente el colesterol en suero. Para individuos hipercolesterolémicos la reducción significativa de niveles de colesterol en plasma disminuye el riesgo de presentar ataques al corazón. El sitio principal donde se lleva a cabo el metabolismo del colesterol es en el hígado, aunque también se producen cantidades considerables en los intestinos.

Existe evidencia de que ciertas cepas *L. acidophilus* y algunas bifidobacterias son capaces de disminuir el nivel de colesterol dentro del intestino. Aún no se ha entendido cual es el papel que juegan estas bacterias probióticas en la disminución

el colesterol, sin embargo, existen tres hipótesis: la primera habla de la existencia de un factor producido en las leches fermentadas que inhibe la síntesis de colesterol en el cuerpo. Otra teoría es que los probióticos desconjugan los ácidos biliares en ácidos grasos libres, los cuales son excretados más fácilmente del tracto intestinal que los ácidos biliares conjugados. Con la liberación de los ácidos biliares del cuerpo, la síntesis de nuevos ácidos biliares a partir de colesterol reduce la concentración de colesterol total en el cuerpo. Una tercera hipótesis es que la reducción del colesterol puede deberse a la co-precipitación del colesterol con ácidos biliares desconjugados a pH bajo, el cual es consecuencia de la producción de ácido láctico por bacterias probióticas.

1.2.2.2.10. *Actividad anticancerígena y antimutagénica*

La acción antitumoral de los probióticos se atribuye a la inhibición de los agentes carcinógenos y/o procarcinógenos, a la producción de compuestos antimutagénicos, a la modulación de enzimas procarcinogénicas en intestino, a la inhibición de las bacterias que convierten procarcinógenos a agentes carcinógenos, a la supresión de tumores por la activación del sistema inmune del huésped y a la reducción del pH intestinal que reduce la actividad microbiana. Kailasapathy y Rybka (1997) informaron sobre varios estudios con animales que confirman que la ingesta de yogurt y leches fermentadas que contienen bacterias probióticas inhibe la formación de tumores y la proliferación de éstos.

En algunos estudios sobre humanos, el consumo de *Lactobacillus acidophilus* demostró una disminución en la mutagenicidad fecal y urinaria. Este efecto también se observa con el consumo de *Lactobacillus casei* Shirota quien ha demostrado tener efectos benéficos en pacientes con cáncer (Lourens y Vijoen, 2001).

1.2.2.3. Dosis terapéutica

Para llevar a cabo la mayoría de estos beneficios a la salud, es necesario que una cantidad suficiente de probióticos viables lleguen al intestino humano (Ng. et al., 2010). Es necesario administrar dosis adecuadas de células viables que logren

conseguir el efecto benéfico, esta cantidad se conoce como “dosis mínima terapéutica” (Lourens y Vijoen, 2001). Con base en los estudios previos que caracterizan una gran variedad de especies y géneros de probióticos, se estableció una dosis mínima requerida de 10^8 UFC/día, para alcanzar los beneficios a la salud. En 1995 Kailasapathy y Chin sugirieron que una dosis terapéutica de probióticos debe tener al menos $10^8 - 10^{10}$ UFC/día. Esta cantidad correspondería al consumo diario de yogurt que tuviera 10^6 UFC/g, lo cual resulta en el consumo de una porción diaria de 100 g. Es recomendable agregar dosis más altas para compensar la pérdida de las células durante su paso en el tracto gastrointestinal (Ng. et al., 2010).

Anteriormente, se estableció que únicamente los microorganismos probióticos viables producen un efecto benéfico. Sin embargo, recientemente se reportó que los probióticos viables y no viables muestran el mismo efecto en el caso de la tolerancia a la lactosa, el tratamiento de gastroenteritis aguda y el tratamiento de candidiasis (Lourens y Vijoen, 2001).

1.2.2.4. Criterios para la elección de cepas probióticas

La base teórica para la selección de microorganismos probióticos incluye inocuidad, funcionalidad y aspectos tecnológicos ilustrados en la Figura 1.3.

Los criterios de inocuidad para seleccionar una cepa probiótica incluyen:

- Las especies deben ser preferentemente de origen humano.
- Deben ser aisladas de un tracto gastrointestinal sano.
- Se debe tener documentación de que no son patógenos.
- No deben estar relacionados con enfermedades como endocarditis infectiva o desórdenes gastrointestinales.
- No deben tener genes transmisibles de resistencia a antibióticos.

Los requerimientos funcionales de las cepas probióticas se deben establecer haciendo uso de métodos *in vitro* y los resultados de estos estudios deben correlacionarse con los análisis clínicos en humanos. Algunos aspectos de funcionalidad que deben ser considerados son:

- Tolerancia a los ácidos y tolerancia al jugo gástrico humano.
- Tolerancia a las sales biliares (es importante para la sobrevivencia en el intestino delgado).
- Adherencia a las superficies epiteliales y persistencia en el tracto gastrointestinal.
- Inmunoestimulación, sin efectos proinflamatorios.
- Actividad antagónica contra patógenos como *Helicobacter pylori*, *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* y *Clostridium difficile*.
- Propiedades antimutagénica y anticarcinogénica.

A pesar de que una cepa cumpla con los criterios de inocuidad y funcionalidad, también es importante tener en cuenta los aspectos tecnológicos. Estos incluyen los siguientes:

- Buenas propiedades sensoriales.
- Resistencia a fagos.
- Viabilidad durante el proceso.
- Estabilidad en el producto y durante el almacenamiento (Saarela et al., 2000).

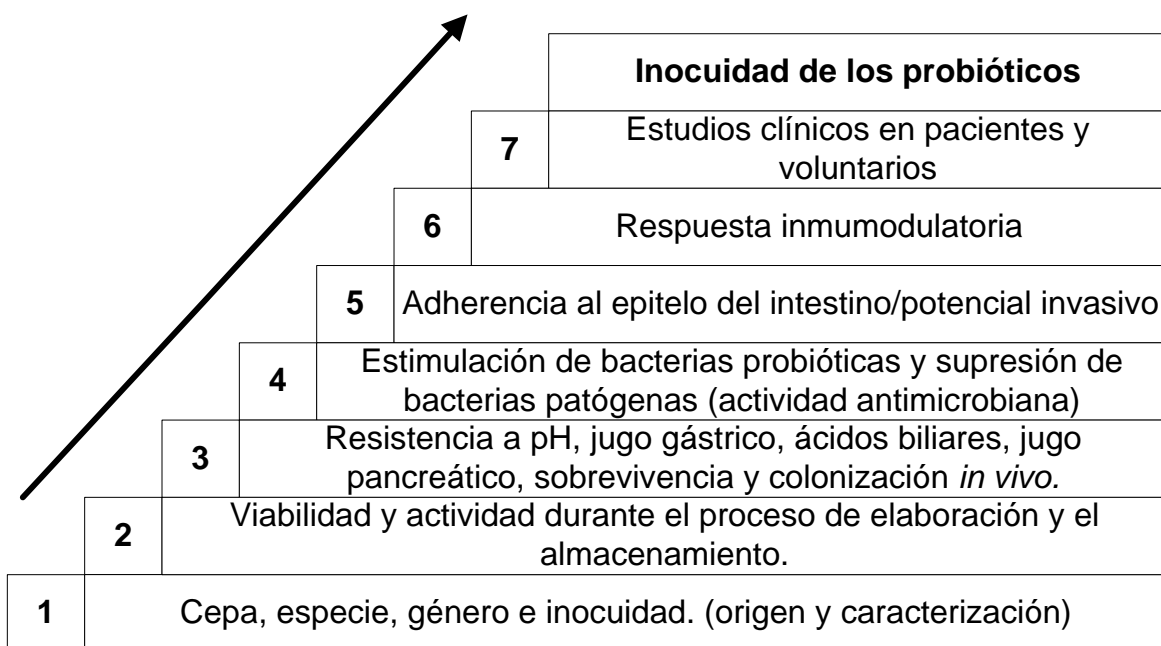


Figura 1.3. Aspectos de seguridad para el empleo de probióticos (Saarela et al., 2000).

Los microorganismos que actualmente se consideran probióticos son: *Lactobacillus casei*, *L. paracasei*, *L. acidophilus*, *L. rhamnosus*, *L. reuteri*, *L. coryniformis*, *L. johnsonii*, *L. fermentum*, *L. gasseri*, *L. plantarum*, *L. calivarius*, *Bifidobacterium longum*, *B. infantis*, *B. bifidum*, *B. animalis*, *B. breve*, *Bacillus subtilis*, *Saccharomyces boulardii*, *Propionibacterium freudenreichii* y *Enterococcus faecium*. (Lallemand Health Ingredients, 2011; Ross y Preedy, 2010).

La viabilidad de las bacterias probióticas inoculadas en los alimentos lácteos fermentados depende de diversos factores como son:

- La interacción entre especies.
- Composición química del medio.
- Condiciones de almacenamiento.
- Porcentaje de acidez.
- Contenido de sólidos totales.
- Disponibilidad de nutriente.
- Promotores e inhibidores de crecimiento.
- Concentración de azúcares.
- Temperatura de incubación.
- Cantidad inoculada inicialmente.
- Concentración de oxígeno (Lourens y Vijoen, 2001).

1.2.2.5. Características de las cepas elegidas para el yogurt

Las bacterias ácido lácticas (BAL) son un grupo de Gram-positivas catalasa negativas, con morfología de bacilos y cocos (Yi-Ting et al., 2007).

1.2.2.5.1. *Lactobacillus casei*

Lactobacillus casei es un bacilo Gram-positivo ordenado en cadenas. No forma esporas y es inmóvil. La célula mide alrededor de 0.7 – 1.1 X 2.0 – 4.0 µm. Es una bacteria “anaerobia facultativa” lo que significa que es capaz de crecer en ausencia y presencia de oxígeno, aunque se desarrolla mejor en condiciones aerobias

(Martínez, 2005). Es un microorganismo organótrofo con metabolismo homofermentativo y se clasifica dentro de las BAL. Su temperatura óptima de crecimiento es de 30°C y su pH óptimo es de 5.5, sin embargo se ha observado que es un microorganismo que puede crecer un rango amplio de temperatura y pH (Isolauri, 1991).

Lactobacillus casei habita en la boca e intestinos de algunos animales, ya que resiste el ácido gástrico y sales biliares presentes en el tracto gastrointestinal.

Los estudios han demostrado que es una bacteria que produce beneficios a la salud y no presenta patogenicidad, es por eso que es considerada como una bacteria probiótica. Además, se sabe que este microorganismo produce D-ácido láctico y amilasa que complementan el crecimiento de *Lactobacillus acidophilus* (Martínez, 2005).

1.2.2.5.2. *Lactobacillus acidophilus*

Es un bacilo Gram-positivo, no esporulado y con una longitud entre 2-10 µm. Crece en condiciones anaeróbicas y a un pH menor a 5. Tienen una temperatura óptima de crecimiento de 37°C y es homofermentativo, lo que significa que produce únicamente ácido láctico a partir de su fermentación. Debido a que requiere carbohidratos para su fermentación, habita en ambientes ricos en azúcar como el intestino animal aunque también se encuentra en la boca y la vagina. Esta bacteria crece de forma natural en una gran variedad de alimentos como carne, pescado y cereales.

El ácido producido por esta bacteria puede ayudar a controlar el crecimiento de *Candida albicans*, que causa candidiasis oral e infecciones vaginales.

L. acidophilus no es un bacteria patógena y al igual que *L. casei* tiene efectos benéficos en la salud, por lo cual se considera un microorganismo probiótico (Martínez, 2005).

1.2.2.6. Sustancias promotoras de crecimiento

Se conocen un gran número de sustancias que promueven el crecimiento de las bacterias probióticas. Por ejemplo, se puede suplementar la leche con la adición de caseinatos, caseína hidrolasa, acetato, fructosa, concentrado de proteína de suero, jugo de tomate o pulpa de papaya, para mejorar el desarrollo de *L. acidophilus*. La estimulación del crecimiento se debe al aumento en la disponibilidad de azúcares simples, principalmente glucosa y fructosa, y minerales como magnesio y manganeso. También la adición de una fuente de nitrógeno en forma de péptidos y aminoácidos, vitaminas, dextrina y maltosa puede ayudar a mejorar la viabilidad de las bifidobacterias.

Algunos de los productos probióticos contienen además de las cepas probióticas, inulina u oligofructosa como “factores bifidogénicos” que también son llamados prebióticos. Los prebióticos son azúcares complejos que no pueden ser metabolizados directamente por los humanos pero funcionan como fuente de carbono para la microbiota intestinal. Los oligosacáridos como fructo-oligosacáridos, lactulosa, rafinosa, estaquiosa y oligómeros de inulina son usados como prebióticos.

La adición de prebióticos en los alimentos lácteos fermentados, permite el crecimiento preferencial de las bacterias probióticas en el colon, ya que estas sustancias no son utilizadas por otras bacterias intestinales, de tal forma que pueden ayudar a mejorar la salud del huésped.

Los productos simbióticos son aquellos en los que se combinan probióticos y prebióticos para regular la microbiota intestinal. Estos oligosacáridos tienen la capacidad de integrarse en el bio-yogurt para aumentar el número de probióticos no sólo en el colon, sino también durante la vida útil del producto (Lourens y Vijoen, 2001).

1.2.3. Métodos tradicionales

El crecimiento de las poblaciones microbianas puede medirse de diferentes maneras. Algunos métodos determinan el número de células y otros la masa total de

la población, que generalmente es directamente proporcional al número de células. La magnitud de la población normalmente se registra como el número de células que hay en un mililitro de líquido o en un gramo de material sólido. Como las poblaciones bacterianas suelen ser muy grandes, la mayoría de los métodos de cuantificación se basan en mediciones directas o indirectas de muestras pequeñas; después se determina mediante cálculos el tamaño de la población total (Tortora et al., 2007).

El método utilizado con más frecuencia para la medición de poblaciones bacterianas es el “recuento en placa”. Una ventaja importante de esta técnica es que mide el número de células viables, sin embargo requiere bastante tiempo, por lo general 24 horas o más, para que se formen colonias visibles. Esto puede plantear un grave problema en algunas aplicaciones.

Cuando se realiza el recuento en placa es importante que crezca un número limitado de colonias en la placa. Cuando hay demasiadas colonias algunas células se encuentran apiñadas y no pueden desarrollarse; esta situación es causa de inexactitudes en el recuento (Tortora et al., 2007). El Standard Methods for the Examination of Dairy Products recomienda que se cuenten sólo las placas con 30 a 300 colonias (Wehr H.M. y Frank J.F, 2004).

1.2.3.1. Recuento en placa de bacterias probióticas

Existe la necesidad de tener un método simple y válido para la cuantificación de las bacterias probióticas en los alimentos lácteos fermentados, para así determinar de manera rutinaria la cantidad inicial de probióticos después de elaborar el producto y para monitorear la viabilidad de las células probióticas durante el almacenamiento en refrigeración y la cadena de distribución (Lourens y Vijoen, 2001). La presencia de muchos géneros de microorganismos dentro de los alimentos fermentados, que además se encuentran estrechamente relacionados, hace que el recuento diferencial entre las bacterias iniciadoras y probióticas sea difícil debido a la similitud de las necesidades de crecimiento y la superposición de los perfiles bioquímicos de la especie (Tabasco et al., 2007). En el pasado no era posible cuantificar de manera adecuada las bacterias probióticas e iniciadoras debido a la falta de medios de cultivo adecuados. Sin embargo, actualmente se han desarrollado medios de cultivo

que consideran el tipo de alimento, las características de las especies o cepas, así como la naturaleza de la competencia entre géneros (Lourens y Vijoen, 2001).

Se han propuesto un gran número de medios de cultivo para la enumeración selectiva y diferencial de los lactobacilos en poblaciones bacterianas mixtas y algunas han sido objeto de revisiones específicas. Con el objetivo de cubrir el mayor espectro de especies, la mayoría de los medios selectivos para la enumeración de mezclas complejas de cultivos contienen antibióticos, los cuales pueden tener impacto en la respuesta no sólo de las especies sensibles sino también de las bacterias blanco, lo cual trae como consecuencia, resultados imprecisos y no reproducibles (Tabasco et al., 2007).

Recientemente se desarrolló una técnica de cuenta en placa para la cuantificación diferencial de las bacterias probióticas y de las bacterias iniciadoras del yogurt, en la cual se emplean medios de cultivo selectivos libres de antibióticos. Las condiciones de incubación que se emplearon se resumen en la Tabla 1.2 (García et al., 2009).

Tabla 1.2. Características de los medios selectivos usados para recuento en placa (García et al., 2009).

Especie	Medio de cultivo	Temperatura/Tiempo	Condiciones atmosféricas
<i>S. thermophilus</i>	M17- Lactosa	45°C / 24 h	Aerobiosis
<i>L. bulgaricus</i>	MRS – Fructosa	45°C / 72 h	Anaerobiosis
<i>L. acidophilus</i>	MRS - Maltosa	37°C / 72 h	Atmósfera de CO ₂
<i>L. casei</i>	MRS - Glucosa	30°C / 72 h	Aerobiosis
<i>B. lactis</i>	MRS - Rafinosa	45°C / 72 h	Anaerobiosis

1.2.4. Métodos moleculares

Algunos microorganismos son difíciles de cultivar, ya que tienen muchos requerimientos de nutrientes, son peligrosos para el personal de laboratorio o no existen medios de cultivo adecuados para su aislamiento. La introducción de

métodos de biología molecular en el laboratorio de microbiología ha resuelto muchos de estos problemas. Estas técnicas se basan en la detección directa de microorganismos en los que el blanco de la prueba es un fragmento específico del genoma de la especie de interés. La sensibilidad y especificidad de los métodos moleculares permite la detección precisa de organismos en muy bajas cantidades de muestra, sin embargo la confiabilidad de los resultados dependerá de la calidad del material genético aislado.

La tecnología actual, permite la identificación rápida y exacta del microorganismo de interés en un tiempo mucho más corto que los métodos tradicionales. En algunas ocasiones las limitaciones que imponen los organismos para crecer en cultivo son superados con el uso de la microbiología molecular (Lizcano, 2005).

Las categorías para la aplicación de métodos moleculares de diagnóstico microbiológico son las mismas que las de los métodos convencionales basados en el fenotipo:

- Detección directa de microorganismos en las muestras.
- Identificación de microorganismos desarrollados en cultivo.
- Caracterización de los microorganismos, más allá de su identificación (Forbes et al., 2009).

1.2.4.1. Extracción de ADN

En las técnicas de biología molecular el ácido desoxirribonucleico (ADN) es el analito. Por lo tanto, una buena muestra implica siempre un correcto proceso de obtención de esta molécula, a partir de material biológico. La extracción de ADN de las células o virus donde se halla confinado es un paso previo en muchos procedimientos analíticos y diagnósticos. Los pasos necesarios para una correcta extracción y purificación de ADN mediante un procedimiento químico son:

- *Lisis celular*: Esta etapa consiste en romper las estructuras que confinan el citoplasma y liberar al medio su contenido (Newsletter Microbial, 2009). Entre los compuestos más utilizados para esta etapa están:

- Detergentes: Entre los que se encuentran el lauril sulfato y el SDS que actúan como agentes tensoactivos que ayudan a romper la membrana celular.
- Enzimas: La lisozima es una enzima que actúa desestabilizando la pared celular bacteriana cuando rompe las uniones glucosídicas entre los polisacáridos N-acetil-glucosamina (NAG) y ácido N-acetilmirámico (NAM) (Zabala, 2005).
- Sales caotrópicas: Éstas ayudan a romper la estructura tridimensional de macromoléculas como las proteínas o los ácidos nucleicos presentes en la membrana consiguiendo su desnaturalización (Rådström et al., 2004).
- **Purificación:** Posterior a la ruptura celular, además del ADN quedan como residuos grandes cantidades de proteínas y ARN que pueden interferir en etapas posteriores, por lo cual deben ser removidos (Giles-Gómez, 2010, *Comunicación personal*; Dale y Schantz, 2007). Para llevar a cabo la degradación de la fracción proteínica asociada al ADN se utilizan enzimas proteolíticas como la pronasa o la Proteinasa K. La fracción proteínica y el material genético también pueden precipitarse con la ayuda de sales como el acetato de amonio o el acetato sódico. Por otro lado, el ARN se puede digerir con el uso de RNasas. La eliminación de impurezas de la muestra termina utilizando solventes orgánicos como fenol y cloroformo, con lo cual se logrará hacer una separación por fases como se muestra en la Figura 1.4 (Zabala, 2005).

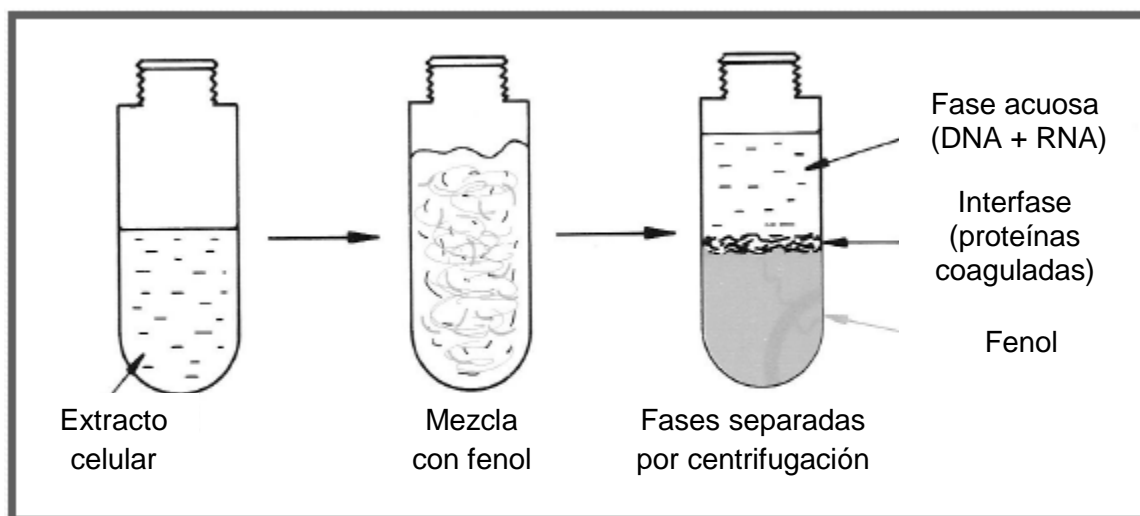


Figura 1.4. Separación de fases durante la extracción de ADN empleando solventes orgánicos (Giles- Gómez, 2010, *Comunicación personal*; Dale y Schantz, 2007).

- *Concentración de ADN.* Esta etapa consta de tres fases:
 - Precipitación del ADN: El ADN es insoluble en alcohol, por lo que se puede precipitar con etanol frío o isopropanol en presencia de un catión monovalente en concentraciones moderadas (acetato de amonio, cloruro de litio, cloruro de sodio y acetato de sodio) y recuperar mediante una centrifugación.
 - Lavado del pellet: Se realiza con etanol frío volviendo a centrifugarse
 - Recuperación: El sedimento se puede resuspender en agua o tampón EDTA Tris tras ser secado completamente. Este paso también puede realizarse con la ayuda de minicolumnas equipadas con una membrana de sílica que retiene específicamente el ADN permitiendo el paso de las moléculas y sales que acompañan la reacción de lisis. Finalmente se lava con alcohol y se eluye el contenido (Zabala, 2005).

Posterior a la extracción es importante conocer la calidad del material genético obtenido, para ello se deben evaluar cuatro aspectos: concentración, integridad, amplificación adecuada y pureza. La concentración del ADN, se mide utilizando el espectrofotómetro de luz ultravioleta (luz UV) a una longitud de onda de 260 y 280 nm (Rådström *et. al.*, 2004; Newsletter Microbial, 2009). La lectura a 260 nos permitirá conocer la concentración de la muestra ya que los ácidos nucleicos absorben la luz UV a 260 nm. La pureza está dada por la proporción de las lecturas a 260/280 (Zabala, 2005), las preparaciones puras de ADN y ARN tienen un rango $D=260/280$ de 1.8-2, si el valor es menor a 1.7, esto indicará que hay contaminación proteínica en la muestra (Giles- Gómez, 2010, *Comunicación personal*; Dale y Schantz, 2007). Una amplificación adecuada del material genético, se logra cuando la muestra no contiene “inhibidores de PCR”, los cuales son sustancias que interfieren en la reacción ya sea mediante un bloqueo total de la actividad catalítica, o mediante la unión directa al ADN de doble cadena. Algunas fuentes importantes de inhibición son los propios reactivos que se usan en el proceso de extracción de ADN, como por ejemplo, el exceso de KCl, NaCl y otras sales, detergentes iónicos, etanol, isopropanol, fenol y otros. Estas sustancias pueden eliminarse mediante purificación química del extracto o mediante columnas de sílica (Newsletter Microbial, 2009). Finalmente, la integridad del material genético se puede evaluar mediante

electroforesis en un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio y observación con luz UV (Rådström *et. al.*, 2004).

Para realizar un análisis de leches fermentadas por medio de métodos moleculares es necesario recuperar suficiente ADN que además tenga la calidad adecuada, es decir, que esté íntegro y puro, por lo cual, es importante contar con un método de extracción de ADN eficiente y reproducible.

La extracción de ADN a partir de cultivos puros de bacterias, ya se encuentra estandarizado, sin embargo, la recuperación a partir de matrices complejas como son los productos lácteos representa un reto. El queso por ejemplo, presenta una matriz rica en grasa, mientras que la leche es menos compleja, por lo que la recuperación del material genético es más sencilla. En el caso de las leches fermentadas se observa que se encuentra en un punto intermedio entre el queso y la leche, debido a su fluidez, su composición lipídica y proteínica.

Se han reportado dos alternativas para la extracción de ADN a partir de yogurt: la primera emplea de citrato de sodio para dispersar las micelas de caseína, mientras que la segunda utiliza EDTA para quelar el catión Ca^{2+} , con lo cual se desestabiliza la matriz de la caseína (Calles *et. al.*, 2010).

1.2.4.2. PCR Punto Final

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ha sido uno de los avances más espectaculares que se han suscitado en los últimos años dentro del campo de la biología molecular (Zabala, 2005).

La PCR es una técnica que permite amplificar rápidamente muestras pequeñas de ADN, es decir, aumentar su cantidad de modo que sea suficiente para poder analizarlas. Si se comienza con un fragmento de ADN del tamaño de un gen, la PCR puede emplearse para formar miles de millones de copias en sólo unas horas. En la Figura 1.5 se muestra el proceso de la PCR donde cada cadena del ADN diana actúa como molde para la síntesis de ADN.

