



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

“Identificar la presencia del género *Lactobacillus spp* en yogurts comerciales, mediante la aplicación de la técnica de PCR directo”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

INGENIERA EN ALIMENTOS

PRESENTA:

RUBIO VÁZQUEZ ANA LAURA

ASESOR: Dr. José Francisco Montiel Sosa

COASESOR: M.C. Josefina Moreno Lara

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO, 2015.



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

**INGENIERIA EN ALIMENTOS**  
**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN**  
**UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR**  
**DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES**

U. N. A. M.  
FACULTAD DE ESTUDIOS  
SUPERIORES CUAUTITLÁN  
**ASUNTO: VOTO APROBATORIO**

**M. en C. JORGE ALFREDO CUELLAR ORDAZ**  
**DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN**  
**PRESENTE**

**ATN: M. EN A. ISMAEL HERNÁNDEZ MAURICIO**  
**Jefe del Departamento de Exámenes**  
**Profesionales de la FES Cuautitlán.**

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos a comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

**Identificar la presencia del género Lactobacillus spp en yogurts comerciales, mediante la aplicación de la técnica de PCR directo**

Que presenta la pasante: Ana Laura Rubio Vázquez  
Con número de cuenta: 408074902 para obtener el Título de: Ingeniera en Alimentos

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

**ATENTAMENTE**  
**"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"**  
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 13 de mayo de 2014.

**PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO**

	NOMBRE	FIRMA
<b>PRESIDENTE</b>	Dr. José Francisco Montiel Sosa	
<b>VOCAL</b>	M. en C. Tais Nopal Guerrero	
<b>SECRETARIO</b>	I.A. Miriam Álvarez Velasco	
<b>1er. SUPLENTE</b>	M. en C. Julieta González Sánchez	
<b>2do. SUPLENTE</b>	I.Q. Daniel Mauricio Vicuña Gómez	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

HMI/iac



## AGRADECIMIENTOS

### Papá y Mamá:

*Con todo mi cariño y mi amor para las personas que hicieron todo en la vida para que yo pudiera lograr mis sueños, por motivarme a ser mejor y darme la mano cuando sentía que el camino se terminaba, jamás podré recompensar tanto amor, tanta fé y tanta confianza que han depositado en mi, a ustedes por siempre mi corazón y mi infinito agradecimiento*

### Hermana:

*Aunque en la mayoría de las veces parece que estuviéramos en una batalla, hay momentos en los que la guerra cesa y nos unimos para lograr nuestros objetivos. Gracias por no solo ayudarme en gran manera a concluir el desarrollo de esta tesis, sino por todos los bonitos momentos que pasamos en el proceso.*

### Profesores:

*A mis maestros que en este andar por la vida, influyeron con sus lecciones y experiencias en formarme como una persona de bien y preparada para los retos que pone la vida, a todos y cada uno de ellos les dedico cada una de estas paginas, en especial al Dr. Montiel y a la Profesora Josefina por la confianza, paciencia, tiempo y apoyo en la realización de este trabajo.*

*Gracias a todas y cada una de las personas que son y han sido parte importante en mi vida, que siempre estuvieron listas para brindarme toda su ayuda, gracias por compartir tan maravillosa experiencia, gracias por permitirme tener la fortuna de haberlos conocido e indudablemente han dejado una huella increíble en mi vida...Con todo mi cariño esta tesis se las dedico a ustedes:*