A este ADN se le agregan los cuatro nucleótidos (para que se ensamblen en el nuevo ADN), la enzima necesaria para catalizar la síntesis (ADN polimerasa) y fragmentos cortos de ácidos nucleicos denominados cebadores, para ayudar a iniciar

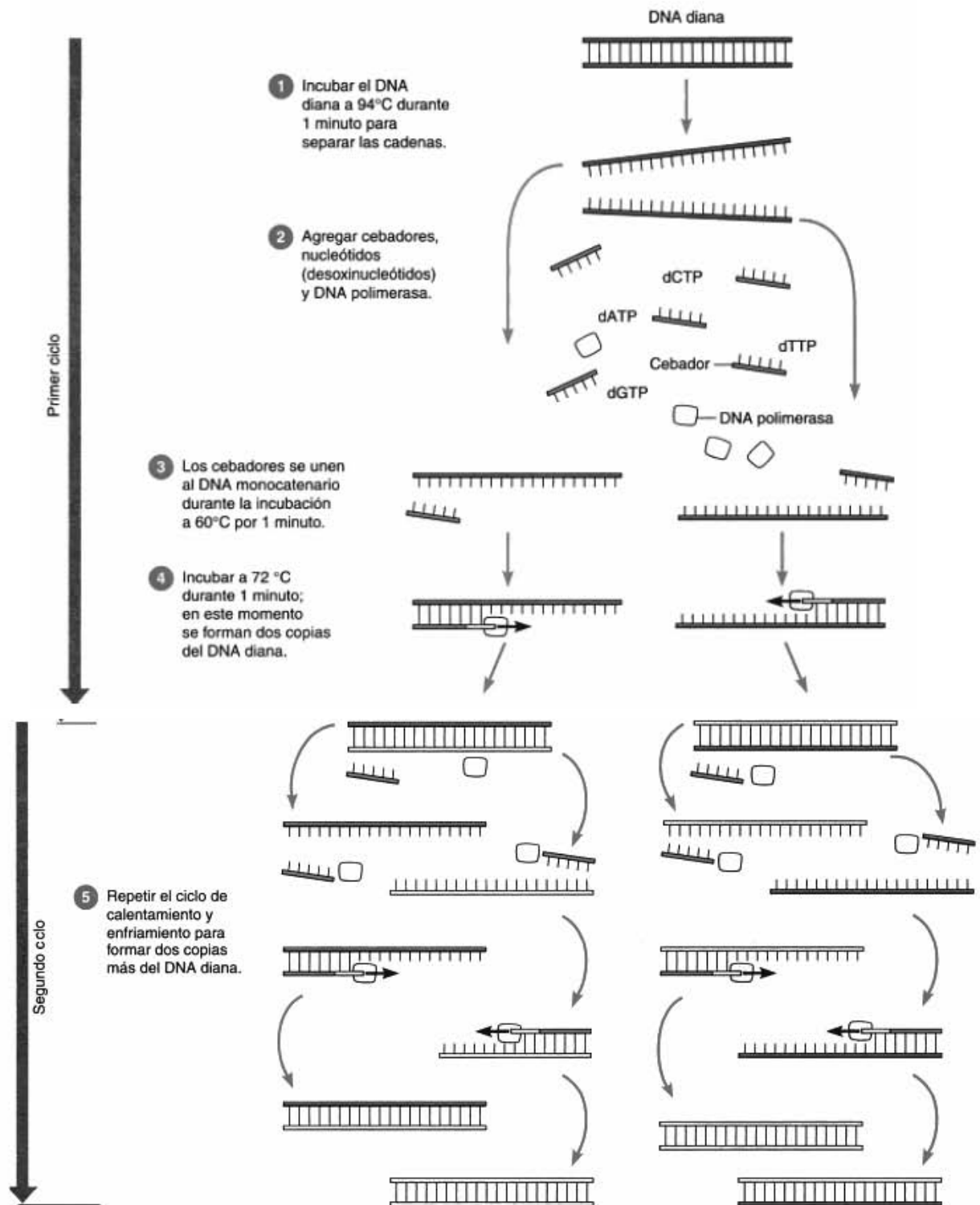


Figura 1.5. Fases de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Tortora et al., 2004).

la reacción. Los cebadores son complementarios a los extremos del ADN diana, por ende, formarán un híbrido con los fragmentos que se van a amplificar (Tortora et al., 2007). Una vez mezclados se inician ciclos, generalmente 30, en los cuales se permite la desnaturalización del ADN para separar las hebras, posteriormente los cebadores se alinean con la porción complementaria del ADN y a continuación la polimerasa lleva a cabo una síntesis exponencial de cadenas nuevas complementarias (extensión). Después de cada ciclo de síntesis, el ADN se calienta para convertir todo el ADN nuevo en cadenas simples. A su vez, cada cadena de ADN recién sintetizada actúa como molde para formar más ADN nuevo (Zabala, 2005; Tortora et al., 2007).

1.2.4.3. PCR Tiempo Real

El primer reporte de PCR en tiempo real fue documentado por Higuchi y colaboradores en 1993. Este procedimiento fue realizado utilizando bromuro de etidio durante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), un termociclador modificado para irradiar rayos UV y una cámara de detección. La señal detectada fue graficada en función de cada ciclo. Los datos finales daban cuenta de la cantidad de producto de PCR que era generado durante los ciclos (Anaya et al., 2005).

En la PCR tiempo real, los procesos de amplificación y detección se producen de manera simultánea. Mediante la detección por fluorescencia se puede medir, durante la amplificación, la cantidad de ADN sintetizado en cada momento, ya que la emisión de fluorescencia producida en la reacción es proporcional a la cantidad de ADN formado. Esto permite evaluar y registrar en todo momento la cinética de la reacción de amplificación.

La PCR tiempo real puede dividirse en 4 fases: la exponencial temprana donde la producción de fluorescencia está por debajo del nivel de detección del termociclador; la exponencial, en la que se da un incremento de la fluorescencia que es proporcional al número de amplicones producidos; la de crecimiento lineal; y la de finalización o *plateau* donde finaliza la reacción y se estabiliza la fluorescencia (Figura 1.6) (Fonseca et al., 2010).

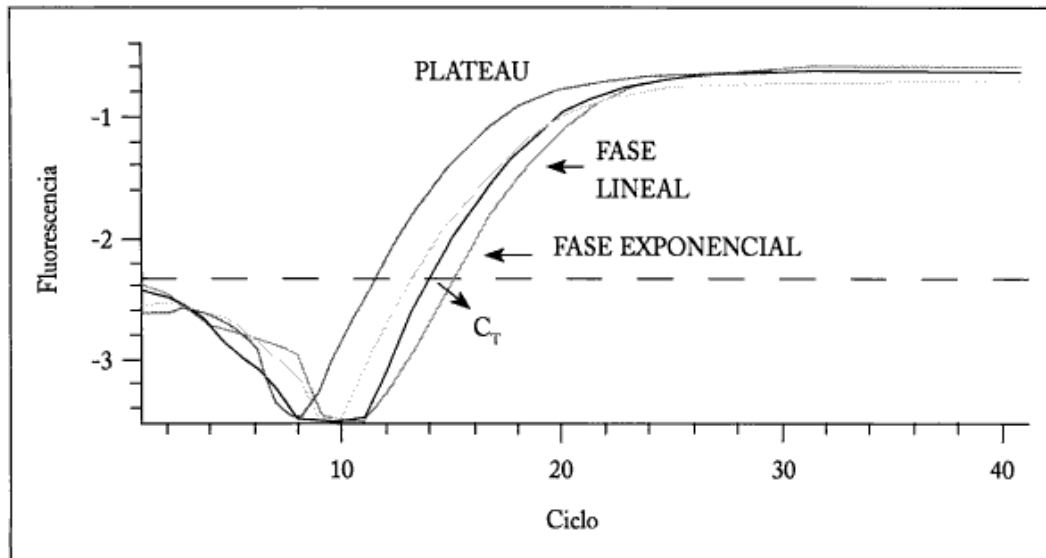


Figura 1.6. Fases de PCR tiempo real. Determinación de Ct (Fonseca et al., 2010).

Durante la fase exponencial de la PCR tiempo real, se realiza una medición inicial a partir de la emisión de fluorescencia basal con el objetivo de que las muestras utilizadas sean comparables y normalizadas. Esta señal es calculada en función de la cantidad de fluorescencia emitida por la reacción, previo a su duplicación exponencial y es graficada en donde la señal originada de una muestra es significativamente mayor que la señal fluorescente de fondo. De esta forma, el número de ciclos de PCR requeridos para generar suficiente señal de fluorescencia que sobrepase la señal basal, se le conoce como punto de corte (C_p , crosspoint) o ciclo umbral (C_t , threshold cycle). Los valores C_t son directamente proporcionales a la cantidad de templado inicial y son la base para calcular los niveles de expresión de mRNA o la cantidad de copias de ADN iniciales (Anaya et al., 2005).

Para llevar a cabo la PCR tiempo real, los termocicladores incorporan un lector de fluorescencia que indican en la pantalla, simultáneamente a la reacción, la fluorescencia emitida por cada muestra evaluada, lo que permite saber el momento real en que empieza la amplificación (Fonseca et al., 2010).

La fluorescencia emitida se debe a la acción de agentes intercalantes o marcadores de unión de ADN y sondas específicas marcadas con fluorocromos. Los primeros son compuestos que se insertan entre las bases de una molécula de ADN, interrumpiendo la alineación y el emparejamiento de bases de las cadenas

complementarias (por ejemplo, colorantes de acridina, bromuro de etidio y SYBR Green). La emisión de fluorescencia se da cuando se unen a un ADN de cadena doble, de tal forma que cuanto mayor cantidad de producto genere la reacción de PCR, mayor cantidad de fluorescencia será emitida (Figura 1.7).

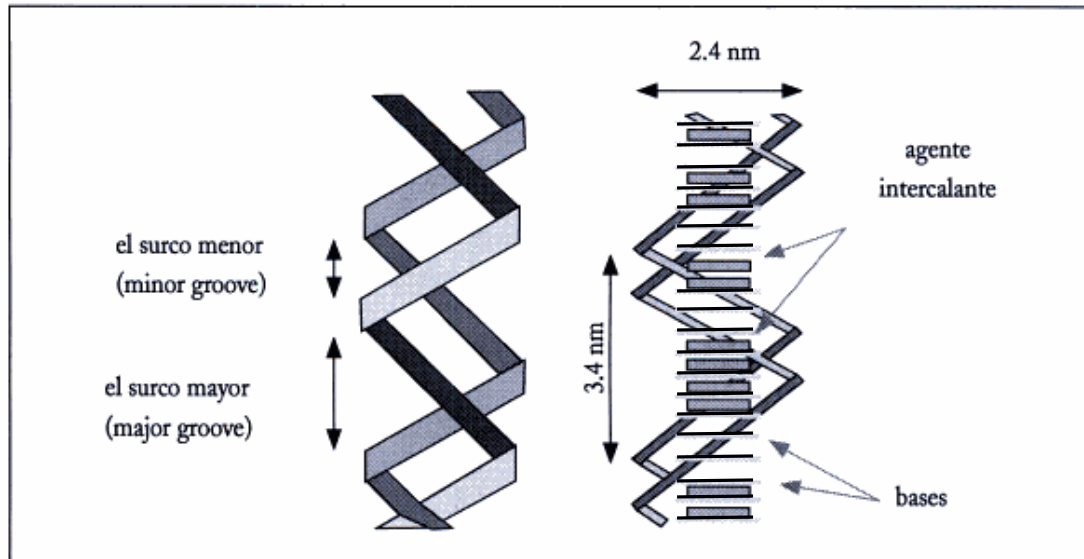


Figura 1.7. Agente intercalante. SYBR Green (Fonseca *et al.*, 2010).

Por otro lado, los ensayos que requieren una alta especificidad mediante para la PCR en tiempo real, utilizan adicionalmente sondas marcadas con fluorocromos, y éstas pueden ser simples, de hibridación o de hidrólisis.

- **Sondas simples:** Corresponden al tipo más sencillo de sonda diseñada para la detección de mutaciones y polimorfismos de nucleótido simple (SNP). Se usan sondas marcadas con un fluorocromo en el extremo o 5', que se hibridan específicamente a la secuencia que contiene el SNP de interés. La fluorescencia es mayor en aquellas muestras en que la sonda es de hibridación, lo que permite identificar normales, homocigotos o heterocigotos para un SNP particular (Fittipaldi *et al.*, 2010).
- **Sondas de hidrólisis o Taqman:** Para este sistema son usados tres oligonucleótidos: un cebador sentido directo, un cebador reverso y una sonda. Todos ellos son específicos para la secuencia de ADN que se desea analizar. El método es dependiente de la actividad exonucleasa 5' – 3' de la Taqman

polimerasa, por tal motivo es recomendable escoger una enzima apropiada con la suficiente actividad y fidelidad que necesita la técnica.

La sonda se encuentra doblemente marcada, por un extremo con un fluorocromo reportero y por otro un marcador extinguidor (quencher). Mientras que la sonda esté intacta, la emisión de fluorescencia es absorbida por el extinguidor (Figura 1.8). El marcador fluorescente se encuentra unido covalentemente al extremo 5' y puede ser FAM (6-carboxifluoresceína), TET (6-carboxi-4,7,2',7'-tetracloro-fluoresceína), JOE (1,7-dimetoxi-4,5-dicloro-6-carboxifluoresceína, HEX (hexacloro-6-carboxifluoresceína) o VIC '(2-cloro-7'-fenil-1,4-dicloro-6-carboxifluoresceína). El extinguidor unido al extremo 3' puede ser TAMRA (6-carboxitetrametilrodamina) o DABCYL [4-(4'-dimetilaminofenilazo) ácido benzoico].

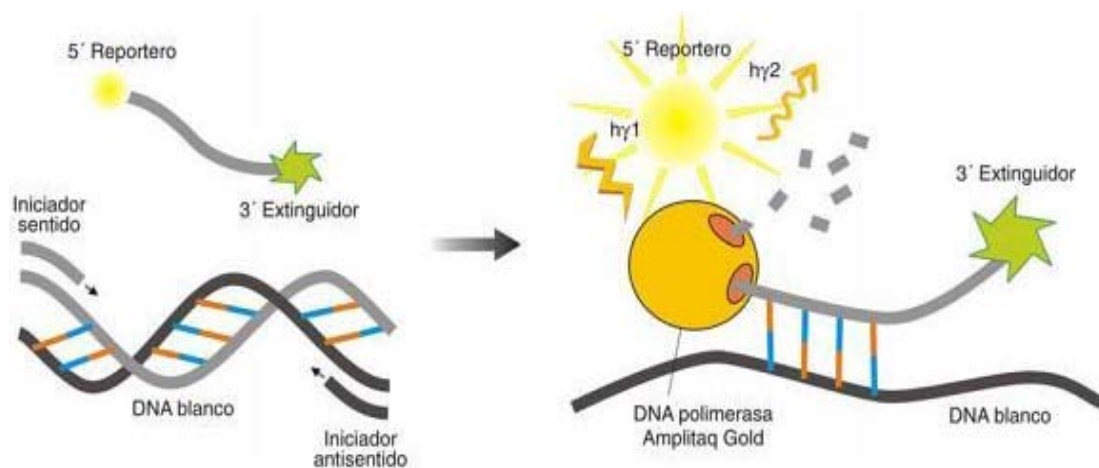


Figura 1.8. Elementos que componen el sistema de sondas de hidrólisis o Taqman (Fonseca et al., 2010).

La proximidad del extinguidor y el fluorocromo permiten que haya FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer), de esta forma no se origina señal de fluorescencia (Anaya et al., 2005). Durante la PCR, la actividad exonucleasa 5' de la polimerasa elimina la sonda, separando el reportero del extinguidor, momento en el que se da la emisión de fluorescencia (Figura 1.9). Los productos de PCR que se acumulan son detectados directamente midiendo la intensidad de la fluorescencia, dado que ésta sólo se produce si la sonda se hibrida, una

ausencia de señal indicaría que la región complementaria a la sonda diseñada no está en el blanco de amplificación.

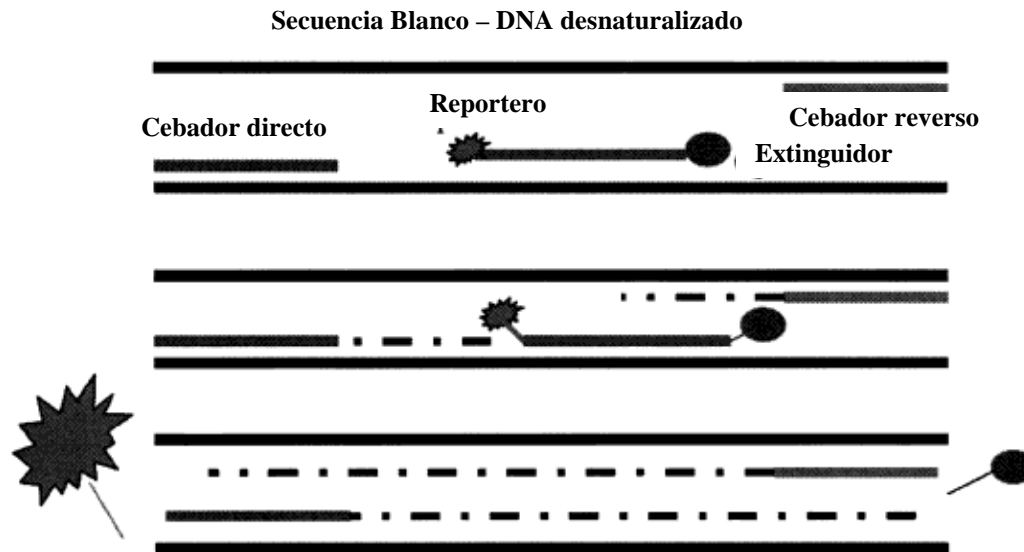


Figura 1.9. Sondas de hidrólisis “Taqman” o actividad nucleasa 5´ (Fonseca et al., 2010).

Una de las aplicaciones más importantes de la PCR tiempo real es la cuantificación de dosis génica que permite la evaluación de deleciones y duplicaciones sobre genes específicos y la cuantificación de expresión génica.

La cuantificación por PCR tiempo real se ha realizado de manera absoluta o relativa:

- *Cuantificación absoluta:* Usa estándares de concentración conocida que han sido diluidos, de tal manera que se generen curvas estándares. Estas curvas producen relaciones lineales entre el Ct y la cantidad inicial de ARN o cADN, permitiendo la determinación de la concentración de muestras desconocidas mediante el análisis de sus Ct y aplicando la ecuación de la recta. El uso de este método asume que la eficiencia de amplificación es la misma para todas las muestras (Figura 1.10).
- *Cuantificación relativa:* Durante la cuantificación relativa, los cambios en la expresión del gen o genes de interés que están siendo evaluados, son medidos tomando como la base la expresión de un control externo o una muestra de referencia llamada calibrador.

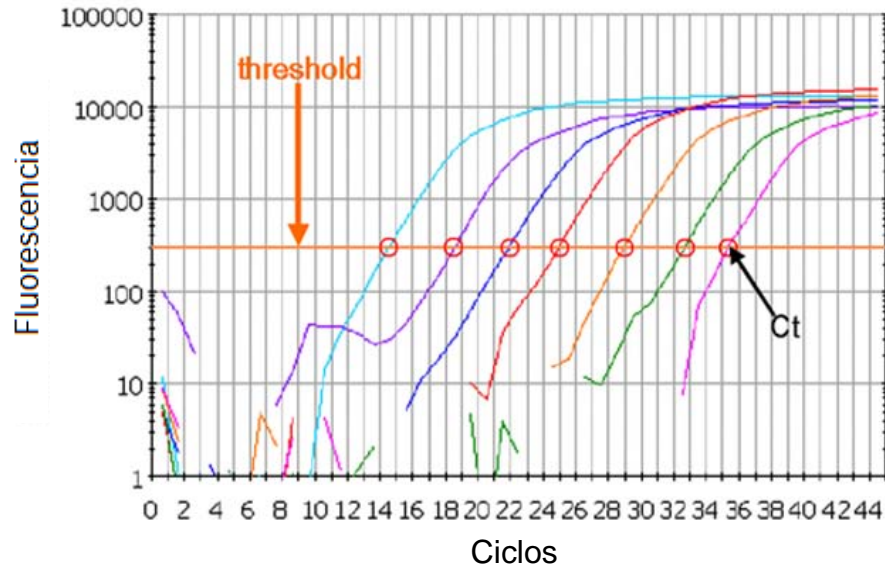


Figura 1.10. Gráfico de amplificación donde puede verse que las muestras diluidas superan el umbral más tarde (Instituto Peruano de Biología Molecular, 2006).

Las principales ventajas de la PCR tiempo real son la rapidez y la sensibilidad, además el uso de sistemas cerrados disminuye el riesgo de contaminación. Los sistemas de tiempo real permiten cuantificar la concentración inicial del ácido nucleico presente en las muestras con mayor sensibilidad en relación con los procedimientos de PCR convencionales. Las principales desventajas de la PCR tiempo real son el costo y el uso de diseños experimentales muy estrictos ante la gran sensibilidad que ofrece la técnica (Fonseca et al., 2010).

1.2.4.4. Monoazida de propidio (PMA)

La actividad metabólica y, en el caso de los microorganismos patógenos, los riesgos potenciales a la salud, se limitan a la parte viva de una población bacteriana mixta. La diferenciación entre células vivas y muertas representa un desafío o en muchos de los diagnósticos microbiológicos, ya que el ADN de las células muertas permanece intacto por tres semanas, por lo cual, los diagnósticos basados en el ADN como la PCR tiempo real, sobreestiman el número de células vivas.

El criterio más importante para diferenciar entre las células viables de las células irreversiblemente dañadas es la integridad de la membrana celular. Las células vivas

con membrana intacta se distinguen por la habilidad de ser impermeables a colorantes, en cambio, estas moléculas pueden penetrar fácilmente en la membrana dañada de las células muertas. Este principio es usado comúnmente en la discriminación microscópica vivo-muerto y en la citometría de flujo. El colorante que más se emplea es el “yoduro de propidio” (PI).

Como alternativa para poder diferenciar entre células viables de las muertas, se han reportado estudios recientes en los cuales se emplea la monoazida de propidio (fenantridio, 3-amino-8-azida-5-[3-(dietilmetilamonio) propilo]-6-fenil dicloro; PMA), este reactivo es idéntico al PI excepto porque tiene un grupo azida. El PMA es un colorante que se intercala con el ADN, para esto, primero se debe poner en contacto con las células durante 5 min en la oscuridad de tal forma que penetre en las células con membrana dañada. Posteriormente, esta molécula se expone a la luz visible (absorbancia máxima a 460 nm) para que se genere un intermediario reactivo, el nitreno, el cual puede formar un enlace covalente con el ADN de las células muertas. Este proceso hace insoluble al ADN, de tal forma que en la subsecuente extracción de ADN se elimina el material genético de las células muertas junto con los desechos (Figura 1.11). El PMA que no se une, permanece libre en la solución y es desactivado simultáneamente con las moléculas de agua, la hidroxilamina resultante no es capaz de unirse al ADN. El material genético de las células viables, permanece intacto ya que al tener una membrana íntegra, no permite que el PMA penetre (Nocker et al., 2006). El empleo de este reactivo está sustentado por los estudios realizados por Hein y col. (2007), quienes comprobaron que este procedimiento no afecta la sensibilidad de la técnica de PCR tiempo real.

El PMA ha sido empleado en diversos trabajos con resultados satisfactorios, como por ejemplo: en el monitoreo de la eficiencia de diferentes métodos de desinfección (Nocker et al., 2007); en la detección de bacterias vivas usando tecnología de microarreglos (Nocker et al., 2009); en la cuantificación de microorganismos indicadores fecales en aguas residuales (Varma et al., 2009) y en la cuantificación de hongos en muestras de aire y agua (Vesper et al., 2008). Se han reportado también algunas limitaciones del método cuando se emplea en muestras tratadas con luz UV, ya que en este tipo de muestras la membrana permanece

intacta, por lo cual, el reactivo no puede ejercer su capacidad discriminatoria (Fittipaldi et al., 2010; Nocker et al., 2007).

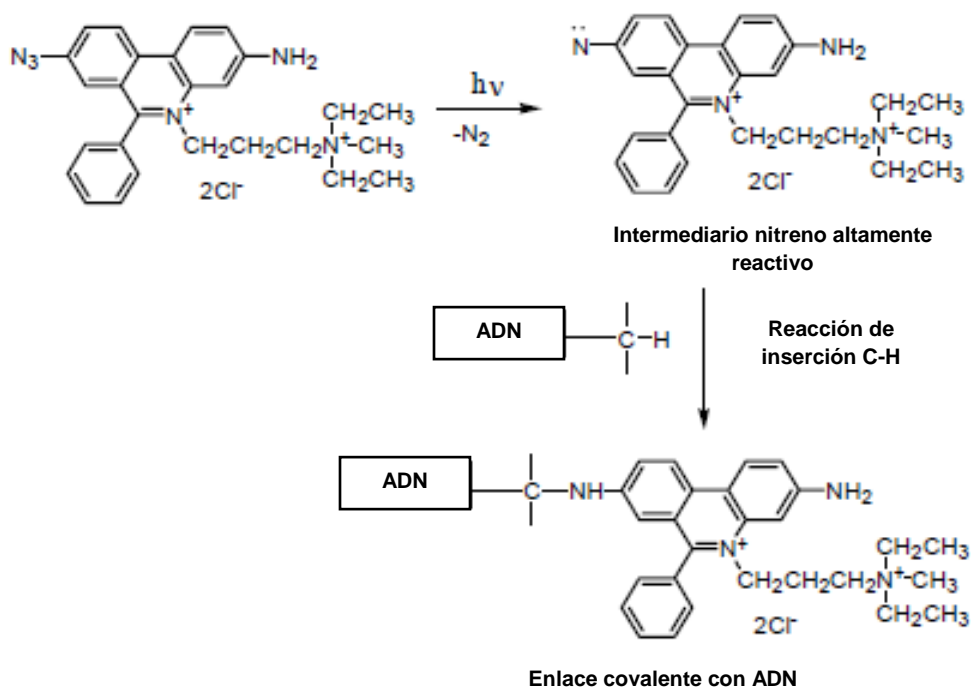


Figura 1.11. Principio de modificación del ADN por acción del PMA (Biotium, 2011).

Capítulo II

Justificación

El yogurt ha sido reconocido durante muchos años como un producto saludable, ya que representa una buena fuente de vitaminas y minerales, contiene proteínas de la mejor calidad nutricional y bajo o nulo contenido de lactosa. Los microorganismos que deben estar presentes en un yogurt tradicional son *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, estos conducen al mejoramiento nutricional y de la digestibilidad del producto fermentado, aunque no suelen formar parte de la microbiota nativa del intestino de los mamíferos y muestran una supervivencia limitada después de la ingestión oral. Es por esto que en los últimos años el yogurt se ha reformulado para aportar bacterias probióticas que puedan proporcionar beneficios adicionales a la salud del consumidor (Bertazzoni et al., 2004). Así, con la capacidad innata de promover la salud, la viabilidad de estos microorganismos es un requisito indispensable para lograr los supuestos efectos benéficos. Por lo tanto, los diferentes vehículos de entrega de probióticos deben ser estudiados y optimizados para garantizar que los microorganismos vivos son entregados en cantidades adecuadas antes de la fecha de caducidad.

Existe la necesidad de tener un método simple y válido para la cuantificación de las bacterias probióticas en los alimentos lácteos fermentados, para así determinar de manera rutinaria la cantidad inicial de probióticos después de elaborar el producto y para monitorear la viabilidad de las células probióticas durante el almacenamiento en refrigeración y la cadena de distribución (Lourens y Viljoen 2001). Dicha metodología debe contemplar la diferenciación entre los microorganismos iniciadores y los probióticos, ya que estos se encuentran estrechamente relacionados.

El yogurt funcional desarrollado, será complementado con las bacterias probióticas *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus casei*, por tal razón, en el

presente trabajo se deberán realizar los análisis pertinentes para determinar la cantidad de bacterias probióticas viables a lo largo de la vida de anaquel del producto, lo cual se realizará empleando medios selectivos y la técnica de PCR tiempo real.

Capítulo III

Hipótesis y Objetivos

3.1. Hipótesis

El yogurt desarrollado en el laboratorio presentó una acidez de 1.2% de ácido láctico que corresponde a un pH de 4.1 a 4.4. Considerando dichas características fisicoquímicas y que se mantendrá almacenado a 4°C, se espera que al agregarle probióticos acidófilos del género *Lactobacillus*, éstos se mantengan en el mismo orden de magnitud a lo largo de la vida de anaquel.

3.2. Objetivos

3.2.1. Objetivo general

Comprobar la viabilidad de los probióticos *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus casei*, en un yogurt simbiótico, a lo largo de la vida de anaquel del mismo.

3.2.2. Objetivos particulares

- Determinar el medio de cultivo y las condiciones adecuadas para cuantificar a *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus casei*, y diferenciarlos de los cultivos iniciadores del yogurt.

- Determinar la viabilidad de los probióticos en cuatro diferentes formulaciones de yogurt simbiótico a lo largo de su vida de anaquel.
- Establecer la mejor metodología para la extracción de ADN a partir de los microorganismos presentes en el yogurt, con la calidad adecuada para ser utilizado en PCR.
- Estandarizar el método de PCR en tiempo real para la cuantificación de cada uno de los probióticos: *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus casei*.
- Implementar el empleo del reactivo PMA, como método de discriminación de células no viables.

Capítulo IV

Metodología

En la Figura 4.1 se presenta la metodología general para la cuantificación de microorganismos probióticos inoculados en el yogurt simbiótico desarrollado en el laboratorio.

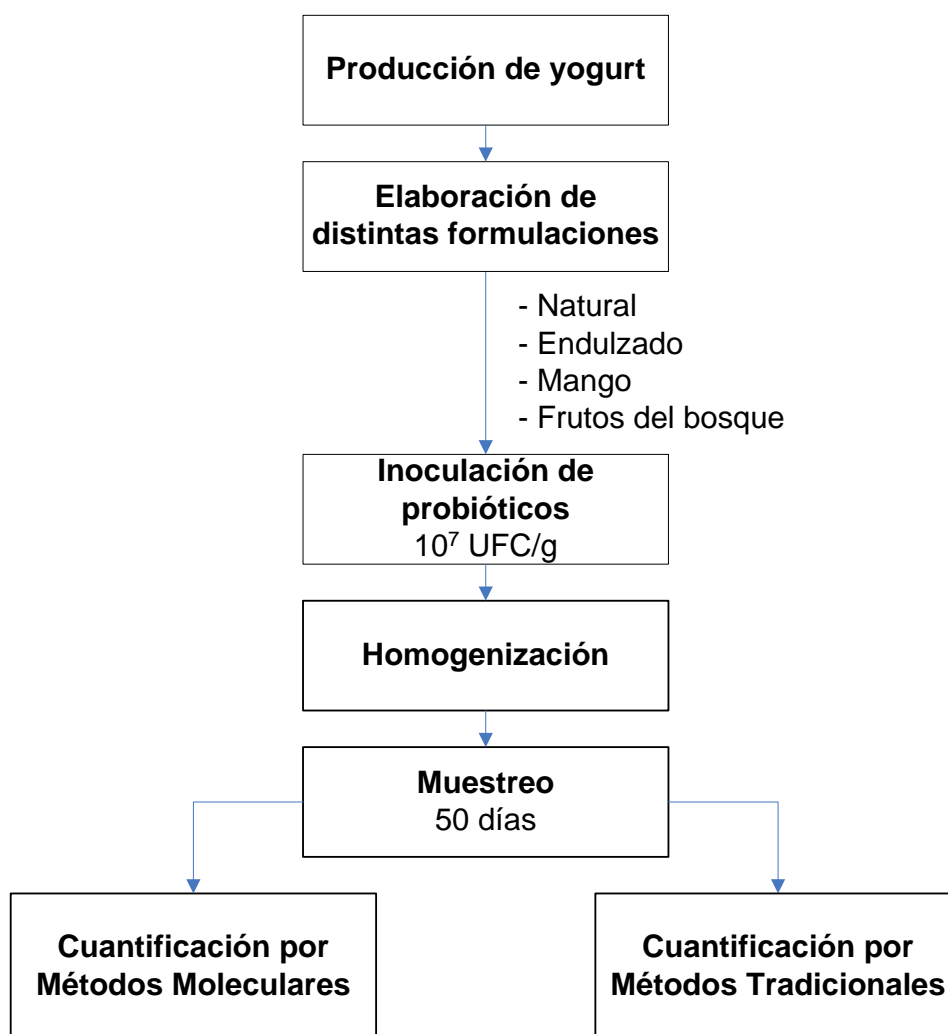


Figura 4.1. Metodología general para cuantificación de microorganismos probióticos en yogurt.

En las Figuras 4.2 y 4.3 se describe de forma más detallada las metodologías tradicional y molecular, empleadas para la cuantificación de bacterias probióticas.

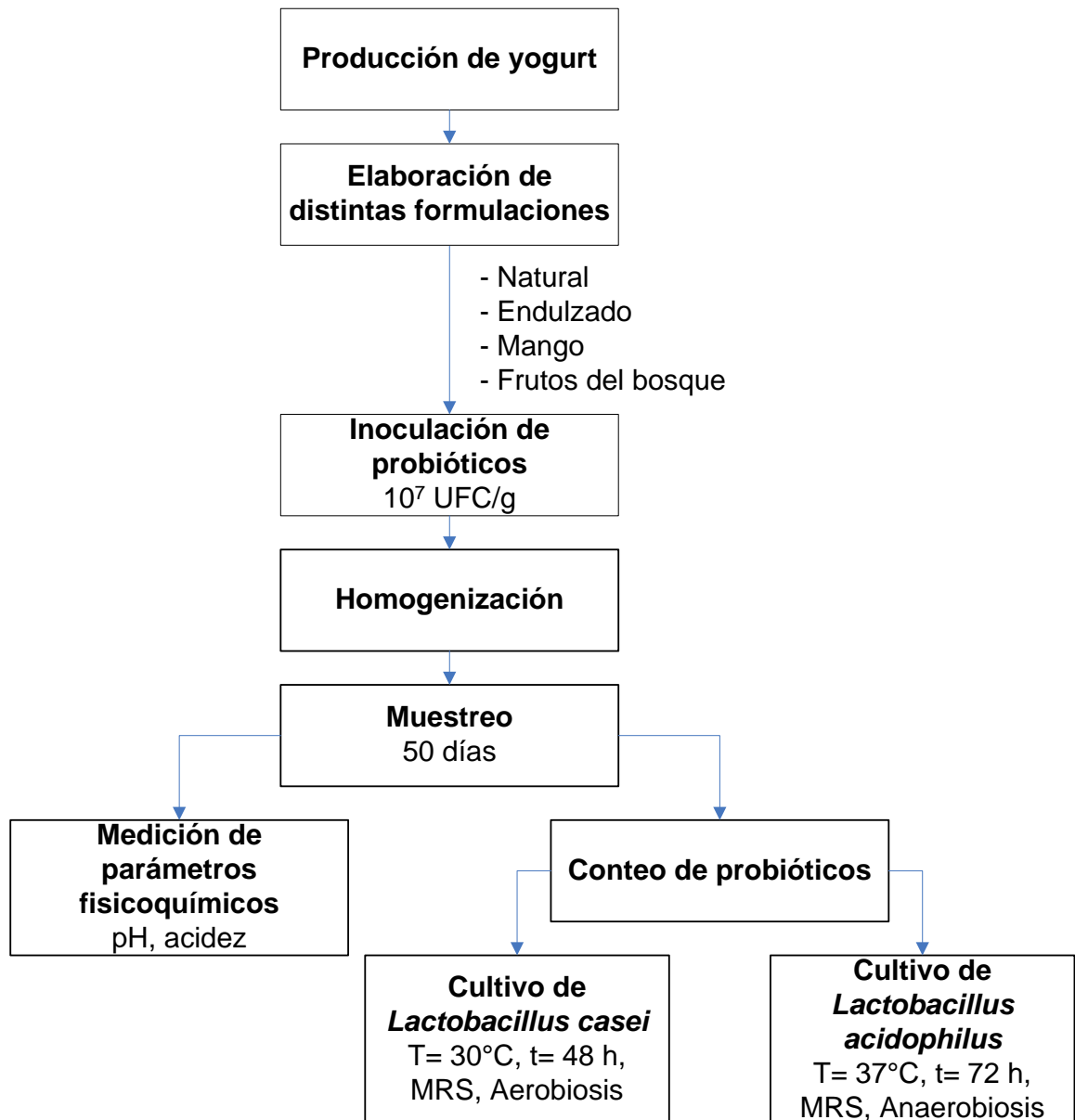


Figura 4.2. Metodología para la cuantificación de microorganismos probióticos en yogurt por métodos tradicionales.

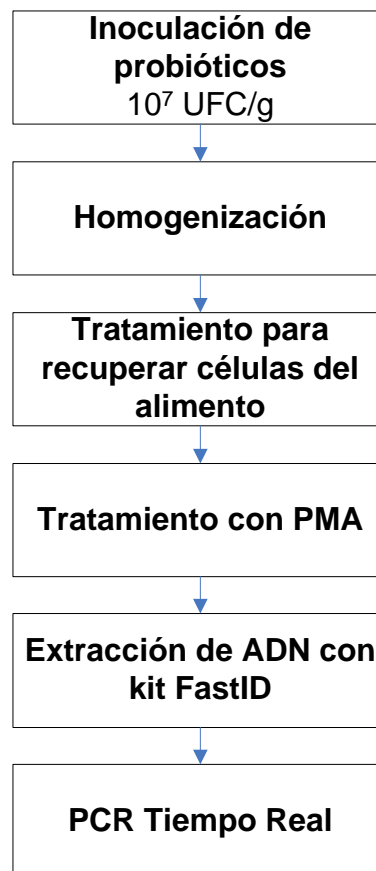


Figura 4.3. Metodología para la cuantificación de microorganismos probióticos en yogurt por métodos moleculares.

4.1. Descripción de las muestras

En el estudio se emplearon dos tipos de yogurt:

- Yogurt Alpura natural (se utilizó únicamente para pruebas de recuperación celular).
- Yogurt simbiótico desarrollado en el laboratorio. La composición y proceso de elaboración de dicho producto han sido descritas en el Capítulo I del presente trabajo.

El yogurt simbiótico contenía los microorganismos probióticos *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus casei*, además se complementó con fibra soluble como prebiótico.

La cantidad de probióticos adicionada a dicho yogurt fue de 10^7 UFC/mL o g de yogurt (la densidad del producto es de 1.02 g/mL), dicha concentración se determinó considerando la NOM-181-SCFI-2010 (Dirección General de Normas, 2011), la dosis terapéutica reportada por Kailasapathy (Ng. *et. al*, 2010) y el consumo promedio de yogurt de un mexicano (Revista NEO, 2010) (Anexo E). Como probióticos se emplearon los cultivos liofilizados de la marca Christian Hansen®, las especificaciones de este producto de acuerdo al proveedor son:

Tabla 4.1. Especificaciones de cultivos liofilizados (Christian Hansen®).

Microorganismo	UFC/g
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	3.3×10^{10}
<i>Lactobacillus casei</i>	5.8×10^{10}

La evaluación de viabilidad de los probióticos durante la vida de anaquel del producto se llevó a cabo en cuatro diferentes formulaciones de yogurt (natural, endulzado, con mango y con frutos del bosque), las cuales permanecieron almacenadas a 4°C hasta el momento del análisis.

Adicionalmente, para algunos análisis por medio de métodos moleculares, se emplearon los cultivos liofilizados de *Lactobacillus rhamnosus*, *Bifidobacterium* spp., *Bacillus subtilis* y *Lactobacillus casei*, de los cuales no se poseen las especificaciones.

4.1.1. Inoculación de microorganismos probióticos y homogenización

De acuerdo a las especificaciones del proveedor de probióticos liofilizados (Christian Hansen ®), cada gramo de liofilizado contiene alrededor de 10^{10} UFC, por lo cual, la cantidad a adicionar de probióticos fue de un gramo de liofilizado por cada kilogramo de yogurt, es decir, 500 mg de *L. acidophilus* y 500 mg de *L. casei*.

Con la finalidad de favorecer la correcta distribución de los microorganismos probióticos en el yogurt, se aplicaron dos estrategias diferentes. Si la cantidad a adicionar de cada probiótico era menor a 0.1 g se pesaron 10 veces más de la cantidad requerida y posteriormente se resuspendieron en 10 mL de agua peptonada; de esta forma se inoculó con 1 mL de esta suspensión en el yogurt. Si la cantidad de liofilizado necesaria era mayor a 0.1 g, se pesaron en un envase estéril y se resuspendieron en un volumen de agua peptonada equivalente al 1% del volumen de yogurt a inocular.

El inóculo de bacterias probióticas se homogenizó con una espátula estéril mediante movimientos circulares y verticales, procurando no romper la estructura del yogurt.

4.2. Métodos tradicionales

La cuantificación de microorganismos probióticos en los alimentos fermentados como el yogurt, representa un reto debido a la presencia de las bacterias iniciadoras las cuales se encuentran estrechamente relacionadas con los probióticos, por tal razón, es importante verificar que los medios de cultivo y condiciones seleccionados para cuantificar a las bacterias probióticas, no permitan el crecimiento de los microorganismos iniciadores del yogurt.

García-Cayuela y col. (2009) desarrollaron una técnica de cuenta en placa para la cuantificación diferencial de las bacterias probióticas y de las bacterias iniciadoras del yogurt, en la cual se emplean medios de cultivo selectivos libres de antibióticos.

A fin de verificar la selectividad de los medios de cultivo reportados por García-Cayuela se realizaron una serie de pruebas en las que se evaluó el crecimiento de las bacterias probióticas *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus casei* en las condiciones ideales para su crecimiento y en las condiciones ideales para el microorganismo contrario. Asimismo, se hizo una mezcla de ambos microorganismos probióticos y se cultivaron en las condiciones ideales de cada una de las bacterias. Lo anteriormente mencionado se ilustra en la Tabla 4.2.

Tabla 4.2. Pruebas de verificación de selectividad de medios de cultivo para bacterias probióticas.

Microorganismo	Medio	Condiciones de incubación	Clave
<i>Lactobacillus casei</i>	MRS normal	30°C / 48h Aerobiosis	C1
	MRS normal	30°C / 48h Anaerobiosis	C2
	MRS enriquecido	37°C / 48h Anaerobiosis	C3
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	MRS enriquecido	37°C / 72h Anaerobiosis	A1
	MRS enriquecido	37°C / 72h Aerobiosis	A2
	MRS normal	30°C / 72h Aerobiosis	A3
Mezcla	MRS normal	37°C / 72h	M1
	MRS enriquecido	Anaerobiosis	M2
	MRS normal	30°C / 72h	M3
	MRS enriquecido	Aerobiosis	M4

Los recuadros sombreados corresponden a las condiciones ideales para el microorganismo probiótico en cuestión

Para llevar a cabo la cuenta en placa de los microorganismos probióticos por separado, primero se pesaron en tubos estériles diferentes, 500 mg de liofilizado de *L. casei* y 500 mg de *L. acidophilus*. A continuación, los liofilizados se disolvieron en 4.5 mL de agua peptonada estéril, para así obtener la dilución 10^{-1} . A partir de este stock se hicieron diluciones decimales hasta 10^{-8} , posteriormente se inoculó por medio de la técnica de vertido en placa, 1 mL de la dilución 10^{-6} , 10^{-7} y 10^{-8} en cajas de Petri. Las cajas se incubaron en las condiciones establecidas en la Tabla 4.2. El agar MRS enriquecido, se modificó con: 0.2 % p/v Tween 80, 1% p/v maltosa, 0.05% p/v cisteína y 1.5% p/v agar (MRS-maltosa) (Tabasco et al., 2007). Finalizado el tiempo de incubación se contaron las cajas de Petri que contenían un número de colonias entre 30 a 300.

La cuenta en placa de microorganismos probióticos mezclados se efectuó de manera similar a la descrita anteriormente, sin embargo el stock de la mezcla se preparó combinando 2 mL del stock de *L. acidophilus* y 2 mL del stock de *L. casei*.

Para verificar que las colonias desarrolladas correspondieran a los microorganismos probióticos cultivados se realizó una tinción de Gram de las colonias desarrolladas en las condiciones C1 y A1.

Una vez seleccionadas las condiciones y medios de cultivo ideales para el crecimiento selectivo de los microorganismos probióticos, se realizó una cuenta en placa a partir de yogurt sin probióticos y otra de yogurt con probióticos, con la finalidad de verificar que no interfirieran los microorganismos iniciadores.

4.3. Métodos moleculares

Debido a que la metodología para la cuantificación de microorganismos en yogurt por medio de PCR tiempo real, no había sido probada anteriormente en el laboratorio, como primer paso, se estandarizaron por separado cada una de las etapas presentadas en la Figura 4.3.

4.3.1. Tratamiento para recuperar las células del yogurt

Los microorganismos probióticos e iniciadores del yogurt se encuentran suspendidos dentro de la matriz del alimento, la cual está compuesta principalmente por proteínas, grasas, carbohidratos y agua. Es por eso que la extracción del material genético debe incluir una etapa adicional para la recuperación de las células, tomando en cuenta las características del alimento en cuestión. Considerando la composición proteínica y la adición de fibra soluble al yogurt, se probaron 5 procedimientos distintos para la recuperación celular, estas metodologías se basaron en los experimentos propuestos por Calles (2010) y García-Cayuela (2009).

Como primer paso, se elaboró un stock de probióticos pesando 750 mg de *Lactobacillus acidophilus* y 750 mg *Lactobacillus casei*, los cuales se disolvieron en 10 mL de agua peptonada. Posteriormente, se inoculó 1 mL de esta solución en 150 g de yogurt Alpura® natural, para obtener una concentración final 10^7 UFC por g de yogurt. El inóculo se homogenizó con una espátula estéril mediante movimientos circulares y verticales. Después de inocular las bacterias probióticas en el yogurt, se

llevaron a cabo los diferentes tratamientos para el aislamiento celular, los cuales se describirán brevemente a continuación. Una descripción más detallada de cada una de las metodologías se presenta en el Anexo B.

En el *Protocolo I* primero se agregaron a 15 g de yogurt, 20 mL de citrato trisódico 1 M para dispersar las micelas de caseína y se ajustó el pH hasta 6.7 ± 0.2 , con NaOH 50% p/v. A continuación, la muestra se centrifugó a 1,500 g por 10 min y se retiró la grasa. El sobrenadante se transfirió a un microtubo limpio, se centrifugó a 24,000 g durante 10 min y se eliminó el sobrenadante procurando no tocar el sedimento del fondo (pellet celular). Finalmente el pellet se resuspendió en solución salina isotónica (SSI) 0.85% p/v, se centrifugó a 16,000 g por 1 min y se retiró el sobrenadante.

En *Protocolo II* consistió en la dispersión de las micelas de caseína de 1.5 g de yogurt con citrato trisódico al 50% p/v. Posteriormente se centrifugó a 16,000 g por 1 minuto y se eliminó el sobrenadante.

Como primer paso, en el *Protocolo III*, se dispersaron las micelas de caseína de 15 g de yogurt con citrato trisódico 1 M y se ajustó el pH de la solución hasta 6.7 ± 0.2 con NaOH 50% p/v. A continuación, se agregaron neutrasas a la solución y se incubó a 45°C durante 90 min para favorecer la proteólisis. Posteriormente la muestra fue centrifugada 10 min a 1,500 g, se retiró la grasa con un hisopo y el sobrenadante obtenido fue transferido a un tubo limpio para volver a ser centrifugado a 24,000 g durante 10 min. Finalmente el pellet celular se resuspendió en SSI 0.85% p/v, se centrifugó a 16,000 g 1 min y se eliminó el sobrenadante.

Por otra parte, el *Protocolo IV* se realizó adicionando citrato trisódico 50% p/v a 15 g de yogurt. Posteriormente se ajustó el pH hasta 6.7 ± 0.2 con NaOH 50% p/v y la solución se centrifugó 10 min a 21,000 g. Consecutivamente se retiró la capa superior de grasa con un hisopo y se eliminó sobrenadante. El pellet celular se resuspendió en 500 μ L de SSI 0.85 % p/v y se trasvasó dicho volumen a un tubo estéril. Para que el trasvase fuera cuantitativo se enjuagó dos veces más el tubo donde se obtuvo el pellet y los volúmenes se transfirieron al tubo estéril para así obtener un volumen final de 1.5 mL. Finalmente, se centrifugó por 10 min a 16,000 g, se retiró la capa superior de grasa y se desechó el sobrenadante.

El *Protocolo V* se llevó a cabo de la misma forma que el *Protocolo IV*, con la diferencia de que en el primero, después de ajustar el pH, la muestra fue diluida con solución salina isotónica.

Para evaluar la eficiencia de las metodologías de aislamiento, se realizó la extracción de ADN con el kit FastID (Sección 4.3.3) a partir de la biomasa obtenida y posteriormente se midió la concentración y la relación 260/280 del material genético en el lector de placas Epoch TM, BIOTEK.

Los resultados obtenidos a través de las cinco técnicas se compararon con un control, el cual se elaboró haciendo una extracción de ADN a partir de 0.5 mL de la solución stock de probióticos descrita anteriormente.

4.3.2. Evaluación de la eficiencia del reactivo PMA

Con el objetivo de evaluar la eficiencia del reactivo PMA (Biotium Inc®) para discriminar las células muertas de las vivas, se tomó como referencia uno de los protocolos descritos por Nocker y col. (2007), en el cual las células de *Mycobacterium avium* ssp. *avium* se expusieron a altas temperaturas. La disminución de la concentración de microorganismos se evaluó por medio de la técnica de PCR en tiempo real y el método de cuenta en placa.

Basándose en la referencia anterior, se pesaron 800 mg de cultivo liofilizado *Lactobacillus casei* y se disolvieron en 8.1 mL de agua peptonada para obtener una solución de 10^9 UFC/mL. La solución anterior fue dividida en 8 muestras de 1 mL, seis de estas alícuotas fueron sometidas a una temperatura distinta durante 15 min (50°C, 60°C y 70°C, por duplicado), mientras que las dos muestras restantes se mantuvieron a temperatura ambiente. Posteriormente, se trataron todas las muestras con el reactivo PMA siguiendo el protocolo descrito por Nocker y col. (2007) con algunas modificaciones.

Las muestras tratadas térmicamente se centrifugaron por 10 min a 16,000 g en microcentrífuga (Eppendorf 5415 C) y se desechó el sobrenadante. El pellet celular se lavó con en 500 μ L (SSI) al 0.85% p/v y se centrifugó a 8,000 g por 10 min, para posteriormente eliminar el sobrenadante. Consecutivamente se resuspendió el pellet celular en 500 μ L de MilliQ y se agitó vigorosamente en vórtex hasta alcanzar la

disolución total. A esta última solución se le adicionó 1.25 μL de PMA 20 mM, en la oscuridad y se incubó en el mismo lugar durante 10 min, agitando ocasionalmente. A continuación los tubos se colocaron sobre hielo en posición horizontal y se expusieron a una fuente de luz de halógeno de 500 W por 15 min a 20 cm de distancia. Inmediatamente las muestras fueron centrifugadas a 8,000 g durante 10 min y se eliminó el sobrenadante. En seguida el pellet celular se lavó tres veces, el primer lavado se realizó con 500 μL SSI al 1.5% p/v y los dos últimos se hicieron con 500 μL SSI al 0.85% p/v; entre cada lavado las muestras se centrifugaron a 8,000 g por 10 min y se desecharon los sobrenadantes (Anexo C).

Una vez realizado el tratamiento con el reactivo PMA, se realizó la extracción de ADN de las células con el kit FastID® de acuerdo a la metodología descrita en la Sección 4.3.3. A continuación se obtuvo la relación A260/A280 y la concentración de ADN con el Software GEN 5 1.10 y el lector de microplacas Epoch BIOTEK®. Adicionalmente se realizó un estudio de PCR tiempo real, para analizar la diferencia en las curvas de amplificación entre el ADN de las células de cada uno de los tratamientos. Las condiciones de reacción son las mismas que se presentan en la Sección 4.3.4, sin embargo la mezcla de reacción es diferente ya que únicamente se trabajó con los cebadores y la sonda de *L. casei* (Tabla 4.3).

Tabla 4.3. Mezcla de reacción para PCR tiempo real (Ensayo normal).

Componente	Concentración de reactivos	Concentración de la reacción	μL por reacción
Master Mix	2 X	1 X	10 μL
Lbcasei	5 μM	0.15 μM	0.6 μL
Casrev	10 μM	0.6 μM	1.2 μL
Casfor	10 μM		1.2 μL
Agua			5 μL
ADN total			2 μL
Total			20 μL

La evaluación de este tratamiento también se llevó a cabo por medio de cuenta en placa, con la finalidad de verificar que existiera una correlación con los resultados obtenidos a través de PCR tiempo real. En esta técnica primero se pesaron 100 mg de *L. casei* en 8 tubos estériles y se disolvieron en 900 µL de agua peptonada. A continuación, las muestras se trataron a cuatro diferentes temperaturas durante 15 min por duplicado (Sin tratamiento, 50°C, 60°C y 70°C) y se hicieron diluciones seriadas hasta 10⁻⁸. El medio de cultivo empleado para cultivar al microorganismo probiótico fue MRS enriquecido (Anexo A) y se incubó en condiciones aerobias a 29°C por 48 horas (Tabasco et al., 2007).

4.3.3. Extracción de ADN con kit FastID

Para verificar la eficiencia del sistema de extracción de ADN se realizaron extracciones de 200 mg de los cultivos liofilizados del Instituto Rosell: *Lactobacillus rhamnosus*, *Bifidobacterium* spp., *Bacillus subtilis* y *Lactobacillus casei*; haciendo uso del kit FastID® (Genetic ID). Dicho kit ha sido utilizado anteriormente en el laboratorio generando buenos resultados, sobre todo respecto a la pureza del ADN obtenido. La metodología se presenta a continuación:

LISIS CELULAR

1. Incubar solución de lisis a 30°C, 30 min a 250 rpm.
2. Adicionar al pellet celular 1 mL de solución de lisis y la punta de una espátula pequeña de lisozima. Agitar vigorosamente en vórtex.
3. Incubar a 37°C durante 30 min a 600 rpm en Termomixer (Eppendorf, Compact Thermomixer)

PURIFICACIÓN

4. Adicionar 10 µL de Proteinasa K (100 mg/mL). Agitar en vórtex (Scientific Industries, Vortex Mixer Genie 2).
5. Incubar a 65°C durante 30 min a 600 rpm en Termomixer.
6. Dejar enfriar un par de minutos a temperatura ambiente.
7. Centrifugar a 14,000 rpm (16,000 g) en la microcentrífuga (Eppendorf 5415 C) por 10 min.

8. Con ayuda de una micropipeta, tomar 900 μL de sobrenadante y transferir a un microtubo para centrífuga limpio de 2 mL.
9. Añadir 900 μL de cloroformo. Agitar vigorosamente en vórtex.
10. Centrifugar a 10,000 rpm (8,000 g) por 5 min.
11. Tomar 800 μL fase acuosa y transferir a un microtubo para centrífuga limpio de 2 mL.
12. Agregar búffer de unión en relación 1:1 con la fase acuosa.
13. Agitar vigorosamente en vórtex
14. Centrifugar a 10,000 rpm (8,000 g) en la microcentrífuga por 5 min.
15. Transferir 800 μL de sobrenadante a columna. Es importante procurar no tomar el pellet que se encuentre en fondo del tubo, en caso de que éste se haya formado.
16. Centrifugar a 10,000 rpm (8,000 g) en la microcentrífuga por 5 min y eliminar precipitado.
17. Repetir pasos 15 y 16, una vez más.
18. Lavar la columna con 700 μL de Búffer de lavado.
19. Centrifugar a 14,000 rpm (16,000 g) en la microcentrífuga por 1 min y eliminar los desechos que quedan en el contenedor de la columna.

CONCENTRACIÓN DE ADN

20. Adicionar 800 μL de EtOH al 75% v/v.
21. Centrifugar a 14,000 rpm (16,000g) por 1 min y eliminar los desechos que permanecen en el contenedor.
22. Repetir los pasos 20 y 21 dos veces más.
23. Centrifugar la columna a 14,000 rpm (16,000 g) por 1 min y eliminar desechos, con el objetivo de secarla.
24. Desechar contenedor y transferir columna a un microtubo limpio de 1.5 mL.
25. Adicionar 50 μL de Búffer de Elusión (1xTE), previamente calentado.
26. Incubar a 65°C por 10 min.
27. Centrifugar a 14,000 rpm (16,000 g) por 1 min.
28. Repetir los pasos 25, 26 y 27 una vez más.
29. Desechar la columna y evaluar la calidad del material genético obtenido.

Los resultados se evaluaron por medio de un gel de agarosa para analizar la integridad del ADN; mientras que la concentración y la relación 260/280 se midieron en el lector de placas Epoch TM, BIOTEK.

4.3.4. PCR Tiempo Real

En el diseño de cebadores y sondas para la técnica de PCR tiempo real se tomaron como referencia las secuencias de cebadores específicos para *L. acidophilus* y *L. paracasei*, publicados por Tabasco y col. (2007). Estos fueron usados en PCR en punto final, por lo que hubo que diseñar la sonda y hacer algunas modificaciones para ajustar a las temperaturas recomendadas para el equipo ABI7500 y para llevar a cabo la química de Taqman. Se hizo uso de herramientas de bioinformática como BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) del portal de NCBI y CLUSTAL W para el alineamiento de las secuencias (National Center for Biotechnology Information, 2011; European Bioinformatics Institute, 2011).

Con el fin de verificar *in silico* la especificidad de los cebadores reportados para los lactobacilos de interés, se analizaron las secuencias del ARN ribosomal 16s obtenidas del GenBank de *L. acidophilus* EU483105, *L. acidophilus* FJ557000, *L. acidophilus* GU344709, *L. acidophilus* GU454853.1, *L. acidophilus* AY773947 y *L. delbrueckii* sub. *bulgaricus* BCRC10696. También fueron alineadas las secuencias de *L. casei* GU233709, *L. casei* HM059013, *L. casei* HM107802, *L. casei* HM188412, *L. paracasei* AY773951 y *L. delbrueckii* sub. *bulgaricus* BCRC10696.

Posteriormente, se ajustaron parámetros como el tamaño de sondas y cebadores, la formación de dímeros y asas, Tm, %GC y contenido de G y C en el extremo 3' (Primer Express 3.0), para obtener los cebadores y sondas mostrados en las Tablas 4.4 y 4.5.

Tabla 4.4. Cebadores y sondas diseñadas para identificar a *Lactobacillus acidophilus*.

Genoma	<i>Lactobacillus acidophilus</i> strain BCRC10695	
Tipo	ARN ribosomal 16s	
Cebadores	Secuencia 5' - 3'	Amplicón bp
ACIDFOR	GAGCGAGCTGAACCAACAGAT	154
ACIDREV	GCTGATCATGCGATCTGCTTT	
LBACID	FAM -CTTCGGTGATGACGTTG- MGB	

Tabla 4.5. Cebadores y sondas diseñadas para identificar a *Lactobacillus casei*.

Genoma	<i>Lactobacillus paracasei</i> BCRC12193	
Tipo	ARN ribosomal 16s	
Cebadores	Secuencia 5' - 3'	Amplicón bp
CASFOR	GCACCGAGATTCAACATGGAA	151
CASREV	GCCATCTTTTCAGCCAAGAACC	
LBCAS	VIC-TTCTTGATCTATGCGGTATT-MGB	

Se realizó un estudio duplex de PCR en tiempo real (7500 Fast-Real Time PCR System de Applied Biosystems) con el propósito de analizar la especificidad de las sondas y cebadores diseñados, ya que al estar marcados con un fluoróforo diferente, se pueden analizar simultáneamente los dos microorganismos. Adicionalmente, se verificó que no hubiera contaminación de reactivos, al poner el control ó NTC (No template control).

Los sistemas dúplex se componen de dos sondas, marcadas con un fluoróforo distinto cada una, en este caso, la sonda marcada con el fluoróforo FAM indica la presencia de *L. acidophilus*, mientras que la sonda marcada con el fluoróforo VIC indica una correcta reacción de amplificación de ADN de *L. casei*.

Tabla 4.6. Componentes y concentraciones de la mezcla de reacción para PCR tiempo real (Ensayo dúplex).

Componente	Concentración de reactivos	Concentración de la reacción	µL por reacción
Master Mix	2 X	1 X	10 µL
Lbacid	5 µM	0.15 µM	0.6 µL
Lbcasei	5 µM		0.6 µL
Acidfor	10 µM	0.6 µM	1.2 µL
Acidrev	10 µM		1.2 µL
Casrev	10 µM		1.2 µL
Casfor	10 µM		1.2 µL
Agua			2 µL
ADN total			2 µL
Total			20 µL

La mezcla de reacción se elaboró agregando: Master Mix (TAQMAN® Universal PCR Master Mix, Applied Biosystems), cebadores para *L. acidophilus* y *L. casei* (Applied Biosystems), sonda Taqman para ambos probióticos (Applied Biosystems), agua y ADN (Tabla 4.6). La microplaca (96-Well Optical Reaction Plate with Barcode Applied Biosystems) se introdujo en el termociclador (7500 Fast-Real Time PCR System, Applied Biosystems) con las siguientes condiciones de reacción:

- 1) Primera desnaturalización del ADN a 95°C por 10 min.
- 2) Desnaturalización segunda 95°C por 15 s.
- 3) Alineamiento de cebadores, sondas y extensión de la polimerasa: 60°C/1 min.
- 4) Repetición de pasos 1 y 2 por 40 ciclos.

4.3.5. Construcción de curvas estándar

En PCR tiempo real, cuantificar es sinónimo de determinar el número de copias de un gen diana presente en una muestra. Para ello sólo es necesario utilizar una curva patrón obtenida mediante la amplificación de ADN de diluciones de una suspensión de microorganismos de concentración conocida (Microbial S.L., 2009).

Para el análisis de microorganismos probióticos en yogurt fue necesario construir una curva patrón para cada probiótico a partir del liofilizado y una curva para cada uno a partir de las bacterias inoculadas en el yogurt en el laboratorio, con la finalidad de verificar que no existiera interferencia en la amplificación debido a la matriz del alimento.

La construcción de las curvas estándar partiendo de liofilizado (Christian Hansen) se realizaron preparando un estándar de probióticos con una concentración de 10^9 UFC/mL, el cual fue diluido para generar los estándares 10^8 UFC/mL, 10^7 UFC/mL y 10^6 UFC/mL. A partir de 1 mL estas soluciones se llevó a cabo la extracción de ADN con el kit FastID®, por duplicado. Posteriormente se evaluó la concentración y calidad del material genético y finalmente se amplificó por medio de un ensayo dúplex de PCR tiempo real, sin duplicados. Con los resultados obtenidos, se realizó un gráfico de los valores de Ct obtenidos en el eje de las ordenadas y el Log de las UFC en el eje de las abscisas. La eficiencia de la reacción se calculó con la fórmula:

$$E = [10^{(-\frac{1}{Pendiente})} - 1] \times 100$$

Las curvas estándar de yogurt con probióticos se realizaron preparando yogurts naturales con una concentración de probióticos de 10^7 UFC/mL, 10^5 UFC/mL y 10^3 UFC/mL. Posteriormente se llevó a cabo la extracción de ADN incluyendo la etapa de aislamiento de las células y finalmente se realizó la amplificación por medio de PCR tiempo real. Sin embargo, el aislamiento de las células a partir del yogurt no se completó exitosamente.

4.4. Evaluación de la viabilidad de probióticos durante la vida de anaquel de un yogurt funcional.

Se prepararon 2 lotes de 2 litros de yogurt natural (Lote A y Lote B) de acuerdo a la metodología descrita en la Figura 1.2 (Capítulo I). A partir de cada lote se prepararon 400 g de cada formulación de yogurt, a las cuales se inocularon con el liofilizado *L. casei* y de *L. acidophilus* disueltos en agua peptonada estéril, para obtener un yogurt simbiótico con una concentración de probióticos de 10^7 UFC/mL. Posteriormente, cada yogurt fue distribuido en recipientes de plástico transparente con aproximadamente 25 g (Tabla 4.7). Finalmente, los recipientes se etiquetaron de la siguiente manera y se almacenaron en refrigeración a 4°C:

Formulación del yogurt
Fecha
No. de muestra

Tabla 4.7. Distribución de muestras de yogurt para evaluar la viabilidad de probióticos.

	Natural	Endulzado	Mango	Frutos del Bosque
Lote A	Muestra 1	Muestra 1	Muestra 1	Muestra 1
	Muestra 2	Muestra 2	Muestra 2	Muestra 2
Lote B	Muestra 1	Muestra 1	Muestra 1	Muestra 1
	Muestra 2	Muestra 2	Muestra 2	Muestra 2

Las Muestras 1 y 2 se emplearon para los análisis fisicoquímicos. Para los ensayos microbiológicos se usaron las Muestras 1 y se analizaron por duplicado.

Durante 50 días, se evaluó semanalmente la viabilidad de las bacterias probióticas *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus casei* presentes en los cuatro tipos de yogurt simbiótico desarrollados en el laboratorio. El análisis microbiológico se llevó a cabo por medio de la técnica de cuenta en placa utilizando las condiciones y medios de cultivo presentados en la Tabla 4.8.

Tabla 4.8. Medio de cultivo y condiciones de incubación para la cuantificación de los microorganismos probióticos en las 4 formulaciones de yogurt.

		<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Lactobacillus casei</i>
Medio de cultivo		MRS	MRS
Condiciones de incubación	Tiempo	72 h	48 h
	Temperatura	37°C	30°C
	O ₂	Anaerobiosis	Aerobiosis

Para complementar el análisis, se evaluaron los parámetros fisicoquímicos de pH y acidez del yogurt, siguiendo la metodología establecida por la NOM-185-SSA1-2002 (Dirección General de Normas, 2011). Estos procedimientos se describen en el Anexo D.

Capítulo V

Análisis de resultados y discusión

5.1. Métodos tradicionales

La selectividad de los medios de cultivo y condiciones descritas por García-Cayuela y col. (2009), se verificaron por medio de una cuenta en placa de los probióticos separados y mezclados, los resultados de dichas pruebas se presentan en la Tabla 5.1 y Tabla 5.2. En la evaluación del crecimiento de los microorganismos por separado, se observó que *L. casei* crece sin problemas en ausencia de oxígeno y a una temperatura de 37°C, este comportamiento era de esperarse ya que *L. casei* es un microorganismo facultativo que crece en rangos amplios de pH y acidez (Isolauri, 1991). Por su parte, *L. acidophilus* se multiplicó sin dificultad en presencia de oxígeno y en el medio MRS enriquecido; no obstante, su desarrollo se vio perjudicado a los 30°C y en el medio MRS normal, razón por la cual no se encontró crecimiento en las condiciones ideales de *L. casei* o C1.

Tabla 5.1. Resultados de cuenta en placa en diferentes condiciones, para distinguir *L. acidophilus* de *L. casei* por separado.

Microorganismo	Medio	Condiciones de incubación	Resultado (UFC/g)	Clave
<i>Lactobacillus casei</i>	MRS normal	30°C / 48h Aerobiosis	21x10 ⁹	C1
	MRS normal	30°C / 48h Anaerobiosis	24x10 ⁹	C2
	MRS enriquecido	37°C / 48h Anaerobiosis	23x10 ⁹	C3
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	MRS enriquecido	37°C / 72h Anaerobiosis	79x10 ⁸	A1
	MRS enriquecido	37°C / 72h Aerobiosis	66x10 ⁸	A2
	MRS normal	30°C / 72h Aerobiosis	< 10 ⁶	A3

Tabla 5.2. Resultados de cuenta en placa en diferentes condiciones, para distinguir *L. acidophilus* de *L. casei* mezclados.

Microorganismo	Medio	Condiciones de incubación	Resultado (UFC/mL)	Clave
Mezcla	MRS normal	37°C / 72h	15x10 ⁸	M1
	MRS enriquecido	Anaerobiosis	17x10 ⁸	M2
	MRS normal	30°C / 72h	12x10 ⁸	M3
	MRS enriquecido	Aerobiosis	11x10 ⁸	M4

Con los resultados de la mezcla de probióticos se corroboró lo anteriormente mencionado; sin embargo, antes se debe recordar que la cuenta en placa de la mezcla se realizó preparando un stock que contenía 2 mL de cada una de las suspensiones de *L. casei* y *L. acidophilus*. La concentración inicial de probióticos en la mezcla (0.5 g de liofilizado en 5 mL de agua peptonada) fue entonces:

$$L. casei: 21 \times 10^9 \frac{\text{UFC}^*}{\text{g}} \times \frac{0.5 \text{ g}}{5 \text{ mL}} \times 2 \text{ mL} \times = \frac{42 \times 10^8 \text{ UFC}}{4 \text{ mL}} = 11 \times 10^8 \frac{\text{UFC}}{\text{mL}}$$

$$L. acidophilus: 79 \times 10^8 \frac{\text{UFC}^*}{\text{g}} \times \frac{0.5 \text{ g}}{5 \text{ mL}} \times 2 \text{ mL} = \frac{16 \times 10^8 \text{ UFC}}{4 \text{ mL}} = 40 \times 10^7 \frac{\text{UFC}}{\text{mL}}$$

*Valor determinado experimentalmente (Tabla 5.1)

La concentración teórica de *L. casei* fue muy similar a la obtenida por cuenta en placa en las condiciones M3 (12x10⁸ UFC/g), mientras que la cuenta obtenida en las condiciones M1 es igual a la suma de la concentración teórica de *L. casei* y *L. acidophilus*: 11x10⁸ UFC/mL + 40x10⁷ UFC/mL = 15x10⁸UFC/mL.

Considerando estas evidencias, se puede afirmar que las condiciones de crecimiento de *L. casei* son selectivas, mientras que condiciones de *L. acidophilus* permiten el desarrollo de ambos microorganismos, es por eso que para hacer una cuantificación diferencial de ellos a lo largo de la vida de anaquel de yogurt se propuso el uso de la fórmula:

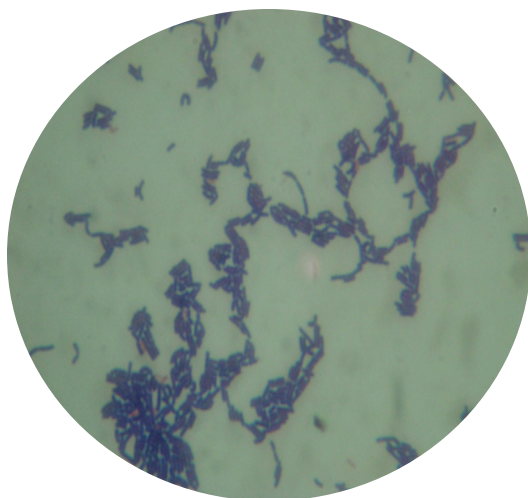
$$L. acidophilus = (\text{MRS } 37^\circ\text{C}, 72 \text{ h anaerobiosis}) - [\text{MRS } 30^\circ\text{C}, 48 \text{ h aerobiosis } (L. casei)]$$

Esta fórmula permitió conocer la concentración de *L. acidophilus* únicamente restando las UFC contadas en el medio selectivo de *L. casei* (en adelante medio C1) a las UFC numeradas en el medio incubado a 37°C / 72h anaerobiosis (en adelante medio M1).

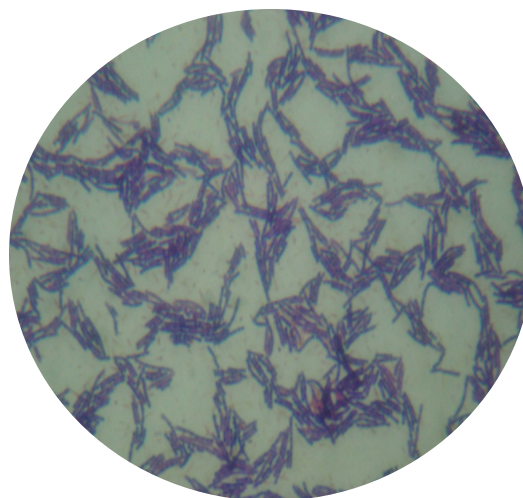
Para verificar que las colonias desarrolladas correspondieran a los microorganismos probióticos cultivados se realizó una tinción de Gram (Figura 5.1) de las colonias desarrolladas en las condiciones C1 y A1, estas observaciones se exponen en la Tabla 5.3 y con ellas se comprueba el crecimiento de lactobacilos Gram-positivos.

Tabla 5.3. Morfologías coloniales en las diferentes condiciones de incubación.

	Colonia		Morfología
<i>Lactobacillus casei</i> Medio: C1	Forma: Borde: Elevación: Color:	Puntiforme Redondeado Plano Blanco	Bacilo corto y ancho Gram-positivo
<i>Lactobacillus acidophilus</i> Medio: A1	Forma: Borde: Elevación: Color:	Circular Redondeado Plano-convexa Blanco	Bacilo largo Gram-positivo



A



B

Figura 5.1. Morfología microscópica (A) *Lactobacillus casei* y (B) *Lactobacillus acidophilus*.

Una vez elegidas las condiciones y medios de cultivo ideales para cultivar a los probióticos, se realizó una prueba a fin de evaluar su factibilidad de cuantificar dichas bacterias inoculadas en el yogurt desarrollado en el laboratorio. Para ello se realizó una cuenta en placa con dichos medios y condiciones de cultivo. Se utilizó yogurt con probióticos (con una concentración de 10^7 UFC/mL) y otro sin probióticos (sólo con los cultivos iniciadores). De acuerdo a los resultados de dichos ensayos (Tabla 5.4), se observa que los microorganismos iniciadores fueron capaces de desarrollarse en el medio de cultivo M1, pero no, en el medio de cultivo de *L. casei* o C1.

Tabla 5.4. Resultados de pruebas de selectividad de medios de cultivo de probióticos en yogurt.

	Medio de cultivo	Microorganismo esperado	Concentración (UFC/ mL)
Yogurt sin probióticos	M1	Iniciadores	11×10^5 UFC/mL
	C1	Iniciadores	< 10 UFC/mL valor estimado
Yogurt con probióticos	M1	Probióticos	25×10^6 UFC/mL
	C1	<i>L. casei</i>	18×10^6 UFC/mL

C1= medio específico para *L. casei*; M1= medio para contar ambas bacterias probióticas

Tabla 5.5. Selectividad de los medios de cultivo probados.

Medio de cultivo	Microorganismo			Condiciones	Referencia
	I	A	C		
M1	+	+	+	MRS 37°/72 h Anaerobiosis	(García et al., 2009),
C1	-	-	+	MRS 30°/48 h Aerobiosis	(García et al., 2009),

El signo positivo (+) indica que el microorganismo crece en el medio de cultivo señalado, el negativo indica que no hay crecimiento del microorganismo en el medio de cultivo (-). I = Microorganismos iniciadores (*L. delbruekii* ssp. *bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*).

Un análisis general de los resultados obtenidos en este ensayo y en las pruebas anteriores es presentado en la Tabla 5.5, con la cual se puede asegurar que el medio y las condiciones de cultivo C1 son completamente selectivos, ya que únicamente se desarrolla el microorganismo para el que está diseñado.

El medio M1 permite el crecimiento de los iniciadores, de *L. casei* y *L. acidophilus* por lo que no es selectivo. No obstante, es importante señalar que de acuerdo a resultados obtenidos en el laboratorio (Mancilla, 2011) la concentración de iniciadores al finalizar la fermentación del yogurt es de 10^{11} UFC/mL, mientras que el resultado obtenido por cuenta en placa en el medio de cultivo de M1 fue de 11×10^5 UFC/mL. Este resultado sugiere que el desarrollo de los microorganismos iniciadores no es el óptimo al utilizar estas condiciones de incubación, esto significa que al cultivar en conjunto los microorganismos iniciadores con los probióticos en el medio M1, el crecimiento de los iniciadores no afectará en la cuenta, ya que su concentración tendrá un orden de magnitud menor a comparación de la cuenta correspondiente de probióticos.

De acuerdo a lo anterior y a los resultados de la Tabla 5.4, la cantidad de *L. casei* en el yogurt fue de 18×10^6 UFC/mL, la de cultivos iniciadores fue de 11×10^5 UFC/mL y la *L. acidophilus* (obtenida por diferencia) fue de 59×10^5 UFC/mL.

Al comparar estos resultados experimentales con el cálculo teórico que considera la cantidad de probióticos liofilizados que se agregaron al yogurt y el número de unidades formadoras de colonia por gramo de liofilizado, tenemos que son similares. Los valores teóricos son: 11×10^6 UFC/mL y 40×10^5 UFC/mL, para *L. casei* y *L. acidophilus*, respectivamente.

Resumiendo, en este apartado se evaluó la selectividad de los medios de cultivo reportados por García-Cayela y col. (2009), para la cuantificación diferencial de los microorganismos probióticos *L. casei* y *L. acidophilus* en yogurt. Por medio de los resultados obtenidos en dicho análisis se eligieron las siguientes condiciones de cultivo:

- Incubar a 37°C anaerobiosis MRS normal durante 72h para obtener la cuenta de ambos microorganismos.

- Incubar a 30°C aerobiosis MRS normal por 48h para obtener la cuenta de *L. casei*.
- La concentración de *L. acidophilus* se obtiene restando las colonias obtenidas a 30°C aerobiosis, a las UFC enumeradas a 37°C anaerobiosis.

5.2. Métodos moleculares

En vista de la dificultad para diferenciar entre las bacterias iniciadores y las probióticas presentes en el yogurt desarrollado en el laboratorio, por medio de los medios de cultivo, se decidió emplear como metodología alternativa la técnica de PCR tiempo real, la cual se distingue por su sensibilidad y especificidad. No obstante, fue necesario estandarizar por separado cada una de las etapas previas a la aplicación de esta metodología, es decir, extracción de ADN, discriminación de bacterias no viables, diseño de cebadores y sondas, etc.

5.2.1. Tratamiento para recuperar las células del yogurt

Para extraer ADN a partir yogurt se debe considerar una etapa previa en la que se recuperen las células que se encuentran suspendidas dentro de la matriz del alimento. Se utilizó un yogurt comercial inoculado con 10^7 UFC/mL de probióticos y se llevaron a cabo 5 diferentes metodologías de recuperación. Posteriormente se realizó la extracción de ADN de las células recuperadas con el kit FastID. Los resultados obtenidos a través de las cinco técnicas se compararon con un control, el cual se elaboró haciendo una extracción de ADN a partir de 0.5 mL del stock de probióticos.

El mejor método de recuperación celular se eligió considerando los siguientes aspectos: la pureza del material genético obtenido, el rendimiento de la extracción, la complejidad de la metodología y el coeficiente de variación entre réplicas experimentales (Tabla 5.6).

El rendimiento se calculó considerando que por cada miligramo de liofilizado de probióticos presente en la muestra de yogurt, teóricamente se obtendrían

aproximadamente 2.07 ng/μL, este valor se determinó por medio de la extracción de ADN del stock de probióticos. La cantidad de ADN teórica obtenida por medio de esta relación se comparó con los resultados experimentales. En la mayoría de los casos, se observa que el rendimiento supera el 100%, lo cual era de esperarse ya que el control se preparó únicamente con microorganismos probióticos y la recuperación de las células a partir de yogurt implica la recuperación tanto de bacterias probióticas como de las iniciadoras.

Tabla 5.6. Resultados en las distintas metodologías para la recuperación de células.

	Cantidad de liofilizado (mg)	Promedio (ng/μL) y desviación estándar	Coefficiente de variación	A260/A280	Rendimiento (%)
Protocolo I	15	4.33 (1.1)	25.61	2.20	14
Protocolo II	1.5	15.32 (2.4)	15.52	2.16	494
Protocolo III	15	4.77 (2.8)	58.94	2.21	15
Protocolo IV	15	64.48 (28.3)	43.87	2.03	209
Protocolo V	7.5	99.41 (8.2)	8.27	1.97	641

Los Protocolos I y III fueron descartados debido a que los resultados presentaron problemas de bajo rendimiento y elevado coeficiente de variación.

El Protocolo II, es muy sencillo de realizar, se obtiene un rendimiento alto y el coeficiente de variación es de los más bajos. Sin embargo, después de la primera centrifugación durante la extracción de ADN, se formó un sobrenadante blanco, lo que demuestra que el pellet celular no se encontraba completamente aislado de la matriz del alimento. Se consideró que este punto podría complicar la metodología al momento de adicionar el PMA, por lo cual fue descartada.

Por otro lado, con Protocolo V se obtuvo el material genético más puro y el coeficiente de variación más bajo, sin embargo, no se seleccionó debido a que el procedimiento es muy laborioso.

Se eligió como mejor metodología el Protocolo IV, ya que es sencilla de aplicar, el pellet celular se aísla adecuadamente del yogurt, se obtiene un rendimiento aceptable y el material genético extraído no presenta contaminantes. La única desventaja de esta metodología fue el alto coeficiente de variación, sin embargo, se atribuye a errores experimentales que se pueden atenuar con la práctica.

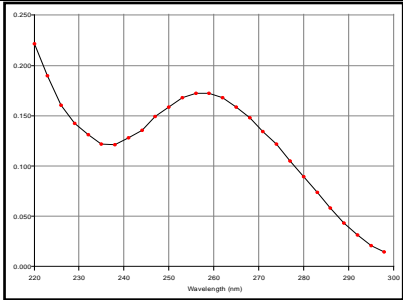
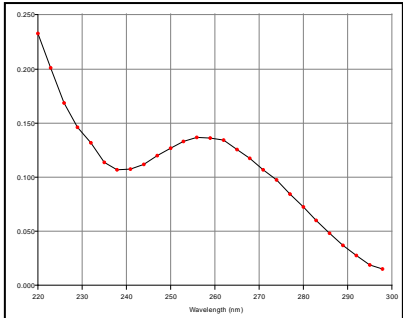
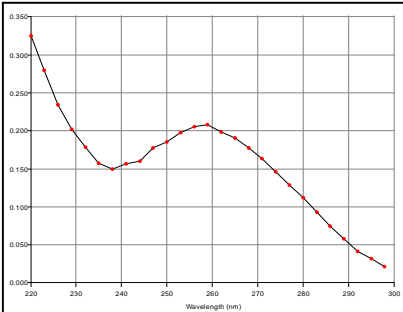
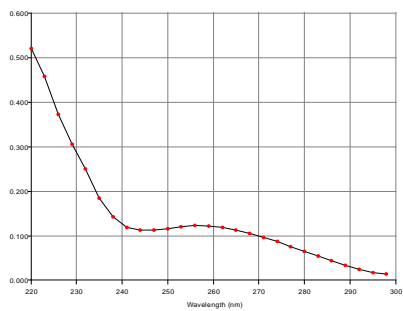
5.2.2. Evaluación de eficiencia del reactivo PMA

Una de las desventajas de la técnica de PCR tiempo real es que se basa en la amplificación de secuencias específicas de ADN extraído de una muestra, lo cual no permite distinguir si este material genético proviene de células viables o no viables. En los últimos 5 años se ha reportado el empleo del reactivo PMA como una alternativa para discriminar el material genético de las células no viables antes de realizar un análisis por PCR tiempo real. Paralelamente, a la construcción de las curvas estándar, para verificar la eficiencia del PMA se realizó un ensayo en el cual se amplificó por PCR tiempo real el material genético de 10^9 UFC de *Lactobacillus casei* expuestas a diferentes temperaturas durante 15 min (70°C, 60°C, 50°C y sin calentamiento). La reducción de señal en las curvas de amplificación de PCR tiempo real, se comparó con los resultados de cuenta en placa de este cada tratamiento térmico.

En estudios anteriores se ha proporcionado evidencia del daño a las membranas celulares bacterianas producido por el calor (Hurst et al., 1974; Rusell et al., 1967) ya que este tratamiento influye en la desintegración de la estructura de la membrana y en la pérdida de permeabilidad, lo cual induce a la fuga de sustancias intracelulares y a la pérdida de lipopolisacáridos (Hitchener et al., 1977; Tsuchido et al., 1985).

Los datos presentados en la Tabla 5.7 demuestran que se obtuvo un material genético puro, ya que la relación A260/A280 se encuentra dentro del rango de 1.8 a 2.0. Por otro lado, los gráficos presentan el máximo punto de absorbancia en 260nm y no se observaron otros picos que indiquen la presencia de algún contaminante.

Tabla 5.7. Resultados de la Cuantificación/Calidad ADN obtenida después del tratamiento con PMA.

Tratamiento térmico	Concentración ADN (ng/μL)	Relación A260/A280	Gráficos: Lectura de absorbancia de 230 a 280nm
Sin tratamiento	195.90	1.96	
50°C	173.89	1.98	
60°C	128.29	1.99	
70°C	130.74	1.97	

En los resultados de disminución de la viabilidad de *L. casei* evaluada por cuenta en placa (Figura 5.2) se observan los efectos anteriormente mencionados ya que al exponer las células a 70°C, ocurrió una disminución en la viabilidad

aproximadamente de 2 órdenes de magnitud, a 60°C la reducción fue menor a un orden de magnitud, mientras que a 50°C el microorganismo probiótico se mantuvo sobre el mismo orden de magnitud.

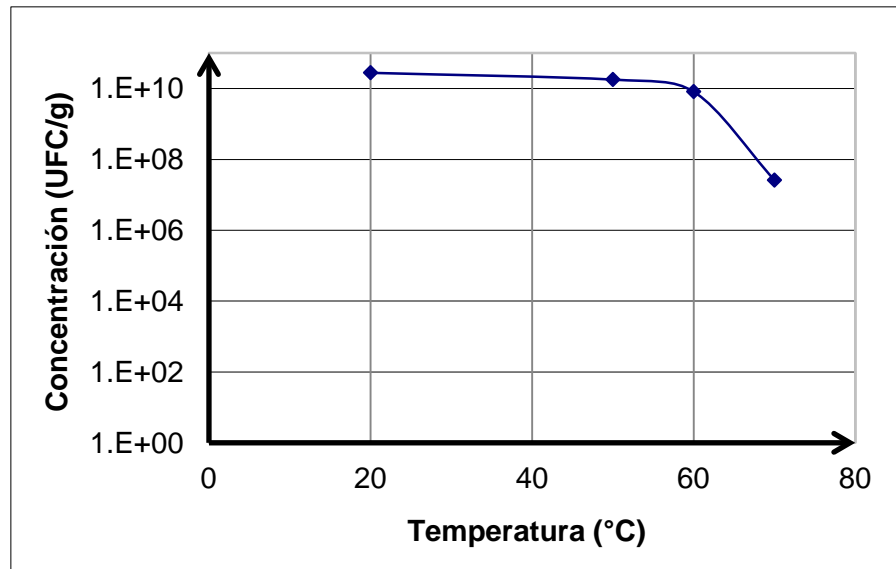


Figura 5.2. Pérdida de viabilidad por exposición de *L. casei* a diferentes temperaturas por 15 min, evaluada por cuenta en placa.

En la evaluación de la pérdida de viabilidad por PCR tiempo real empleando PMA, se observó una buena correlación entre la pérdida de viabilidad y reducción de señal (Figura 5.4). El cambio más dramático se produjo en el rango de temperatura entre 60 °C y 70 °C, mientras que las tasas de muerte no fueron significativas a 50 °C. La elevación de la temperatura de 50 °C a 60 °C resultó en la reducción de 6 ciclos, mientras que la reducción de la señal entre las muestras sin tratamiento y 50°C fue únicamente de 2 ciclos. La disminución de la viabilidad también se reflejó en la disminución de la concentración de ADN (Tabla 5.7) y en valores cada vez mayores de Ct para las muestras con menor cantidad de ADN (Figura 5.3). Esto concuerda con lo esperado, ya que el principio de acción del PMA es favorecer la pérdida de material genético de las células muertas dejando intactas a las células viables.

Al comparar los resultados cualitativos de PCR tiempo real, con los obtenidos por medio de cuenta en placa, no se encontró una correlación ya que la mayor diferencia en reducción de señal ocurrió entre 50°C y 60°C, y se esperaba que esta diferencia

se encontrara entre 60°C y 70°C. Sin embargo, para comprobar esta falta de correlación, es necesario que el análisis por medio de PCR tiempo real sea cuantitativo, es decir, interpolando los resultados con curvas estándar.

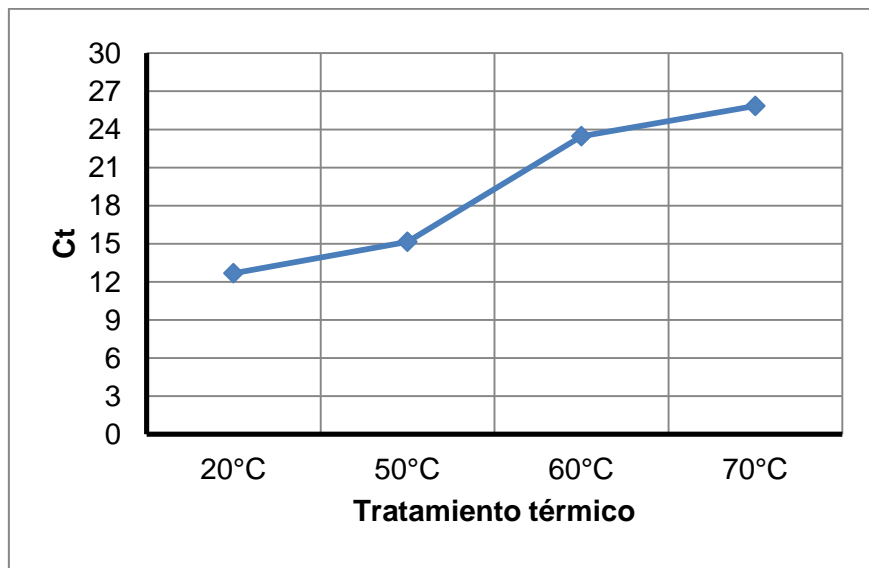


Figura 5.3. Modificación de Ct como consecuencia del tratamiento térmico aplicado a células de *L. casei*.

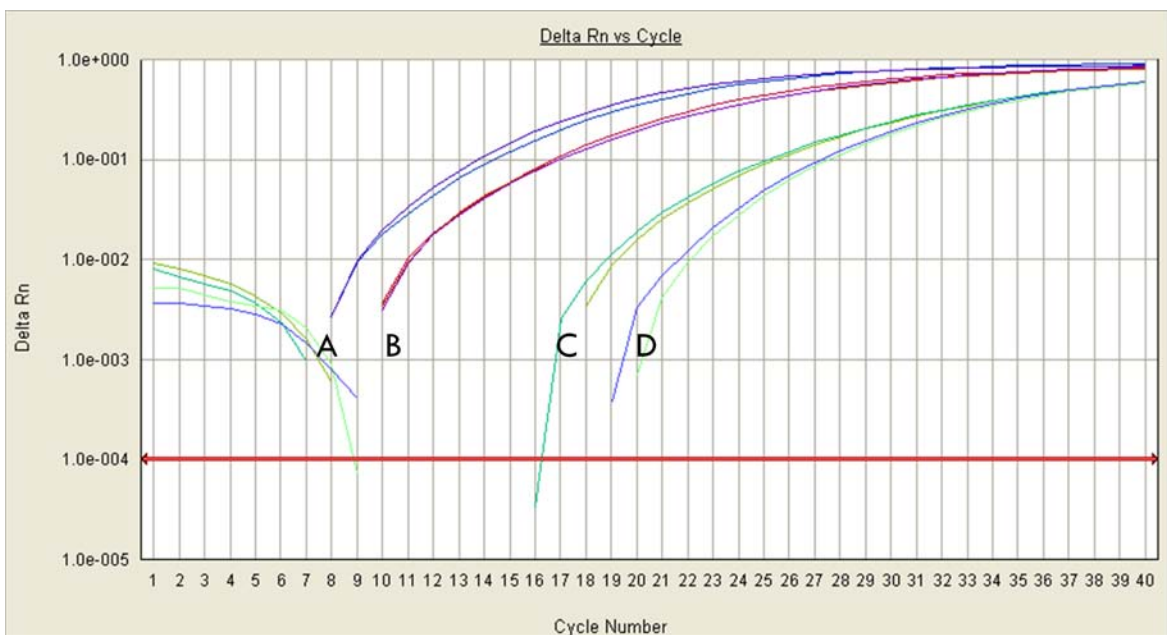


Figura 5.4. Curvas de amplificación de PCR tiempo real. (A) Células sin tratamiento térmico, (B) células tratadas a 50°C, (C) células tratadas a 60°C, (D) células tratadas a 70°C.

5.2.3. Extracción de ADN con kit FastID

Existe una influencia fundamental de la técnica de extracción y propiedades de la matriz de la muestra sobre los resultados de la cuantificación por PCR tiempo real, ya que el material genético obtenido debe presentar como principales características: alto rendimiento de extracción y pureza, e integridad. Con el objetivo de verificar la eficiencia del sistema de extracción de ADN se realizaron extracciones de los cultivos liofilizados con los que se contaba en el laboratorio haciendo uso del kit FastID®.

La calidad del material genético obtenido a partir de los cultivos liofilizados se evaluó analizando su pureza, integridad y concentración. La concentración y el índice de pureza se midieron a 260/280 nm (Tabla 5.8); mientras que la visualización del ADN total en un gel de agarosa permitió comprobar la integridad del material genético, esto es observando una banda intensa y bien definida sin el barrido característico de la degradación (Figura 5.5).



Figura 5.5. ADN total extraído de cultivos liofilizados: *Lactobacillus rhamnosus* I (R), *Lactobacillus casei* (C), *Bacillus subtilis* (S), *Bifidobacterium* (B), *Lactobacillus rhamnosus* II (O). Gel de agarosa al 1% (p/v) con 1µg/mL de BrEt. Vol. de carga: 5 µL de ADN total y 1 µL 6X Orange. Marcador Mas Ruler de bajo rango de Fermentas.

El método de extracción con el kit FastID®, resultó ser eficiente para extraer ADN de calidad, ya que se obtuvo un ADN íntegro en todos los casos, además, las muestras presentaron una relación A260/280 dentro del rango 1.9-2.0, lo cual, es un indicador de alta pureza. Por otro lado, los rendimientos alcanzados en general fueron elevados, excepto en el caso de *Bacillus subtilis*, lo cual se puede atribuir a dos factores: (a) durante el experimento se pesó la misma cantidad de cultivo liofilizado de todos los microorganismos (200 ± 8 mg), sin considerar la posibilidad de que hubiera una menor cantidad de UFC/g en el cultivo liofilizado de *B. subtilis* (no se realizó la cuenta en placa) ó (b) la lisis celular no fue eficiente.

Tabla 5.8. Concentración y relación de absorbancias 260/280 obtenidas del ADN de cultivos liofilizados, extraído usando el kit FastID®.

Muestra	Concentración (ng/ μ L)	Relación 260/280
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> I	133.37	1.93
<i>Lactobacillus casei</i>	83.69	1.98
<i>Bacillus subtilis</i>	42.01	2.01
<i>Bifidobacterium</i>	112.57	1.96
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> II	146.85	1.93

5.2.4. PCR Tiempo Real

En el diseño de cebadores y sondas para la técnica de PCR tiempo real se tomaron como referencia las secuencias de cebadores específicos para *L. acidophilus* y *L. paracasei*, publicados por Tabasco y col. (2007). Consecutivamente, se ajustaron parámetros como el Tm, tamaño de secuencia, %GC y contenido de G y C en el extremo 3', para así obtener los cebadores y sondas presentadas en las Tablas 5.9 y 5.10.

Tabla 5.9. Cebadores y sondas diseñadas para identificar a *Lactobacillus acidophilus*.

Genoma	<i>Lactobacillus acidophilus</i> strain BCRC10695					
Tipo	ARN ribosomal 16s					
Tamaño	1479 pb					
1	tcttggctca	ggacgaacgc	tggcggcgtg	cctaatacat	gcaagtc	GAG CGAGCTGAAC
61	CAACAGAT	tc	ACTTCGGTGA	TGACGTTG	gg	aacgcgagcg
121	tggggaaacct	gccccatagt	ctgggataacc	acttggaaac	aggtgctaata	accggataag
181	AAAGCAGATC	GCATGATCAG	C	ttataaaaag	gcggcgtaag	ctgtcgctat
241	cgcggtgcat	tagctagt	gtaggtaac	ggcctacca	ggcaatgatg	catagccgag
301	ttgagagact	gatcggccac	attgggactg	agacacggcc	caaactccta	cgggaggcag
361	cagtagggaa	tcttccacaa	tggacgaaag	tctgatggag	caacgcccg	tgagtgaaga
421	aggttttcgg	atcgtaaagc	tctgtgtgtg	gtgaagaagg	atagaggtag	taactggcct
481	ttatttgacg	gtaatcaacc	agaaagtac	ggctaactac	gtgccagcag	ccgcggtaat
541	acgtaggtgg	caagcgttgt	ccggatttat	tggcgtaaa	gcgagcgcag	gcggaagaat
601	aagtctgatg	tgaaagccct	cggttaacc	gaggaactgc	atcggaaact	gtttttcttg
661	agtgcagaag	aggagagtgg	aactccatgt	gtagcgtg	aatgcgtaga	tatatggaag
721	aacaccagtg	gcgaagcgg	ctctctggtc	tgcaactgac	gctgaggctc	gaaagcatgg
781	gtagcgaaca	ggattagata	ccctggtagt	ccatgccgta	aacgatgagt	gctaagtgtt
841	gggaggtttc	cgctctcag	tgctgcagct	aacgcattaa	gcactccgcc	tggggagtac
901	gaccgcaagg	ttgaaactca	aaggaattga	cgggggccc	cacaagcgg	ggagcatgtg
961	gtttaattcg	aagcaacgcg	aagaacctta	ccaggtcttg	acatctagt	caatccgtag
1021	agatacggag	ttcccttcgg	ggacactaag	acaggtggg	catggctgtc	gtcagctcgt
1081	gtcgtgagat	gttgggttaa	gtcccgaac	gagcgaacc	cttgtcatta	gttgccagca
1141	ttaagttggg	cactctaata	agactgccg	tgacaaacc	gaggaagg	gggatgacgt
1201	caagtcatca	tgccccttat	gacctgggct	acacacgtgc	tacaatggac	agtacaacga
1261	ggagcaagcc	tgcaaggca	agcgaatctc	ttaaagctgt	tctcagttcg	gactgcagtc
1321	tgcaactcga	ctgcacgaag	ctggaatcgc	tagtaatcgc	ggatcagcac	gccgcgggta
1381	atacgttccc	gggccttgta	cacaccgcc	gtcacaccat	gggagtctgc	aatgccccaa
1441	gccggtggcc	taaccttcgg	gaaggagccg	tctaaggc		
Cebadores	Secuencia 5' - 3'					Amplicón bp
ACIDFOR	GAGCGAGCTGAACCAACAGAT					154
ACIDREV	GCTGATCATGCGATCTGCTTT					
LBACID	FAM-CTTCGGTGATGACGTTG-MGB					

La detección de microorganismos probióticos por PCR tiempo real se realizó mediante un ensayo dúplex. El resultado típico del análisis de una muestra por PCR tiempo real con un sistema de detección de con 2 fluoróforos ó dúplex, es un gráfico de amplificación en el que se observan dos tipos de curvas: unas para el FAM (*L. acidophilus*) y otras para VIC (*L. casei*). En la Figura 5.6 se observa ausencia de amplificación en el NTC. Por otro lado, las Figuras 5.7 y 5.8 muestran la amplificación obtenida cuando se probó el juego de cebadores-sonda para *L. casei* y *L. acidophilus*, contra sus respectivos ADNs. Se observa que la señal producida se generó únicamente por la sonda correspondiente a la especie presente. Las curvas 4 a 6 de las Figuras 3.4 y 3.5 son típicas de señal negativa, por lo que se concluye que no hay señal del fluoróforo que marca a la sonda de la otra especie, con lo que se comprueba la especificidad del diseño.

Tabla 5.10. Cebadores y sondas diseñadas para identificar a *Lactobacillus casei*.

Genoma	<i>Lactobacillus paracasei</i> BCRC12193	
Tipo	ARN ribosomal 16s	
Tamaño	1479 pb	
	<pre> 1 agagtttgat cctggctcag gatgaacgct ggcggcgtgc ctaatacatg caagtccaac 61 gagttctcgt tgatgatcgg tgcttGCACC GAGATTCAAC ATGGAAcgag tggcggacgg 121 gtgagtaaca cgtgggtaac ctgcccctaa gtgggggata acatttggaa acagatgctA 181 ATACCGCATA GATCCAAGAA ccgcatGGTT CTTGGCTGAA AGATGGcgta agctatcgct 241 tttggatgga cccgcggcgt attagctagt tggtaggta atggctcacc aaggcgatga 301 tacgtagccg aactgagagg ttgatcggcc acattgggac tgagacacgg ccaaaactac 361 tacgggagcg agcagtaggg aatctccac aatggacgca agtctgatgg agcaacgccg 421 cgtgagtga gaaggctttc gggctgtaa actctgttgt tggagaagaa tggcggcag 481 agtaactgtt gtcggcgtga cggatccaa ccagaaagcc acggctaact acgtgccagc 541 agccgcggta atacgtaggt ggcaagcgtt atccggattt attgggcgta aagcgagcgc 601 aggcgggttt ttaagtctga tgtgaaagcc ctcggcttaa ccgaggaagc gcatcggaaa 661 gtgggaaact tgagtgcaga agaggacagt ggaactccat gtgtagcggg gaaatgcgta 721 gatataatgga agaacaccag tggcgaaggc ggctgtctgg tctgtaactg acgctgaggc 781 tcgaaagcat gggtagcgaa caggattaga tacctggta gtccatgccg taaacgatga 841 atgctaggtg ttggagggtt tccgccctc agtgccgcag ctaacgcatt aagcattccg 901 cctggggagt acgaccgcaa ggttgaact caaaggaatt gacgggggcc cgcacaagcg 961 gtggagcatg tggtttaatt cgaagcaacg cgaagaacct taccaggctc tgacatcttt 1021 tgatcacctg agagatcagg tttcccctc gggggcaaaa tgacaggtgg tgcattggtg 1081 tcgtcagctc gtgtcgtgag atgttgggtt aagtcccgca acgagcgcaa ccctatgac 1141 tagttgccag catttagttg ggcactctag taagactgcc ggtgacaaac cggaggaagg 1201 tggggatgac gtcaaatcat catgccctt atgacctggg ctacacacgt gctacaatgg 1261 atggtacaac gagttgagc accgcgaggt caagctaate tcttaaagcc attctcagtt 1321 cggactgtag gctgcaactc gcctacacga agtcggaate gctagtaate gcggatcagc 1381 acgccgcggt gaatacgttc ccgggccttg tacacaccgc ccgtcacacc atgagagttt 1441 gtaacaccgg aagccggtgg cgtaaccctt taggagcgag ccgtct </pre>	
Cebadores	Secuencia 5' - 3'	Amplícón bp
CASFOR	GCACCGAGATTCAACATGGAA	151
CASREV	GCCATCTTTCAGCCAAGAACC	
LBCAS	VIC-TTCTTGGATCTATGCGGTATT-MGB	

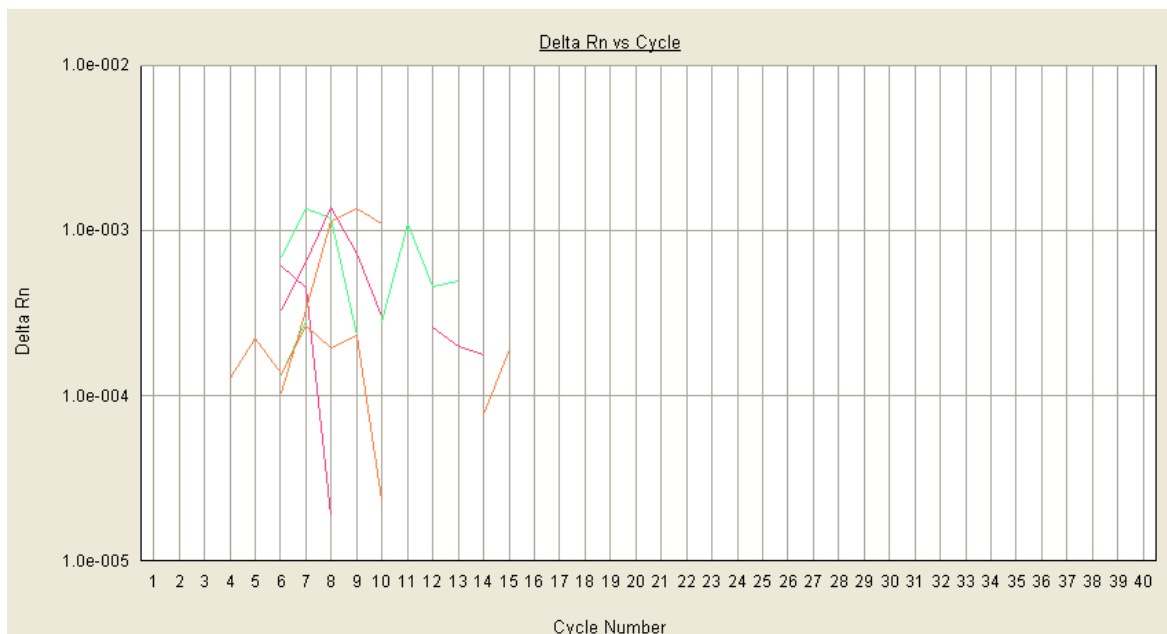


Figura 5.6. Curvas de amplificación de NTC. No se observa contaminación.

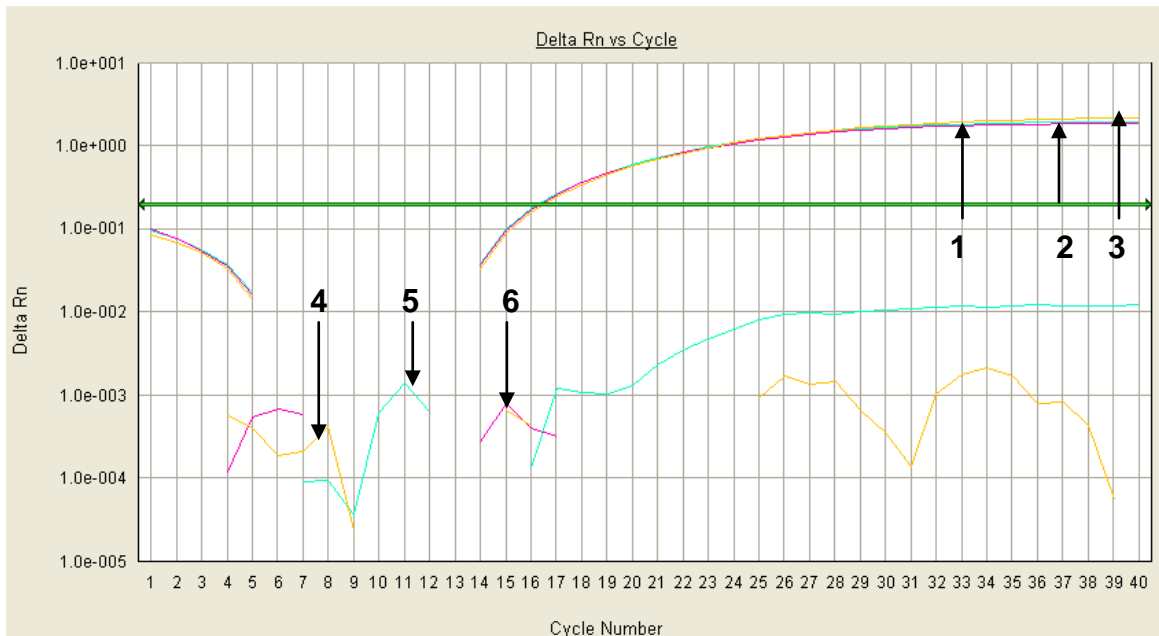


Figura 5.7. Curva de amplificación del ADN de *L. casei*, (curvas 1 a 3). Las curvas 4 a 6 corresponden a la señal FAM, de la sonda para *L. acidophilus*.

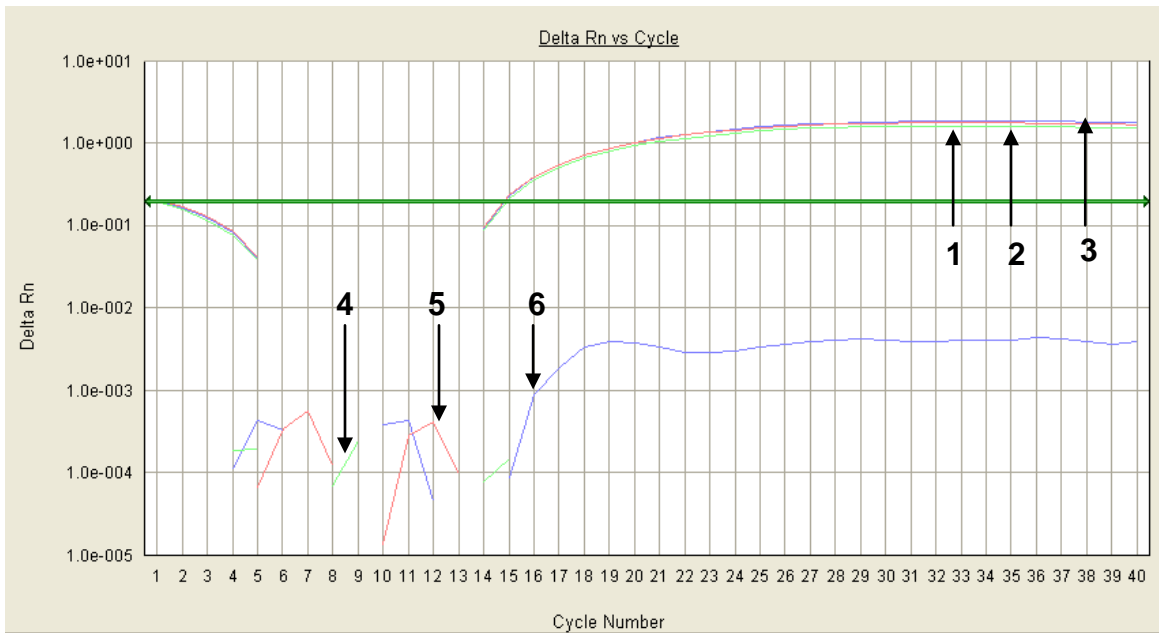


Figura 5.8. Curva de amplificación del ADN de *L. acidophilus*, (curvas 1 a 3). Las curvas 4 a 6 corresponden a la señal VIC, de la sonda para *L. casei*.

5.2.5. Construcción de curvas estándar

Para interpolar los resultados obtenidos por medio de PCR tiempo real, se construyó una curva patrón para cada probiótico a partir del liofilizado y una curva para cada uno a partir de bacterias inoculadas en el yogurt desarrollado en el laboratorio.

La curva estándar elaborada a partir de liofilizado de *L. acidophilus* Figura 5.9, presentó una eficiencia de 105.86%, lo que significa que puede ser empleada para interpolar los resultados de muestras desconocidas. Sin embargo, en el caso de *L. casei* no se presentó una separación de 3.32 ciclos logarítmicos entre cada dilución (Figura 5.10 y 5.11), por lo que la eficiencia de la curva estándar fue del 61.75% y no pudo ser utilizada en análisis posteriores. Este comportamiento posiblemente se debe a una ineficiencia inherente a la amplificación. En lo que respecta a la reproducibilidad entre réplicas de extracciones independientes, en la Figura 5.11 se observa que los duplicados son muy similares, lo que indica que la extracción de ADN se realizó correctamente.

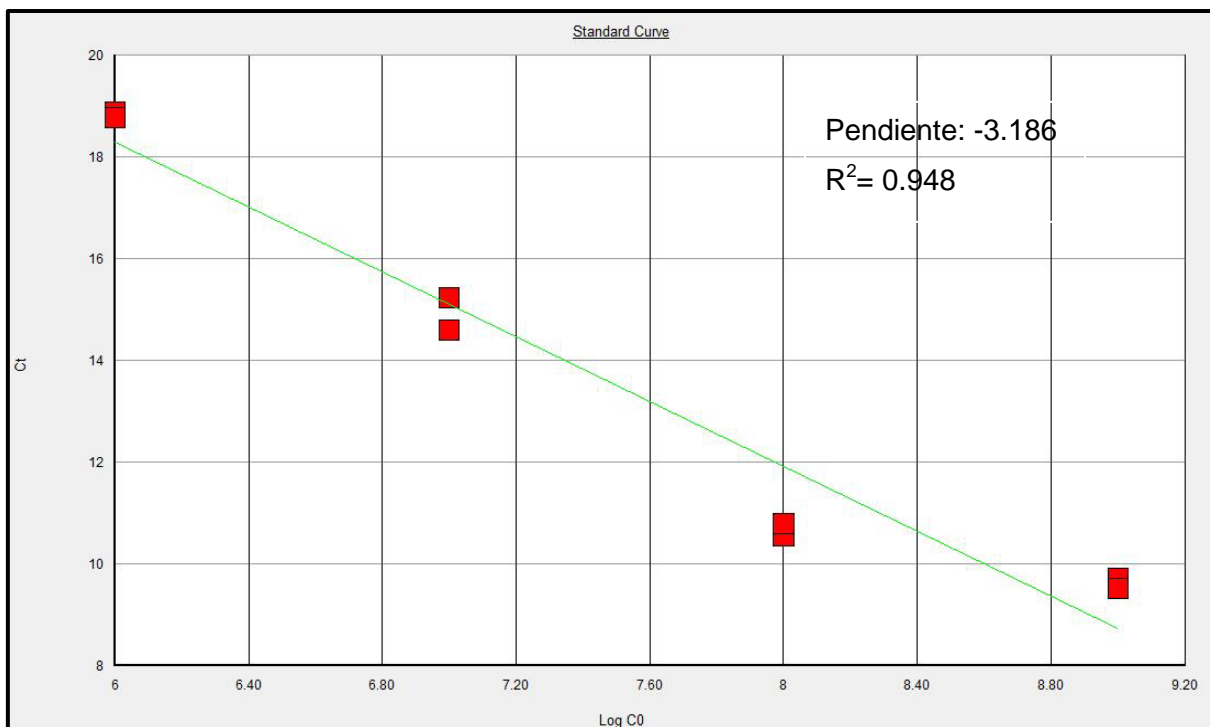


Figura 5.9. Curva patrón por PCR tiempo real de *L. acidophilus* con una eficiencia de 105.86%.

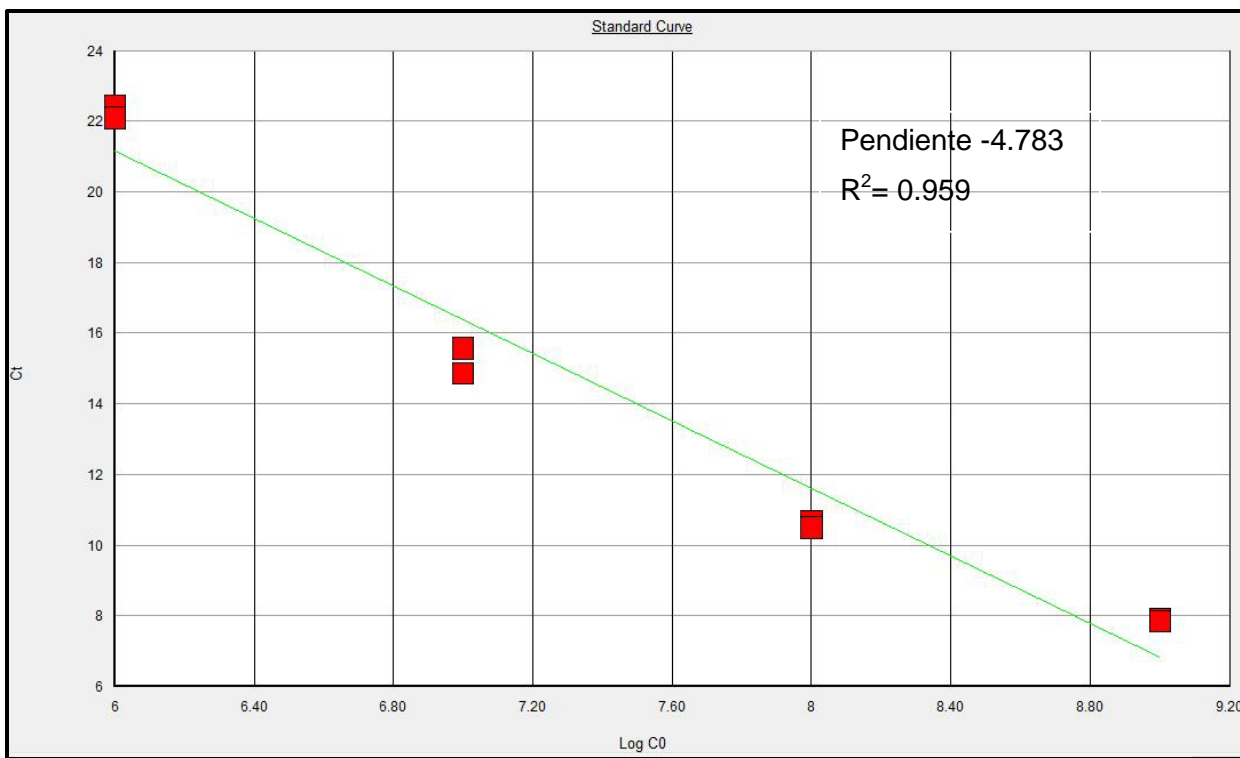


Figura 5.10. Curva patrón por PCR tiempo real de *L. casei* con una eficiencia de 61.75%.



Figura 5.11. Curvas de amplificación de la curva patrón PCR tiempo real de *L. casei* (Duplicados de extracción de ADN). Concentraciones (A) 10⁹ UFC/mL, (B) 10⁸ UFC/mL, (C) 10⁷ UFC/mL, (D) 10⁶ UFC/mL.

Para la construcción de curvas estándar a partir de yogurt simbiótico, la recuperación celular se realizó empleando el Protocolo IV; sin embargo, el pellet celular obtenido no se separó adecuadamente ya que aún se encontraba suspendido en la matriz del alimento, esto se observó después de la primera centrifugación del método, ya que se formó un sedimento grande de coloración blanca, con estructura muy similar a la del yogurt. La razón por la que no se logró recuperar las células del alimento, es que a diferencia del yogurt comercial, el yogurt desarrollado por en el laboratorio contiene fibra soluble. La fibra soluble empleada está formada por polisacáridos que pueden impedir que los componentes del yogurt como las proteínas y la grasa se separen de las células, ya que es posible que queden atrapados entre la estructura.

Una estrategia experimental debe contemplar que los resultados obtenidos sean reproducibles y repetibles para que otros investigadores puedan llevarlo a cabo, ya que de lo contrario, el experimento no tiene validez interna.

Al analizar de manera general cada una de las etapas para llevar a cabo la cuantificación por PCR tiempo real, se observó que la metodología implicaba muchas desventajas, ya que además de que el procedimiento para la recuperación celular debía ser estandarizado nuevamente, los resultados presentaron un elevado coeficiente de variación (43.87), lo que significa que la matriz del alimento representa una barrera para el análisis por PCR tiempo real, debido a la interferencia que producen los componentes de dicho alimento. Por otra parte, la curva patrón para *L. casei* demostró una baja eficiencia en la amplificación, por lo cual no podría ser empleada. Finalmente, la utilización del PMA no reflejó la misma disminución de viabilidad que se observó por medio de cuenta en placa. Por tales razones se decidió medir la viabilidad de los microorganismos probióticos únicamente por cuenta en placa.

5.3. Evaluación de la viabilidad de probióticos durante la vida de anaquel de un yogurt funcional.

Una vez elegida la estrategia más adecuada para cuantificación de los microorganismos probióticos presentes en el yogurt simbiótico, se llevó a cabo la

evaluación de la viabilidad de dichas bacterias a lo largo de la vida de anaquel en cuatro distintas formulaciones de yogurt: natural, endulzado, con mango y con frutos del bosque.

La viabilidad de las células probióticas presentó un comportamiento similar en todas las formulaciones de yogurt. Los resultados presentados en las Tabla 5.11, 5.12, 5.13 y 5.14 son los promedios y las desviaciones estándar de los dos lotes de yogurt analizados durante 50 días. En general se observa poca variabilidad entre los lotes, no obstante entre algunos datos la desviación estándar fue mayor a 0.55, lo cual posiblemente se debe a una falta de homogenización al momento de tomar las muestras para llevar a cabo la cuenta en placa.

En relación a la viabilidad de *L. casei*, este microorganismo presenta una buena estabilidad a lo largo de la vida de anaquel. No obstante, *L. acidophilus* presenta una disminución mayor a un orden de magnitud en este periodo. Existen reportes sobre la sensibilidad de esta especie debido a la presencia de *Lactobacillus delbruekii* ssp. *bulgaricus*, ya que dicho iniciador produce concentraciones altas de H_2O_2 durante el almacenamiento, por la acción de NADH: H_2O_2 oxidasa. A diferencia de *L. acidophilus*, *S. thermophilus* es capaz de descomponer H_2O_2 vía NADH peroxidasa ya que esta enzima convierte H_2O_2 en agua para regenerar $NADH^+$, sin embargo, la actividad de esta enzima disminuye notoriamente a pH 4.5. Debido a que el pH del yogurt en este estudio presentó valores entre 4.1 – 4.2, es probable que dicha enzima haya sido desactivada durante el almacenamiento (Ng. et al., 2010).

No se observa la influencia del pH y la acidez del yogurt en la viabilidad de los microorganismos probióticos, esto se debe a que las BAL se distinguen por presentar características que contrarrestan el estrés por la alta acidez, por ejemplo: su citoplasma muestra una elevada capacidad amortiguadora (pH 3.72-7.73) (Rius et al., 1994); en presencia de ácidos orgánicos, la F_1F_0 -ATPasa ayuda a mantener el pH (Kullen et al., 1999). Además, a partir del análisis de secuencia seguida por experimentos de mutagénesis *L. acidophilus* demostró ser capaz de usar la descarboxilación de aminoácidos como medio para aumentar el pH (Azcarate et al., 2004).

A pesar de la disminución de la viabilidad de *L. acidophilus*, la suma de bacterias probióticas presentes en el yogurt después de los 50 días de almacenamiento, se

encuentra dentro de las especificaciones establecidas por la NOM-181-SCFI-2010 (Dirección General de Normas, 2011) e incluso, aún presenta la dosis terapéutica diaria recomendada por Kailasapathy (Ng. et al., 2010), ya que al final del monitoreo todas las formulaciones de yogurt contenían un número de bacterias probióticas mayor a 10^6 UFC/mL.

Tabla 5.11. Resultados de cuenta en placa de *L. casei* y *L. acidophilus* presentes en yogurt simbiótico natural almacenado a 4°C durante 50 días.

Especies/Día	Cuentas (Log ₁₀ UFC/mL) en yogurt simbiótico							
	1	8	15	22	29	36	44	51
<i>L. casei</i>	6.94 (--)	6.55 (0.10)	6.61 (0.17)	6.80 (0.13)	6.59 (0.00)	6.59 (0.02)	6.68 (0.04)	6.80 (0.05)
<i>L. acidophilus</i>	6.99 (--)	6.60 (0.02)	6.29 (0.51)	--- (--)	6.41 (0.02)	--- (--)	5.90 (0.20)	5.60 (0.24)
<i>Total</i>	7.27 (--)	6.88 (0.06)	6.78 (0.26)	--- (--)	6.81 (0.01)	--- (--)	6.75 (0.01)	6.83 (0.06)

*Se presenta el promedio de 2 lotes y la desviación estándar en paréntesis. Los datos que no se presentan fueron descartados por errores experimentales.

Tabla 5.12. Resultados de cuenta en placa de *L. casei* y *L. acidophilus* presentes en yogurt simbiótico endulzado almacenado a 4°C durante 50 días.

Especies	Cuentas (Log ₁₀ UFC/mL) en yogurt simbiótico							
	1	8	15	22	29	36	44	51
<i>L. casei</i>	6.89 (--)	6.50 (0.04)	6.58 (0.12)	6.60 (0.05)	6.74 (0.24)	6.58 (0.08)	6.66 (0.03)	6.62 (0.03)
<i>L. acidophilus</i>	6.87 (--)	6.52 (0.20)	6.52 (0.15)	6.34 (0.93)	5.83 (--)	6.28 (0.13)	5.54 (0.55)	5.68 (0.24)
<i>Total</i>	7.18 (--)	6.81 (0.12)	6.85 (0.00)	6.79 (0.24)	6.79 (--)	6.76 (0.10)	6.69 (0.03)	6.66 (0.05)

*Se presenta el promedio de 2 lotes y la desviación estándar en paréntesis. Los datos que no se presentan fueron descartados por errores experimentales.

Tabla 5.13. Resultados de cuenta en placa de *L. casei* y *L. acidophilus* presentes en yogurt simbiótico con mango almacenado a 4°C durante 50 días.

Especies	Cuentas (Log ₁₀ UFC/mL) en yogurt simbiótico							
	1	8	15	22	29	36	44	51
<i>L. casei</i>	6.95 (--)	6.66 (0.02)	6.61 (0.04)	6.83 (0.09)	6.91 (0.01)	6.87 (0.08)	6.85 (0.16)	6.85 (0.02)
<i>L. acidophilus</i>	6.99 (--)	6.32 (0.16)	6.02 (0.21)	6.60 (0.09)	6.36 (0.55)	6.34 (0.20)	6.35 (0.01)	5.97 (0.19)
<i>Total</i>	7.27 (--)	6.82 (0.07)	6.71 (0.07)	7.03 (0.02)	7.01 (0.11)	6.98 (0.11)	6.97 (0.12)	6.90 (0.00)

*Se presenta el promedio de 2 lotes y la desviación estándar en paréntesis. Los datos que no se presentan fueron descartados por errores experimentales.

Tabla 5.14. Resultados de cuenta en placa de *L. casei* y *L. acidophilus* presentes en yogurt simbiótico con frutos del bosque almacenado a 4°C durante 50 días.

Especies	Cuentas (Log ₁₀ UFC/mL) en yogurt simbiótico							
	1	8	15	22	29	36	44	51
<i>L. casei</i>	7.05 (--)	6.63 (0.05)	6.53 (0.05)	6.94 (0.09)	6.46 (0.01)	6.79 (0.03)	6.67 (0.07)	6.56 (0.04)
<i>L. acidophilus</i>	6.89 (--)	6.30 (0.10)	6.40 (0.29)	6.66 (0.05)	5.99 (0.53)	5.54 (--)	6.07 (0.09)	5.68 (--)
<i>Total</i>	7.28 (--)	6.80 (0.00)	6.77 (0.14)	7.12 (0.08)	6.58 (0.11)	6.81 (--)	6.76 (0.10)	6.63 (--)

*Se presenta el promedio de 2 lotes y la desviación estándar en paréntesis. Los datos que no se presentan fueron descartados por errores experimentales.

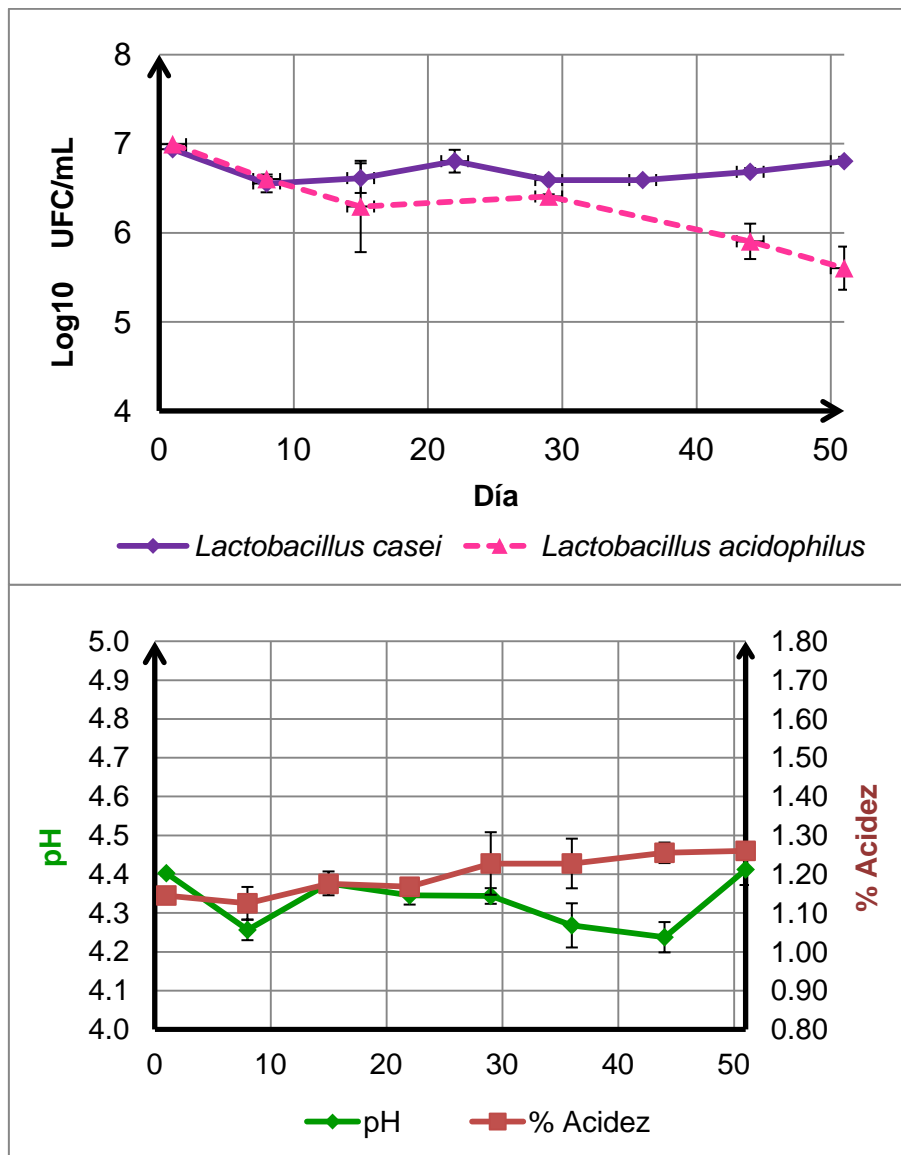


Figura 5.12. Resultados de parámetros fisicoquímicos y microbiológicos del yogurt simbiótico natural a lo largo de la vida de anaquel.

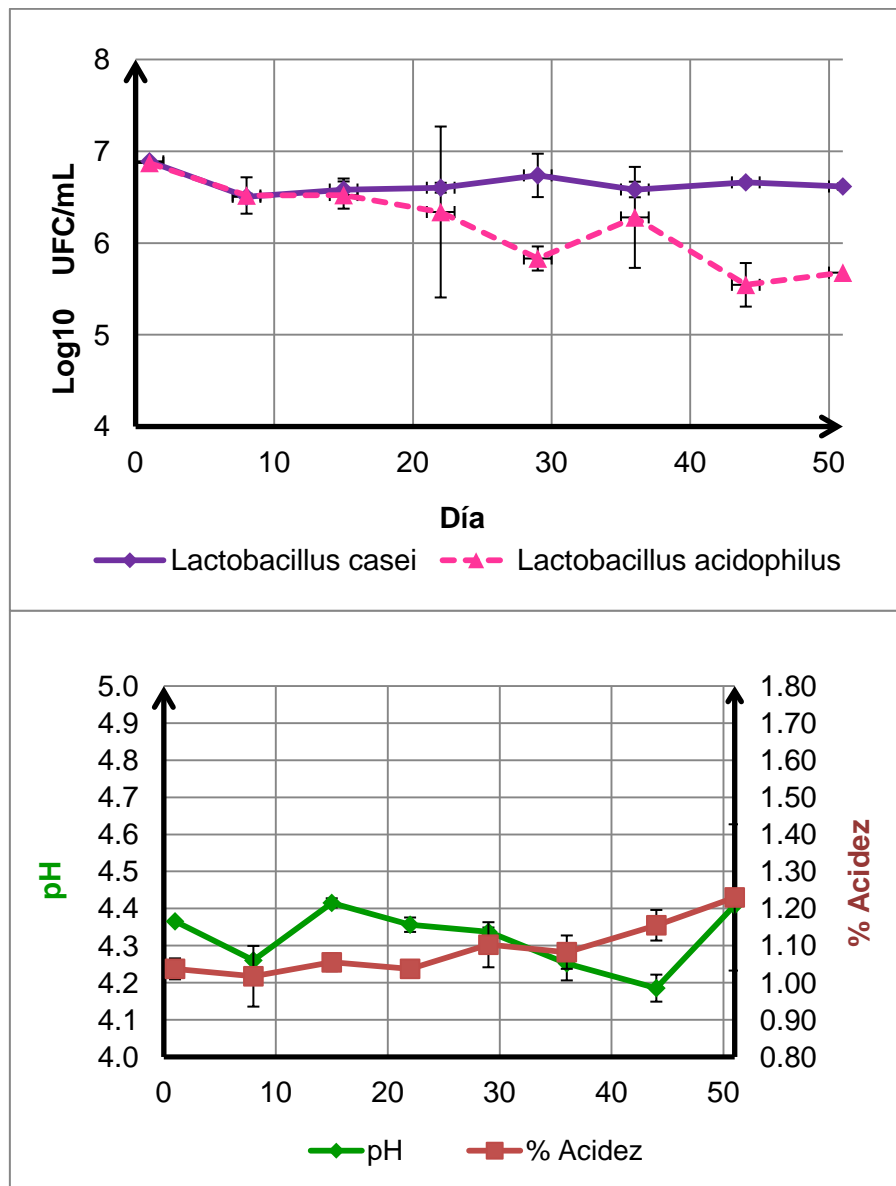


Figura 5.13. Resultados de parámetros fisicoquímicos y microbiológicos del yogurt endulzado a lo largo de la vida de anaquel.

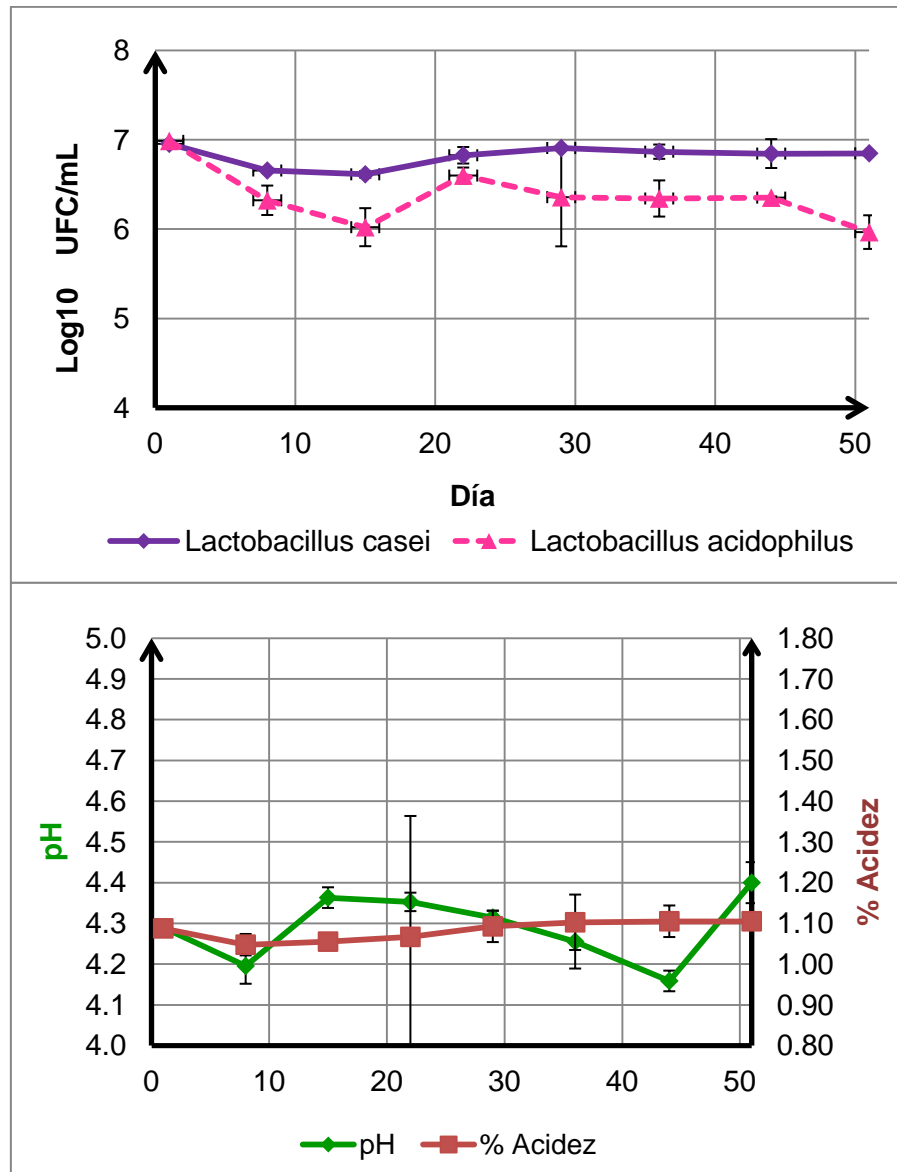


Figura 5.14. Resultados de parámetros fisicoquímicos y microbiológicos del yogurt con mango a lo largo de la vida de anaquel.

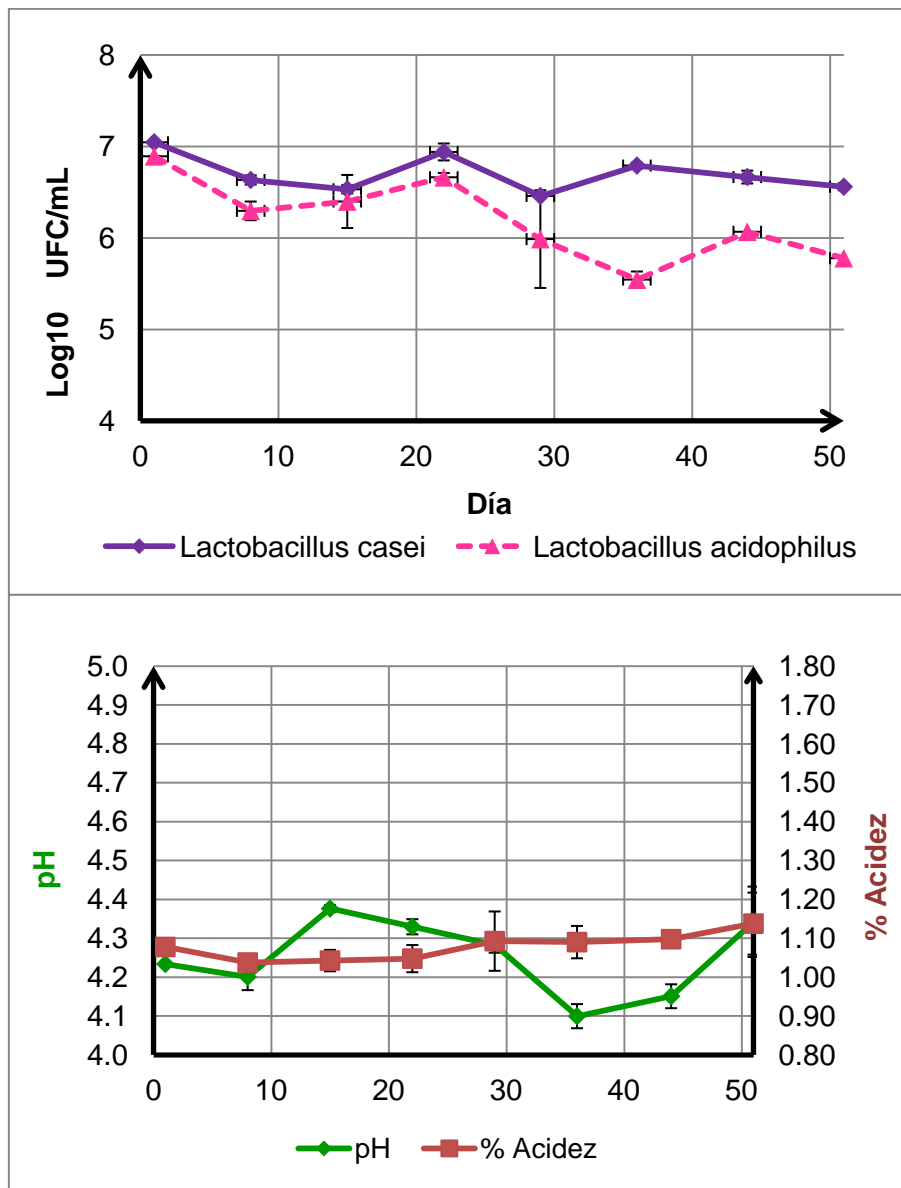


Figura 5.15. Resultados de parámetros fisicoquímicos y microbiológicos del yogurt con frutos del bosque a lo largo de la vida de anaquel.

En este apartado se presentaron los resultados de la evaluación de la viabilidad de las bacterias probióticas *L. acidophilus* y *L. casei*, añadidas al yogurt simbiótico desarrollado en el laboratorio. Estos resultados indican una viabilidad aceptable de las especies a lo largo de la vida de anaquel ya que aún después de los 50 días de almacenamiento a 4°C, presentaron una concentración total de 10⁶ UFC/mL.

La vida de anaquel de los productos determinada experimentalmente en el laboratorio, fue entre 30 y 40 días, dependiendo de la formulación (Mancilla, 2011), por lo que podemos asegurar que los yogurts desarrollados cumplen con las especificaciones de la NOM-181-SCFI-2010 en lo que respecta a la cantidad mínima de cultivos alternativos adicionales.

El recuento selectivo de bacterias probióticas, permitió observar que *L. acidophilus* es la especie más sensible ya que su supervivencia puede verse afectada por el H₂O₂ producido por *L. bulgaricus*, sin embargo esta hipótesis no se puede comprobar debido a que no se midió la concentración de peróxido de hidrógeno a lo largo de la vida de anaquel.

Capítulo VI

Conclusiones

- Los métodos dependientes de cultivo permitieron llevar a cabo la cuantificación de los microorganismos probióticos presentes en el yogurt simbiótico.
- *Lactobacillus casei* presenta buena estabilidad durante la vida de anaquel del yogurt. No obstante, *Lactobacillus acidophilus* presenta una disminución mayor a un orden de magnitud, lo cual puede atribuirse a la presencia de H₂O₂ producido *Lactobacillus delbruekii* ssp. *bulgaricus*.
- La viabilidad de las bacterias probióticas no se vio influida por la diferencia en composición de cada una de las formulaciones analizadas.
- La concentración total de microorganismos probióticos en el yogurt simbiótico después de 50 días de almacenamiento a 4°C, fue de 10⁶ UFC/mL; esta cantidad cumple con las especificaciones de la NOM-181-SCFI-2010 y demuestra la resistencia de las BAL a ambientes de alta acidez.
- El método de extracción y purificación de ADN directamente de yogurt simbiótico no se logró implementar debido a la interferencia de la fibra soluble para el aislamiento de las células.
- El reactivo PMA es capaz de discriminar las células viables de las no viables en la técnica de PCR tiempo real.
- El empleo de métodos moleculares para cuantificar células viables en una matriz compleja como es el yogurt, presentó poca reproducibilidad en los resultados.

Anexo A

Soluciones, medios de cultivo y reactivos empleados

Tabla A.1. Especificaciones de reactivos y medios de cultivo.

Reactivo o medio de cultivo	Marca
Agua grado biología molecular	Mo Bio Laboratorios, Inc.
Agar MRS	Becton, Dickson and Company
Bacto-peptona	Becton, Dickson and Company
Bacto-agar	Becton, Dickinson and Company
Caldo MRS	Oxoid
Cebadores para PCR tiempo real	Applied Biosystems
Citrato trisódico (C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇ •H ₂ O)	Sigma-Aldrich
L-Cisteína (C ₃ H ₇ NO ₂ S)	Aldrich Chemical Company, Inc.
Cloroformo (CHCl ₃)	J.T. Baker
Cloruro de sodio (NaCl)	J.T. Baker
Dimetilsulfóxido o DMSO (CH ₃ SOCH ₃)	Sigma-Aldrich
Etanol (C ₂ H ₆ O)	J.T. Baker
Fenoltaleína (C ₂₉ H ₁₄ O ₄)	Merk
Generador de anaerobiosis	AnaeroGen Oxoid
Hidróxido de sodio 0.1 N (NaOH)	J.T. Baker
Maltosa (C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁)	DIFCO Laboratories
Neutrasa	Novo Nordisk
PMA	Biotium
Sondas Taqman	Applied Biosystems
Twen 80	Drogería cosmopolita, S.A de C.V.)

Tabla A.2. Agua peptonada.

Componente	Cantidad
Peptona de caseína	1 g
NaCl	8.5 g
Agua destilada	1 L
Volumen final	1L

Tabla A.3. Citrato trisódico 1 M.

Componente	Cantidad
Citrato trisódico	29.4 g
Agua destilada	100 mL
Volumen final	100 mL

Tabla A.4. DMSO 20% (v/v).

Componente	Cantidad
DMSO	200 μ L
Agua grado biología molecular	800 μ L
Volumen final	1mL

Tabla A.5. Etanol 75% (v/v).

Componente	Cantidad
Etanol	75 mL
Agua grado biología molecular	25 mL
Volumen final	100 mL

Tabla A.6. Fenofaleína 1% (m/v).

Componente	Cantidad
Fenofaleína	0.5 g
Agua destilada	50 mL
Volumen final	50 mL

Tabla A.7. Medio de cultivo MRS (MRS normal).

Componente	Cantidad
Caldo MRS	52 g
Bacto agar	15 g
Agua destilada	1 L

Tabla A.8. Medio de cultivo MRS (MRS enriquecido).

Componente	Cantidad
Caldo MRS	52 g
Bacto agar	15 g
Tween 80	2 mL
Maltosa	10 g
Cisteína	0.5 g
Agua destilada	1L

Tabla A.9. PMA 20 mM.

Componente	Cantidad
DMSO 20%	97.85 μ L
PMA	1 mg

Tabla A.10. Solución salina 0.85% SSI (m/v).

Componente	Cantidad
NaCl	8.5 g
Agua destilada	1000 mL
Volumen final	1L

Tabla A.11. Solución salina 1.5% (m/v).

Componente	Cantidad
NaCl	10.5 g
Agua destilada	1000 mL
Volumen final	1L

Anexo B

Métodos de recuperación celular

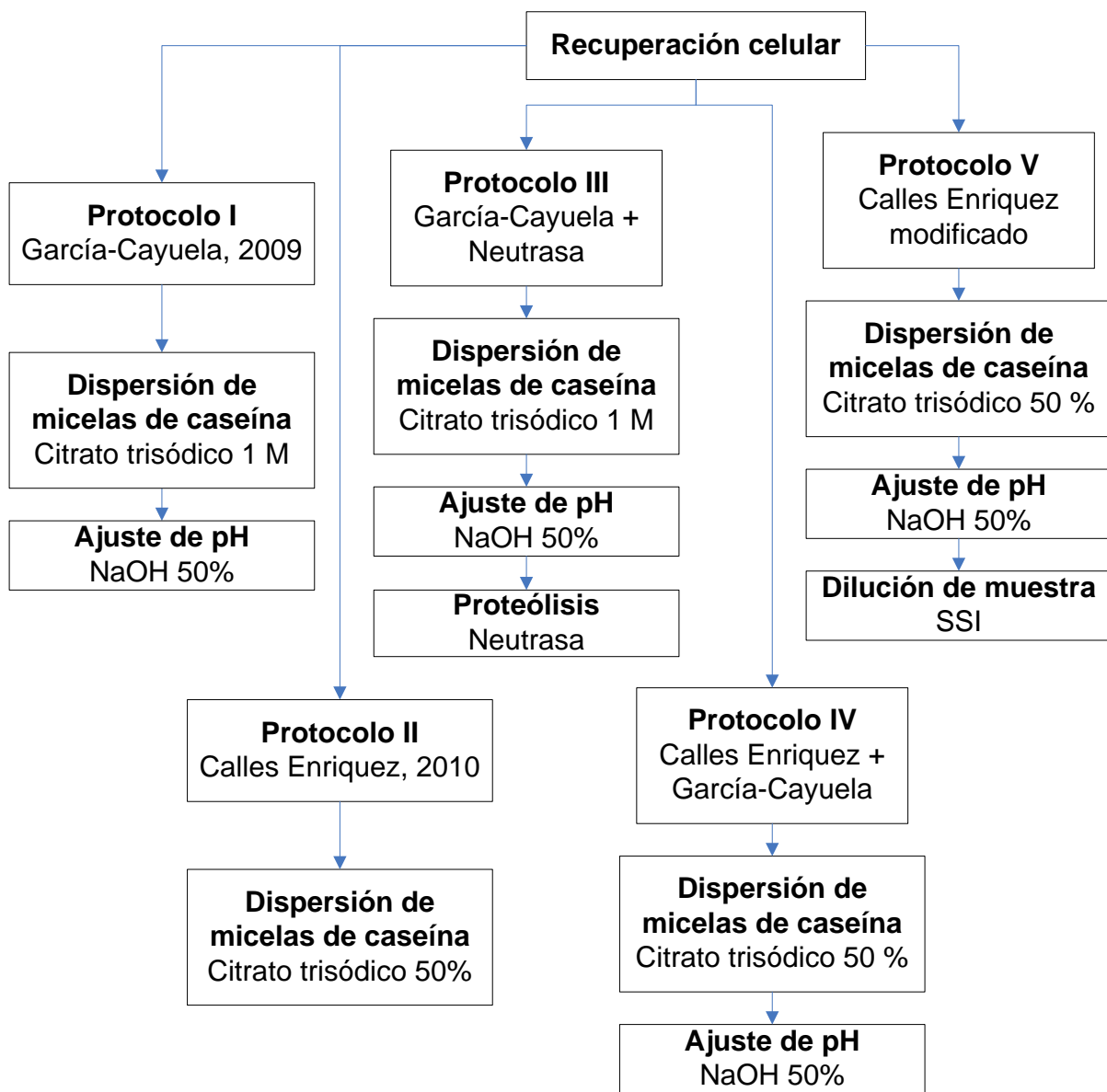


Figura B.1. Esquema general de los protocolos probados para la recuperación celular a partir de yogurt.

1. Pesar en balanza analítica (Ohaus, Voyager) 750 mg de *Lactobacillus acidophilus*, 750 mg *Lactobacillus casei* (Christian Hansen®) y disolver en 5 mL de agua peptonada.
2. Llevar volumen de agua peptonada hasta 10 mL y homogenizar la solución (10^9 UFC/mL).
3. Inocular 1 mL en 150 g de yogurt Alpura natural, para obtener una concentración final 10^7 UFC por g de yogurt.
4. Homogenizar el inóculo con una espátula estéril mediante movimientos circulares y verticales.
5. Pesar 15 g de yogurt con probióticos para los Protocolos I, III y IV; 7.5 g para el Protocolo V; y 1.5 g para el Protocolo II. (Balanza granataria Adam, AQT).
6. Tratamiento particular de cada protocolo:

I. García-Cayuela, 2009

1. Adicionar 20 mL de citrato trisódico 1 M (Sigma-Adrich) y agitar vigorosamente en vórtex (Scientific Industries, Vortex Mixer Genie 2).
2. Ajustar pH (Potenciómetro Hanna, HI 4211) a 6.7 ± 0.2 con una solución de NaOH al 50% p/v (J.Y. Baker).
3. Centrifugar 10 min a 3,500 rpm (1,500 g) en Centrífuga Beckman J2-MC, rotor JA-20.
4. Retirar grasa con hisopo.
5. Repetir pasos 3 y 4 hasta eliminar la mayor cantidad de grasa.
6. Transferir sobrenadante a microtubo para centrífuga (Eppendorf) limpio y centrifugar a 14,000 rpm (24,000 g) durante 10 min en Centrífuga Beckman J2-MC, rotor JA-20.
7. Retirar grasa con hisopo y eliminar sobrenadante.
8. Resuspender en 1 mL de SSI 0.85% p/v y trasvasar a un microtubo.

II. Calles-Enriquez, 2010

1. Adicionar 60 μ L de citrato trisódico al 50% p/v (Sigma-Adrich) y agitar vigorosamente en vórtex (Scientific Industries, Vortex Mixer Genie 2).

III. García-Cayuela + Neutrasa

1. Adicionar 20 mL de citrato trisódico al 1 M (Sigma-Adrich) y agitar vigorosamente en vórtex (Scientific Industries, Vortex Mixer Genie 2).
2. Ajustar pH (Potenciómetro Hanna, HI 4211) a 6.7 ± 0.2 con 100 μ L de una solución de NaOH al 50% p/v (J.Y. Baker).
3. Adicionar 500 μ L de neutrasas Novo Nordisk y homogenizar solución.
4. Incubar a 45°C durante 90 min.
5. Centrifugar 10 min a 3,500 rpm (1,500 g) en Centrífuga Beckman J2-MC, rotor JA-20.
6. Retirar grasa con hisopo.
7. Repetir pasos 5 y 6 una vez más.
8. Transferir sobrenadante a microtubo limpio y centrifugar a 14,000 rpm (24,000 g) durante 10 min en Centrífuga Beckman J2-MC, rotor JA-20.
9. Retirar grasa con hisopo y eliminar sobrenadante.
10. Resuspender en 1 mL de SSI 0.85% p/v y trasvasar a un microtubo.

IV. Calles-Enriquez + García-Cayuela

1. Adicionar 600 μ L de citrato trisódico al 50% p/v (Sigma-Adrich) y agitar vigorosamente en vórtex (Scientific Industries, Vortex Mixer Genie 2).
2. Ajustar pH (Potenciómetro Hanna, HI 4211) a 6.7 ± 0.2 con 100 μ L de una solución de NaOH al 50% p/v (J.Y. Baker).
3. Centrifugar 10 min a 13,200 rpm (21,000 g) a una temperatura de 18°C (Centrífuga Beckman J2-MC, rotor JA-20).
4. Retirar capa superior de grasa con hisopo y eliminar sobrenadante, sin tocar el sedimento en el fondo del microtubo (pellet celular).
5. Resuspender pellet celular en 500 μ L de SSI 0.85% p/v y transvasar volumen a microtubo estéril. Repetir este procedimiento 2 veces más.

V. Calles-Enriquez modificado

1. Adicionar 300 μ L de citrato trisódico al 50% p/v (Sigma-Adrich) y agitar vigorosamente en vórtex (Scientific Industries, Vortex Mixer Genie 2).

2. Ajustar pH (Potenciómetro Hanna, HI 4211) a 6.7 ± 0.2 con 100 μL de una solución de NaOH al 50% p/v (J.Y. Baker).
 3. Adicionar 20 mL de SSI 0.85% p/v.
 4. Centrifugar 10 min a 13,200 rpm (21,000 g) a una temperatura de 18°C (Centrífuga Beckman J2-MC, rotor JA-20).
 5. Retirar capa superior de grasa con hisopo y eliminar sobrenadante, sin tocar el sedimento en el fondo del microtubo (pellet celular).
 6. Resuspender pellet celular en 500 μL de SSI 0.85% p/v y transvasar volumen a microtubo estéril. Repetir este procedimiento 2 veces más.
-
7. Centrifugar 1 min a 14,000 rpm (16,000 g) en microcentrífuga (Eppendorf 5415 C). Las muestras del Protocolo IV y V, se centrifugaron 10 min.
 8. Retirar capa superior de grasa y desechar sobrenadante.

Anexo C

Tratamiento para eliminar células no viables empleando PMA

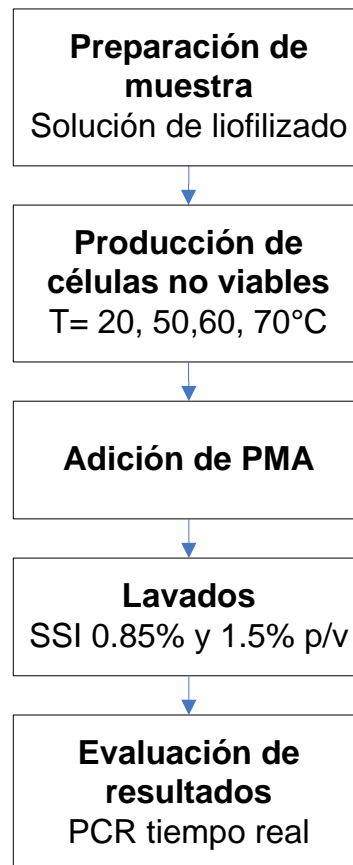


Figura C.1. Protocolo para llevar a cabo el tratamiento con PMA.

1. Pesar 900 mg de *L. casei* y disolver en 8.10 mL de agua peptonada.
2. Distribuir 1 mL de la solución anterior en microtubos para centrifuga estériles.
3. Calentar un par de muestras a 50°C, otro 60°C y uno más 70°C en termomixer (Eppendorf, Compact Thermomixer), durante 15 min a 650 rpm. Un par permanecerá sin tratamiento para ser usado como control.
4. Dejar enfriar muestras a temperatura ambiente.
5. Centrifugar las muestras 14,000 rpm (16,000 g) en microcentrífuga (Eppendorf 5415 C) durante 10 min. Desechar sobrenadante.
6. Resuspender pellet en 500 µL de SSI al 0.85% p/v, y agitar vigorosamente en vórtex (Scientific Industries, Vortex Mixer Genie 2) hasta alcanzar la disolución total.
7. Centrifugar a 10,000 rpm (8,000 g) por 10 min en Microcentrífuga. Desechar sobrenadante.
8. Resuspender pellet en 500 µL de agua MilliQ y agitar vigorosamente en vórtex hasta alcanzar la disolución total.
9. Adicionar 1.25 µL de PMA 20 mM a cada muestra, en la oscuridad.
10. Incubar 10 min en la oscuridad, agitando ocasionalmente.
11. Colocar los microtubos sobre hielo y en posición horizontal.
12. Exponer los microtubos a una fuente de luz de halógeno de 500 W por 15 min a 20 cm de distancia.
13. Centrifugar muestras a 10,000 rpm (8,000 g) durante 10 min. Desechar sobrenadante.
14. Añadir 500 µL de SSI al 1.5% p/v y agitar vigorosamente en vórtex hasta disolución total.
15. Centrifugar muestras a 10,000 rpm (8,000 g) por 10 min. Desechar sobrenadante.
16. Añadir 500 µL de SSI al 0.85% p/v y agitar vigorosamente en vórtex hasta disolución total.
17. Centrifugar muestras a 10,000 rpm (8,000 g) por 10 min. Desechar sobrenadante.
18. Repetir pasos 12 y 13 dos veces más.

Anexo D

Metodologías de medición de pH y acidez

Medición de pH (NMX-F-317-S-1978)

Los productos alimenticios podrán consistir de un líquido, una mezcla de líquido y sólido, los que pueden diferir en acidez. Otros productos alimenticios podrán ser semisólidos o de carácter sólido.

1. Mezclar cuidadosamente la muestra hasta su homogeneización.
2. Calibrar el potenciómetro con las soluciones reguladoras de pH 4, pH 7 y pH 10 según la acidez del producto.
3. Tomar una porción de la muestra ya preparada, mezclarla bien por medio de un agitador y ajustar su temperatura a $20^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$.
4. Sumergir el (los) electrodo (s) en la muestra de manera que los cubra perfectamente. Hacer la medición del pH. Sacar el (los) electrodo (s) y lavarlo (s) con agua.
5. El valor del pH de la muestra se lee directamente en la escala del potenciómetro.

Medición de acidez (NOM-185-SSA1-2002)

La acidez se mide con base a una titulación alcalimétrica con NaOH 0.1 N utilizando fenolftaleína como indicador. Todos los reactivos deben ser grado analítico

a menos que se indique otra especificación y por agua se entiende agua destilada recientemente hervida y se lleva a cabo el siguiente procedimiento:

1. Medir 9 mL (si se emplea la pipeta estándar de crema) o pesar 18 g de muestra perfectamente mezclada en un matraz Erlenmeyer o una cápsula de porcelana. Si la muestra es medida volumétricamente, enjuagar la pipeta con veces su volumen de agua y adicionar los enjuagues al matraz o cápsula y mezclar bien.
2. Si la muestra es pesada, añadir 2 veces el peso de la misma en agua y mezclar bien.
3. Adicionar 0.5 mL de indicador de fenolftaleína y titular con solución de hidróxido de sodio 0.1 N hasta la aparición de un color rosa permanente por lo menos 30 segundos (se recomienda emplear siempre una cantidad constante de indicador ya que su concentración puede influir en los resultados).

El resultado final se obtiene a través de la fórmula $VxNx(9M)$ donde: V equivale a los mL de NaOH 0.1 N gastados en la titulación, N es la normalidad de la solución de NaOH y M es el volumen o peso de la muestra.

Finalmente el resultado se expresa como % Acidez titulable expresada como ácido láctico.

Anexo E

Cálculo de dosis terapéutica

De acuerdo a la NOM-181-SCFI-2010 la cantidad mínima de microorganismos adjuntos que debe adicionar al yogurt es de 10^6 UFC/g o 10^8 UFC/100 g, esto es equivalente a la dosis terapéutica reportada por Kailasapathy (Ng. *et. al.*, 2010), quien señala que la concentración de microorganismos probióticos necesarios para producir un efecto benéfico es de 10^8 UFC/día. Por otro lado un mexicano consume 8 kg de yogurt anualmente, es decir 22.2 g al día. Considerando estos datos:

Consumo promedio x Especificación

$$\left(22.2 \frac{g}{día}\right) \times \left(\frac{10^6 \text{ UFC}}{g}\right) = 2.22 \times 10^7 \frac{\text{UFC}}{día} \cong 10^7 \frac{\text{UFC}}{g}$$
$$10^7 \frac{\text{UFC}}{g} \times 100 \text{ g de yogurt} = 10^9 \frac{\text{UFC}}{100 \text{ g de yogurt}}$$

De acuerdo a las especificaciones del proveedor de probióticos liofilizados (Christian Hansen ®), cada gramo de liofilizado contiene alrededor de 10^{10} UFC. Por lo tanto se deberá agregar un gramo de liofilizado por cada kilogramo de yogurt. Considerando que se utilizarán dos probióticos, se tendrían que agregar 500 mg de *L. acidophilus* y 500 mg de *L. casei*.

Anexo F

Resultados de evaluación de la viabilidad

Tabla F.1. Resultados de viabilidad de probióticos durante la vida de anaquel del yogurt natural.

Fecha	Día	<i>Natural</i>				
		<i>Lactobacillus casei</i> (UFC/mL)	<i>L. casei + L. acidophilus</i> (UFC/mL)	<i>Lactobacillus acidophilus</i> (UFC/mL)	pH	% Acidez
29 03 2011	1					
Lote 1		90x10 ⁵	19x10 ⁶	97x10 ⁵	4.389	1.12
		83 x10 ⁵	18x10 ⁶	10x10 ⁶	4.381	1.14
<i>Promedio</i>		<i>87x10⁵</i>	<i>19x10⁶</i>	<i>99x10⁵</i>	<i>4.385</i>	<i>1.13</i>
Lote 2		---	---	---	4.429	1.15
		---	---	---	4.411	1.17
<i>Promedio</i>		<i>---</i>	<i>---</i>	<i>---</i>	<i>4.420</i>	<i>1.16</i>
R. FINAL		87x10⁵	19x10⁶	99x10⁵	4.403	1.15
5 04 2011	8	C	CA	A	pH	% A
Lote 1		46x10 ⁵	76x10 ⁵	30x10 ⁵	4.272	1.13
		37x10 ⁵	90x10 ⁵	53x10 ⁵	4.223	1.08
<i>Promedio</i>		<i>42x10⁵</i>	<i>83x10⁵</i>	<i>42x10⁵</i>	<i>4.248</i>	<i>1.11</i>
Lote 2		32x10 ⁵	74x10 ⁵	42x10 ⁵	4.248	1.18
		28x10 ⁵	63x10 ⁵	35x10 ⁵	4.282	1.11
<i>Promedio</i>		<i>30x10⁵</i>	<i>69x10⁵</i>	<i>39x10⁵</i>	<i>4.265</i>	<i>1.15</i>
R. FINAL		36x10⁵	76x10⁵	40x10⁵	4.256	1.13
12 04 2011	15	C	CA	A	pH	% A
Lote 1		52x10 ⁵	87x10 ⁵	35x10 ⁵	4.389	1.12
		52x10 ⁵	83x10 ⁵	31x10 ⁵	4.381	1.14
<i>Promedio</i>		<i>52x10⁵</i>	<i>85x10⁵</i>	<i>33x10⁵</i>	<i>4.385</i>	<i>1.13</i>
Lote 2		32x10 ⁵	37x10 ⁵	54x10 ⁴	4.429	1.15
		29x10 ⁵	36x10 ⁵	71x10 ⁴	4.411	1.17

<i>Promedio</i>		30×10^5	36×10^5	63×10^4	4.420	1.16
R. FINAL		41×10^5	61×10^5	20×10^5	4.403	1.15
19 04 2011	22	C	CA	A	<i>pH</i>	% A
Lote 1		53×10^5	73×10^4	-46×10^5	4.318	1.17
		48×10^5	71×10^4	-41×10^5	4.364	1.17
<i>Promedio</i>		51×10^5	72×10^4	-43×10^5	4.341	1.17
Lote 2		76×10^5	73×10^4	-69×10^5	4.366	1.18
		77×10^5	10×10^5	-67×10^5	4.333	1.15
<i>Promedio</i>		77×10^5	88×10^4	-68×10^5	4.350	1.17
R. FINAL		64×10^5	80×10^4	---	4.345	1.17
26 04 2011	29	C	CA	A	<i>pH</i>	% A
Lote 1		35×10^5	59×10^5	24×10^5	4.355	1.22
		43×10^5	68×10^5	25×10^5	4.345	1.20
<i>Promedio</i>		39×10^5	64×10^5	25×10^5	4.350	1.21
Lote 2		44×10^5	66×10^5	22×10^5	4.360	1.34
		34×10^5	65×10^5	31×10^5	4.315	1.15
<i>Promedio</i>		39×10^5	66×10^5	27×10^5	4.338	1.25
R. FINAL		39×10^5	65×10^5	26×10^5	4.344	1.23
3 04 2011	36	C	CA	A	<i>pH</i>	% A
Lote 1		38×10^5	11×10^5	-27×10^5	4.317	1.18
		43×10^5	13×10^5	-30×10^5	4.202	1.19
<i>Promedio</i>		41×10^5	12×10^5	-28×10^5	4.260	1.19
Lote 2		36×10^5	29×10^5	-70×10^4	4.314	1.32
		39×10^5	32×10^5	-70×10^4	4.239	1.22
<i>Promedio</i>		38×10^5	31×10^5	-70×10^4	4.277	1.27
R. FINAL		39×10^5	21×10^5	----	4.268	1.23
10 04 2011	44	C	CA	A	<i>pH</i>	% A
Lote 1		50×10^5	53×10^5	30×10^4	4.237	1.22
		53×10^5	61×10^5	80×10^4	4.202	1.27
<i>Promedio</i>		52×10^5	57×10^5	55×10^4	4.220	1.25
Lote 2		42×10^5	43×10^5	10×10^4	4.292	1.25
		48×10^5	68×10^5	20×10^5	4.219	1.28
<i>Promedio</i>		45×10^5	56×10^5	11×10^5	4.256	1.27
R. FINAL		48×10^5	56×10^5	80×10^4	4.238	1.26
17 04 2011	51	C	CA	A	<i>pH</i>	% A
Lote 1		60×10^5	63×10^5	30×10^4	4.407	1.27

	57x10 ⁵	59x10 ⁵	20x10 ⁴	4.385	1.23
<i>Promedio</i>	59x10 ⁵	61x10 ⁵	25x10 ⁴	4.396	1.25
Lote 2	78x10 ⁵	83x10 ⁵	50x10 ⁴	4.470	1.27
	59x10 ⁵	65x10 ⁵	60x10 ⁴	4.386	1.27
<i>Promedio</i>	69x10 ⁵	74x10 ⁵	55x10 ⁴	4.428	1.27
R. FINAL	64x10⁵	68x10⁵	40x10⁴	4.412	1.26

Tabla F.2. Resultados de viabilidad de probióticos durante la vida de anaquel del yogurt endulzado.

Fecha	Día	<i>Endulzado</i>					
		<i>Lactobacillus casei</i> (UFC/mL)	<i>L. casei + L. acidophilus</i> (UFC/mL)	<i>Lactobacillus acidophilus</i> (UFC/mL)	pH	% Acidez	
29 03 2011	1	Lote 1	70x10 ⁵	11x10 ⁶	42x10 ⁵	4.343	1.02
			85x10 ⁵	19x10 ⁶	11x10 ⁶	4.336	1.06
		<i>Promedio</i>	78x10 ⁵	15x10 ⁶	75x10 ⁵	4.340	1.04
	Lote 2		---	---	---	4.391	1.02
			---	---	---	4.392	1.05
		<i>Promedio</i>	---	---	---	4.392	1.04
		R. FINAL	78x10⁵	15x10⁷	75x10⁵	4.366	1.04
5 04 2011	8	C	CA	A	pH	% A	
Lote 1		34x10 ⁵	80x10 ⁵	46x10 ⁵	4.256	1.12	
		32x10 ⁵	74x10 ⁵	42x10 ⁵	4.264	1.02	
		<i>Promedio</i>	33x10 ⁵	77x10 ⁵	44x10 ⁵	4.260	1.07
Lote 2		30x10 ⁵	51x10 ⁵	21x10 ⁵	4.257	1.01	
		32x10 ⁵	54x10 ⁵	22x10 ⁵	4.264	0.92	
		<i>Promedio</i>	31x10 ⁵	53x10 ⁵	22x10 ⁵	4.261	0.97
		R. FINAL	32x10⁵	65x10⁵	33x10⁵	4.260	1.02
12 04 2011	15	C	CA	A	pH	% A	
Lote 1		46x10 ⁵	73x10 ⁵	27x10 ⁵	4.432	1.06	
		45x10 ⁵	69x10 ⁵	24x10 ⁵	4.404	1.07	
		<i>Promedio</i>	46x10 ⁵	71x10 ⁵	25x10 ⁵	4.418	1.07
Lote 2		31x10 ⁵	72x10 ⁵	41x10 ⁵	4.408	1.02	
		30x10 ⁵	69x10 ⁵	39x10 ⁵	4.417	1.07	
		<i>Promedio</i>	31x10 ⁵	71x10 ⁵	40x10 ⁵	4.413	1.05
		R. FINAL	38x10⁵	72x10⁵	33x10⁵	4.415	1.06
19 04 2011	22	C	A	A	pH	% A	

Lote 1		39x10 ⁵	41x10 ⁵	20x10 ⁴	4.381	1.05
		34x10 ⁵	36x10 ⁵	20x10 ⁴	4.339	1.03
<i>Promedio</i>		<i>37x10⁵</i>	<i>39x10⁵</i>	<i>20x10⁴</i>	<i>4.360</i>	<i>1.04</i>
Lote 2		45x10 ⁵	86x10 ⁵	41x10 ⁵	4.363	1.03
		42x10 ⁵	84x10 ⁵	42x10 ⁵	4.343	1.04
<i>Promedio</i>		<i>44x10⁵</i>	<i>85x10⁵</i>	<i>42x10⁵</i>	<i>4.353</i>	<i>1.04</i>
R. FINAL		40x10⁵	62x10⁵	22x10⁵	4.357	1.04
26 04 2011	29	C	CA	A	pH	% A
Lote 1		73x10 ⁵	70x10 ⁵	-30x10 ⁴	4.333	1.19
		76x10 ⁵	71x10 ⁵	-50x10 ⁴	4.335	1.08
<i>Promedio</i>		<i>75x10⁵</i>	<i>71x10⁵</i>	<i>-40x10⁴</i>	<i>4.334</i>	<i>1.14</i>
Lote 2		33x10 ⁵	46x10 ⁵	13x10 ⁵	4.354	1.09
		36x10 ⁵	37x10 ⁵	11x10 ⁴	4.326	1.05
<i>Promedio</i>		<i>35x10⁵</i>	<i>41x10⁵</i>	<i>68x10⁴</i>	<i>4.340</i>	<i>1.07</i>
R. FINAL		55x10⁵	61x10⁵	68x10⁵	4.337	1.10
3 05 2011	36	C	CA	A	pH	% A
Lote 1		36x10 ⁵	52x10 ⁵	16x10 ⁵	4.287	1.12
		30x10 ⁵	44x10 ⁵	14x10 ⁵	4.197	1.08
<i>Promedio</i>		<i>33x10⁵</i>	<i>48x10⁵</i>	<i>15x10⁵</i>	<i>4.242</i>	<i>1.10</i>
Lote 2		38x10 ⁵	66x10 ⁵	28x10 ⁵	4.293	1.02
		49x10 ⁵	67x10 ⁵	18x10 ⁵	4.232	1.11
<i>Promedio</i>		<i>44x10⁵</i>	<i>67x10⁵</i>	<i>23x10⁵</i>	<i>4.263</i>	<i>1.07</i>
R. FINAL		38x10⁵	57x10⁵	19x10⁵	4.252	1.08
11 05 2011	44	C	CA	A	pH	% A
Lote 1		42x10 ⁵	40x10 ⁵	-20x10 ⁴	4.232	1.20
		45x10 ⁵	46x10 ⁵	10x10 ⁴	4.143	1.10
<i>Promedio</i>		<i>44x10⁵</i>	<i>43x10⁵</i>	<i>10x10⁴</i>	<i>4.188</i>	<i>1.15</i>
Lote 2		46x10 ⁵	39x10 ⁵	-70x10 ⁴	4.184	1.16
		50x10 ⁵	56x10 ⁵	60x10 ⁴	4.183	1.16
<i>Promedio</i>		<i>48x10⁵</i>	<i>48x10⁵</i>	<i>60x10⁴</i>	<i>4.184</i>	<i>1.16</i>
R. FINAL		46x10⁵	49x10⁵	35x10⁴	4.186	1.16
18 05 2011	51	C	CA	A	pH	% A
Lote 1		37x10 ⁵	45x10 ⁵	80x10 ⁴	4.399	1.25
		50x10 ⁵	55x10 ⁵	50x10 ⁴	4.403	1.06
<i>Promedio</i>		<i>44x10⁵</i>	<i>50x10⁵</i>	<i>65x10⁴</i>	<i>4.401</i>	<i>1.16</i>
Lote 2		34x10 ⁵	36x10 ⁵	20x10 ⁴	4.417	1.11
		44x10 ⁵	48x10 ⁵	40x10 ⁴	4.416	1.50

Promedio	39×10^5	42×10^5	30×10^4	4.417	1.31
R. FINAL	41×10^5	46×10^5	48×10^4	4.409	1.23

Tabla F.3. Resultados de viabilidad de probióticos durante la vida de anaquel del yogurt con mango.

Fecha	Día	Mango				
29 03 2011	1	<i>Lactobacillus casei</i> (UFC/mL)	<i>L. casei</i> + <i>L. acidophilus</i> (UFC/mL)	<i>Lactobacillus acidophilus</i> (UFC/mL)	pH	% Acidez
Lote 1		94×10^5	17×10^6	73×10^5	4.267	1.06
		86×10^5	21×10^6	12×10^6	4.251	1.08
Promedio		90×10^5	19×10^6	97×10^5	4.259	1.07
Lote 2		---	---	---	4.306	1.13
		---	---	---	4.336	1.08
Promedio		---	---	---	4.321	1.11
R. FINAL		90×10^5	19×10^6	97×10^5	4.290	1.09
5 04 2011	8	C	CA	A	pH	% A
Lote 1		50×10^5	81×10^5	31×10^5	4.210	1.07
		44×10^5	66×10^5	22×10^5	4.187	1.05
Promedio		47×10^5	74×10^5	27×10^5	4.199	1.06
Lote 2		38×10^5	56×10^5	18×10^5	4.244	1.01
		49×10^5	62×10^5	13×10^5	4.140	1.06
Promedio		44×10^5	59×10^5	16×10^5	4.192	1.04
R. FINAL		45×10^5	66×10^5	21×10^5	4.195	1.05
12 04 2011	15	C	CA	A	pH	% A
Lote 1		41×10^5	54×10^5	13×10^5	4.399	1.04
		36×10^5	37×10^5	10×10^4	4.361	1.07
Promedio		39×10^5	46×10^5	70×10^4	4.380	1.06
Lote 2		37×10^5	56×10^5	19×10^5	4.341	1.06
		50×10^5	59×10^5	90×10^4	4.351	1.05
Promedio		44×10^5	58×10^5	14×10^5	4.346	1.06
R. FINAL		41×10^5	52×10^5	11×10^5	4.363	1.06
19 04 2011	22	C	A	A	pH	% A
Lote 1		60×10^5	11×10^6	49×10^5	4.369	1.66
		54×10^5	96×10^5	42×10^5	4.373	1.07
Promedio		57×10^5	10×10^6	46×10^5	4.371	1.07
Lote 2		77×10^5	11×10^6	37×10^5	4.325	1.07

		77×10^5	11×10^6	31×10^5	4.343	1.06
<i>Promedio</i>		77×10^5	11×10^6	34×10^5	4.334	1.07
R. FINAL		67×10^5	11×10^6	40×10^5	4.353	1.07
26 04 2011	29	C	CA	A	<i>pH</i>	% A
Lote 1		88×10^5	13×10^6	40×10^5	4.331	1.08
		77×10^5	12×10^6	38×10^5	4.322	1.15
<i>Promedio</i>		83×10^5	12×10^6	39×10^5	4.327	1.12
Lote 2		76×10^5	81×10^5	50×10^4	4.311	1.07
		82×10^5	90×10^5	80×10^4	4.293	1.07
<i>Promedio</i>		79×10^5	86×10^5	65×10^4	4.302	1.07
R. FINAL		81×10^5	10×10^6	23×10^5	4.314	1.09
3 05 2011	36	C	CA	A	<i>pH</i>	% A
Lote 1		83×10^5	11×10^6	27×10^5	4.289	1.13
		83×10^5	11×10^6	31×10^5	4.181	1.17
<i>Promedio</i>		83×10^5	11×10^6	29×10^5	4.235	1.15
Lote 2		65×10^5	84×10^5	19×10^5	4.329	1.01
		63×10^5	74×10^5	11×10^5	4.222	1.10
<i>Promedio</i>		64×10^5	79×10^5	15×10^5	4.276	1.06
R. FINAL		74×10^5	96×10^5	$2.2E+06$	4.255	1.10
11 05 2011	44	C	CA	A	<i>pH</i>	% A
Lote 1		77×10^5	95×10^5	18×10^5	4.167	1.12
		99×10^5	13×10^6	28×10^5	4.144	1.05
<i>Promedio</i>		88×10^5	11×10^6	23×10^5	4.156	1.09
Lote 2		45×10^5	68×10^5	23×10^5	4.190	1.11
		59×10^5	80×10^5	21×10^5	4.133	1.14
<i>Promedio</i>		52×10^5	74×10^5	22×10^5	4.162	1.13
R. FINAL		70×10^5	93×10^5	23×10^5	4.159	1.11
18 05 2011	51	C	CA	A	<i>pH</i>	% A
Lote 1		65×10^5	72×10^5	70×10^4	4.396	1.11
		81×10^5	87×10^5	60×10^4	4.440	1.12
<i>Promedio</i>		73×10^5	80×10^5	65×10^4	4.418	1.12
Lote 2		74×10^5	85×10^5	11×10^5	4.330	1.10
		62×10^5	75×10^5	13×10^5	4.433	1.09
<i>Promedio</i>		68×10^5	80×10^5	12×10^5	4.382	1.10
R. FINAL		71×10^5	80×10^5	93×10^4	4.400	1.11

Tabla F.4. Resultados de viabilidad de probióticos durante la vida de anaquel del yogurt con frutos del bosque.

Fecha	Día	Frutos del Bosque			pH	% Acidez
29 03 2011	1	<i>Lactobacillus casei</i> (UFC/mL)	<i>L. casei</i> + <i>L. acidophilus</i> (UFC/mL)	<i>Lactobacillus acidophilus</i> (UFC/mL)		
Lote 1		13x10 ⁶	20x10 ⁶	73x10 ⁵	4.201	1.07
		97x10 ⁵	18x10 ⁶	83x10 ⁵	4.198	1.05
<i>Promedio</i>		11x10 ⁶	19x10 ⁶	78x10 ⁵	4.200	1.06
Lote 2		---	---	---	4.271	1.09
		---	---	---	4.265	1.10
<i>Promedio</i>		---	---	---	4.268	1.10
R. FINAL		11x10⁶	19x10⁶	78x10⁵	4.234	1.08
5 04 2011	8	C	CA	A	pH	% A
Lote 1		44x10 ⁵	70x10 ⁵	26x10 ⁵	4.234	1.02
		35x10 ⁵	55x10 ⁵	20x10 ⁵	4.221	1.04
<i>Promedio</i>		40x10 ⁵	63x10 ⁵	23x10 ⁵	4.228	1.03
Lote 2		45x10 ⁵	50x10 ⁵	50x10 ⁴	4.191	1.05
		48x10 ⁵	76x10 ⁵	28x10 ⁵	4.157	1.04
<i>Promedio</i>		47x10 ⁵	63x10 ⁵	17x10 ⁵	4.174	1.05
R. FINAL		43x10⁵	63x10⁵	20x10⁵	4.201	1.04
12 04 2011	15	C	CA	A	pH	% A
Lote 1		37x10 ⁵	80x10 ⁵	43x10 ⁵	4.383	1.03
		36x10 ⁵	65x10 ⁵	29x10 ⁵	4.378	1.07
<i>Promedio</i>		37x10 ⁵	73x10 ⁵	36x10 ⁵	4.381	1.05
Lote 2		32x10 ⁵	52x10 ⁵	20x10 ⁵	4.381	1.06
		31x10 ⁵	39x10 ⁵	80x10 ⁴	4.363	1.01
<i>Promedio</i>		32x10 ⁵	46x10 ⁵	12x10 ⁵	4.372	1.04
R. FINAL		34x10⁵	59x10⁵	25x10⁵	4.376	1.04
19 04 2011	22	C	A	A	pH	% A
Lote 1		11x10 ⁶	17x10 ⁶	57x10 ⁵	4.341	1.06
		91x10 ⁶	13x10 ⁶	42x10 ⁵	4.351	1.09
<i>Promedio</i>		10x10 ⁶	15x10 ⁶	50x10 ⁵	4.346	1.08
Lote 2		75x10 ⁵	12x10 ⁶	43x10 ⁵	4.314	1.03
		73x10 ⁵	12x10 ⁶	42x10 ⁵	4.312	1.01
<i>Promedio</i>		74x10 ⁵	12x10 ⁶	43x10 ⁵	4.313	1.02

R. FINAL		87x10⁵	13x10⁶	46x10⁵	4.330	1.05
26 04 2011	29	C	CA	A	pH	% A
Lote 1		30x10 ⁵	47x10 ⁵	17x10 ⁵	4.295	1.08
		28x10 ⁵	44x10 ⁵	16x10 ⁵	4.271	1.20
<i>Promedio</i>		29x10 ⁵	46x10 ⁵	17x10 ⁵	4.283	1.14
Lote 2		28x10 ⁵	32x10 ⁵	41x10 ⁴	4.303	1.02
		29x10 ⁵	31x10 ⁵	18x10 ⁴	4.261	1.07
<i>Promedio</i>		29x10 ⁵	31x10 ⁵	29x10 ⁴	4.282	1.05
R. FINAL		29x10⁵	38x10⁵	97x10⁴	4.283	1.09
3 05 2011	36	C	CA	A	pH	% A
Lote 1		71x10 ⁵	30x10 ⁵	-41x10 ⁵	4.062	1.14
		59x10 ⁵	43x10 ⁵	-16x10 ⁵	4.126	1.08
<i>Promedio</i>		65x10 ⁵	37x10 ⁵	-29x10 ⁵	4.094	1.11
Lote 2		64x10 ⁵	68x10 ⁵	40x10 ⁴	4.086	1.04
		53x10 ⁵	56x10 ⁵	30x10 ⁴	4.124	1.10
<i>Promedio</i>		59x10 ⁵	62x10 ⁵	35x10 ⁴	4.105	1.07
R. FINAL		62x10⁵	65x10⁵	35x10⁴	4.100	1.09
11 05 2011	44	C	CA	A	pH	% A
Lote 1		59x10 ⁵	70x10 ⁵	11x10 ⁵	4.123	1.08
		44x10 ⁵	54x10 ⁵	10x10 ⁵	4.183	1.12
<i>Promedio</i>		52x10 ⁵	62x10 ⁵	11x10 ⁵	4.153	1.10
Lote 2		40x10 ⁵	34x10 ⁵	-60x10 ⁴	4.171	1.09
		42x10 ⁵	56x10 ⁵	14x10 ⁵	4.126	1.10
<i>Promedio</i>		41x10 ⁵	45x10 ⁵	14x10 ⁵	4.149	1.10
R. FINAL		46x10⁵	58x10⁵	12x10⁵	4.151	1.10
18 05 2011	51	C	CA	A	pH	% A
Lote 1		38x10 ⁵	30x10 ⁵	-78x10 ⁴	4.326	1.15
		39x10 ⁵	32x10 ⁵	-72x10 ⁴	4.402	1.11
<i>Promedio</i>		39x10 ⁵	31x10 ⁵	-75x10 ⁴	4.364	1.13
Lote 2		29x10 ⁵	35x10 ⁵	60x10 ⁴	4.221	1.05
		39x10 ⁵	45x10 ⁵	60x10 ⁴	4.420	1.24
<i>Promedio</i>		34x10 ⁵	40x10 ⁵	60x10 ⁴	4.321	1.15
R. FINAL		36x10⁵	42x10⁵	60x10⁴	4.342	1.14

Referencias

Academia del área de Plantas Piloto de Alimentos, 2004. *Introducción a la tecnología de alimentos* Distrito Federal: Limusa, P. 13

Anaya, J.M., Cañas, C.A., Cervera, R., et al., 2005. *Autoinmunidad y enfermedad autoinmune*. Medellín: Corporación para investigaciones Biológicas, pp. 522 y 523.

Azcarate, M.A., Altermann, E., Hoover, R.L., Cano, R., Klaenhammer, T.R., 2004. Identification and inactivation of genetic loci involved with *Lactobacillus acidophilus* acid tolerance. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(9), pp. 5315–5322.

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

Biotium, 2011. *Product Information*. [En línea] (Actualizado al 18 de agosto de 2009). Disponible en: http://www.biotium.com./product/product_types/search/price_and_info.asp?item=40013. [Último acceso el 29 de septiembre del 2010].

Calles, M., Ladero, V., Fernández M., Cruz, M., Alvarez, M.A., 2010. Extraction of RNA from fermented milk products for in situ gene expression analysis. *Analytical Biochemistry*, 400, pp. 307-309.

Dale, J.W., Schantz, M., 2007. *From Genes to Genomes Concept and Applications of DNA Technology*. 2°. San Francisco: Wiley, pp. 33-37.

Dirección General de Normas, 2011, *Consulta del Catálogo de Normas Oficiales Mexicanas*. [En línea] (Actualizado al 1 de agosto de 2011). Disponible en: <http://www.economia-noms.gob.mx/noms/inicio.do> [Último acceso el 4 de septiembre del 2010].

European Bioinformatics Institute, 2011. *ClustalW2 - Multiple Sequence Alignment*. [En línea] (Actualizado al 15 de agosto de 2011). Disponible en: <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>. [Último acceso el 12 de julio del 2010].

Fittipaldi, M., Codony, F., Adrados B., et al. 2010. Viable Real-Time PCR in Environmental Samples: Can All Data Be Interpreted Directly? *Microbial Ecology*, 61(6), pp. 7-12.

Fonseca, D., Mateus, H., Contreras, N., 2010. *Prácticas de laboratorio de biología molecular: su aplicación en genética básica*. Bogotá: Universidad Rosario, pp. 59-65.

Forbes B.A., et al. 2009. *Diagnóstico microbiológico*. 12°. Madrid: Médica Panamericana, P.141.

García, T., Tabasco, R., Peláez, C., Requena, T., 2009. Simultaneous detection and enumeration of viable lactic acid bacteria and bifidobacteria in fermented milk by using PMA in qPCR. *International Dairy Journal*, 19, pp. 405-409.

García, V., 2004. *Introducción a la microbiología*. 2°. San José: ENUED, pp. 60-62.

Giles-Gómez, M., 2010. *Extracción de ADN*. Diapositivas de la materia de Técnicas Avanzadas de Microbiología.

Instituto Peruano de Biología Molecular, 2006. *PCR en Tiempo Real*. [En línea] (Actualizado al 15 de marzo de 2006). www.inen.sld.pe/genetica/eventos/Invitacion-PCR-RT.pps. [Último acceso el 30 de septiembre del 2010].

Hein, I., Schneeweiss, W., Stanek, C., Wagner, M., 2007. Ethidium monoazide and propidium monoazide for elimination of unspecific DNA background in quantitative universal real-time PCR. *Journal of Microbiological Methods*, 71, pp. 336-339.

Hernández, A., Alfaro, I., Arrieta R., 2003. *Microbiología Industrial*. Distrito Federal: EUNED, pp. 66-74.

Hitchener, B.J., Egan, A.F., 1977. Outer-membrane damage in sublethally heated *Escherichia coli* K-12. *Canadian Journal of Microbiology*, 23(3), pp. 311–318.

Hurst, A., Hughes, A., Collins-Thompson, D.L., Shah, B.G., 1974. Relationship between loss of magnesium and loss of salt tolerance after sublethal heating of *Staphylococcus aureus*. *Canadian Journal of Microbiology*, 20, pp.1153–1158.

Isolauri, E. 1991. A human *Lactobacillus* strain (*Lactobacillus casei* strain GG) promotes recovery from acute diarrhea in children. *Pediatrics*, 88(1), pp. 90-97.

Kullen, M., Klaenhammer, T.R., 1999. Identification of the pH-inducible, protontranslocating F1F0-ATPase operon of *Lactobacillus acidophilus* by differential display: gene structure, cloning and characterization. *Molecular Microbiology*, 33, pp. 1152–1161.

Lallemand Health Ingredients, 2011. *Available Products*. [En línea] (Actualizado al 11 de abril de 2011). Disponible en: <http://www.lallemandhi.com/index.php?ID=79> [Último acceso el 9 de septiembre del 2010].

Lizcano, F., 2005. *Fundamentos moleculares en medicina*. Buenos Aires: Universidad de la Sabana, pp. 317-319.

López, A., García, M., Quintero, A., 2002. *Bioteología alimentaria*. 5°. Distrito Federal: Limusa, pp. 163-174.

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

Mancilla-Arellano, M.L., 2011. Formulación y determinación de la vida de anaquel de un yogurt funcional. *Tesis profesional*. UNAM, Facultad de Química. México D.F.

Martínez-Vázquez, R., 2005. Probióticos en leches fermentadas. *Tesis profesional*. UNAM, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. México D.F.

Microbial S.L., 2009. *Sistemas de detección de patógenos por PCR tiempo real*. [En línea] (Actualizado al 16 de septiembre de 2009). http://www.microbialsystems.com/web/docs/Guia_interpretacion_resultados_SPAv2.pdf. [Último acceso el 27 de junio del 2011].

National Center for Biotechnology Information, 2011. *BLAST*. [En línea] (Actualizado al 22 de mayo de 2011). Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. [Último acceso el 5 de julio del 2010].

Newsletter Microbial, 2009. *La extracción y purificación del ADN para el análisis por PCR. Mitos y realidades*. [En línea] (Actualizado al 2 de marzo de 2009). Disponible en: http://www.microbialsystems.com/web/docs/Newsletter_Microbial_03.pdf. [Último acceso el 6 de junio del 2011].

Ng, E.W., Yeung, M., Tong, P.S., 2010. Effects of yogurt starter cultures on the survival of *Lactobacillus acidophilus*. *International Journal of Food Microbiology*, 145, pp. 169-175.

Nocker, A., Cheung, C., Camper, A.K. 2006. Comparison of propidium monoazide with ethidium monoazide for differentiation of live vs. dead bacteria by selective removal of DNA from dead cells. *Journal of Microbiological Methods*, 67, pp. 310-320.

Nocker, A. Sossa, K. E., Camper A. K. 2007. Molecular monitoring of disinfection efficacy using propidium monoazide in combination with quantitative PCR. *Journal of Microbial Methods*, 70, pp. 252-260.

Nocker, A., Mazza, A., Masson L., Camper, A.K, Brousseau, R., 2009. Selective detection of live bacteria combining propidium monoazide sample treatment with microarray technology. *Journal of Microbial Methods*, 76, pp. 253-261.

Pérez, F., Zamora, S., 2002. *Nutrición y alimentación humana*. Distrito Federal: Aula de mayores, p. 133.

Rådström, P., Knutsson, R., Wolffs, P., Lövenklev, M., Löfström, C., 2004. Pre-PCR processing: Strategies to generate PCR-compatible samples. *Molecular Biotechnology*, 26, pp. 133–46.

Revista NEO, 2010. *Top 10 Sergio Fuster: Danone*. [En línea] (Actualizado al 06 de septiembre de 2010). Disponible en: <http://www.terra.com.mx/revistaneo/articulo/954283/MKTG+TOP+10+++SERGIO+FUSTER+DANONE.htm>. [Último acceso el 18 de septiembre del 2010].

Rius, N., Solé, M., Francia, A., Lorén, J.-G., 1994. Buffering capacity and membrane H⁺ conductance of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 120, pp. 291–296.

Roos, R., Preedy, V.R., 2010, *Bioactive foods in promoting health: Probiotics and Prebiotics*. London: Academic Press, pp. 385-387.

Russell, A.D., Harries, D., 1967. Some aspects of thermal injury in *Escherichia coli*. *Applied Microbiology*, 15, pp. 407–410.

Saarela, M., Gunnar, M., Rangne, F., Mättö, J., Mattila, T., 2000. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *Journal of Biotechnology*, 84, pp. 197-215.

Tabasco, R., Paarup, T., Peláez C., Requena T., 2007. *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus*, *L.acidophilus*, *L. paracasei* subsp. *paracasei* and *Bifidobacterium lactis* in fermented milk. *International Dairy Journal*, 17, pp. 1107-1114.

Tortora, G., Funke, R., Case, C.L., 2007. *Introducción a la microbiología*. 9°. Distrito Federal:Médica Panamericana, pp. 178-179 y 257-260.

Tsuchido, T., Katsui, N., Takeuchi, A., Takano, M., Shibasaki, I., 1985. Destruction of the outer membrane permeability barrier of *Escherichia coli* by heat treatment. *Applied and Environmental Microbiology*, 50, pp. 298–303.

Varma, M., Field, R., Stinson, M., Rukovests, B., Wymer, L., Haugland, R., 2009. Quantitative real-time PCR analysis of total and propidium monoazide-resistant fecal indicator bacteria in wastewater. *Water Research*, 43, pp. 4790-4801.

Vesper, S., McKinstry, C., Hartmann, C., Neace, M., Yoder, S., Vesper, A., 2008. Quantifying fungal viability in air and water samples using quantitative PCR after treatment with propidium monoazide (PMA). *Journal of Microbiological Methods*, 72, pp. 180-184.

Walstra, P., 2001. *Ciencia de la leche y tecnología de los productos lácteos*. Zaragoza: Acribia, pp. 523, 543.

Wher H.M., Frank, J.F., 2004. *Standar Methods for Examination of Dairy Products*. 17°. Washintong: American Public Health Association, P. 263.

Yi-Ting, K., Yu-Shan, L., Shyu, Y.T., 2007. Identification of *Lactobacillus* spp. In probiotic products by real-time PCR and melting curve analysis. *Food Research International*, 40, pp. 71-79.

Zabala, J.C., 2005. *Manual de Técnicas Básicas de Biología Molecular*. Mérida: Universidad Autónoma de Yucatán, pp. 317 a 319.