## ÍNDICE GENERAL

Índice General	4
Índice de figuras	6
Índice de Tablas	7
Resumen	8
Introducción	9
Justificación	10
<b>Capítulo 1. Antecedentes</b>	<b>11</b>
1.1. Importancia y generalidades de productos probióticos	11
1.1.1. Definición de microorganismos probióticos	12
1.1.2. Definición de alimentos probióticos	13
1.1.3. Características de alimentos	14
1.1.4. Tipos de Probióticos	14
1.1.5. Microorganismos empleados como probióticos	15
1.1.6. Mecanismos de acción	17
1.1.7. Beneficios para la salud	17
1.2. Generalidades: Yogur, procesamiento y bacterias lácticas	18
1.2.1. Productos ácido lácticos	18
1.2.2. BACTERIAS ACIDOLÁCTICAS: <i>Lactobacillus acidophilus</i> y <i>Lactobacillus bulgaricus</i>	18
1.2.2.1. <i>Lactobacillus</i> : ORIGEN	19
1.2.2.2. El género <i>Lactobacillus</i>	20
1.2.2.3. Especies de <i>Lactobacillus</i>	22
1.2.2.4. Características morfológicas	22
1.2.2.5. Condiciones para su desarrollo	25
1.2.2.6. Metabolismo de las bacterias lácticas	27
1.2.2.7. <i>Lactobacillus acidophilus</i>	28
1.2.2.8. <i>Lactobacillus bulgaricus</i>	29
1.2.3. Necesidades generales de la producción de leches acidificadas	32
1.2.4. Yogurt y tipos de yogurt	33
1.2.5. Composición química del yogurt	36
1.2.6. Factores que afectan la calidad del yogurt	37
1.2.6.1. Elección de la leche	37
1.2.6.2. Normalización de la leche	37
1.2.6.3. Aditivos en la leche	38
1.2.6.4. Desaireación	39
1.2.6.5. Homogeneización	40
1.2.6.6. Tratamiento térmico	41
1.2.6.7. Elección del fermento	42
1.2.6.8. Preparación del cultivo	42
1.2.6.9. Composición del cultivo	42
1.2.7. Diagrama de proceso de elaboración del yogurt	44
1.2.7.1. Descripción del diagrama de Proceso de yogurt	45
1.3 Fermentación láctica	49
1.3.1. Fermentaciones	49



1.3.2. Beneficios de la fermentación	50
1.3.3. Producción del ácido láctico	50
1.3.4. Producción de los compuestos responsables del sabor	52
1.3.5. Rutas metabólicas y reacciones iniciadas por <i>Streptococcus thermophilus</i> y <i>Lactobacillus bulgaricus</i>	54
1.3.6. Metabolismo proteico	54
1.3.7. Péptido hidrolasas de los microorganismos del yogurt	55
1.3.8. Productos de la proteólisis	57
1.3.9. Liberación de aminoácidos	57
1.3.10. Compuestos nitrogenados solubles	57
1.3.11. Liberación de aminoácidos	57
1.3.12. Condiciones de almacenamiento	57
1.3.13. Concentración del ácido láctico	57
1.3.14. Metabolismo lipídico	58
1.3.15. Contenido en grasa del yogurt	58
1.4. Especificaciones, garantía de la calidad y cuestiones de reglamentación relativas a los productos probióticos	59
1.4.1. La legislación vigente de productos probióticos	61
1.4.2. La situación en la unión europea	61
1.4.3. La situación en Japón	62
1.4.4. La situación en estados unidos	63
1.4.5. La situación en América latina	64
1.4.6. Etiquetado apropiado	64
1.4.7. Procedimientos de fabricación y manipulación	65
1.4.8. El mercado de los alimentos funcionales	67
1.5. Métodos para la autenticación de alimentos.	70
1.5.1. Historia y desarrollo	70
1.5.2. Reacción de la cadena de la polimerasa (PCR)	72
1.5.3. Fundamento de PCR	73
1.5.4. Elementos que conforman la PCR primers:	73
1.5.5. Cálculo de la temperatura de fusión (TM)	76
1.5.6. Programas de diseño de primers	77
1.5.7. Etapas de la PCR	81
1.5.8. Funcionamiento de la PCR	83
1.5.9. Naturaleza exponencial de los ciclos	85
1.5.10. Ventajas y desventajas de la PCR	86
1.5.11. Aplicaciones de la PCR en trazabilidad alimentaria	86
<b>Capítulo 2. Metodología experimental</b>	<b>88</b>
2.1. Materiales, equipos, reactivos	90
2.2. Métodos	92
<b>CAPÍTULO 3: Resultados</b>	<b>102</b>
Conclusiones	110
Referencias	112

**ÍNDICE DE FIGURAS**

Figura 1	Yogurt firme	34
Figura 2	Yogurt batido	34
Figura 3	Yogurt Para beber	35
Figura 4	Yogurt Congelado	35
Figura 5	Yogurt Concentrado	35
Figura 6	Porcentaje de alimentos funcionales lanzados al mercado por categoría durante el período 2004 – 2007	69
Figura 7	Bases nitrogenadas. Estos componentes de los nucleótidos son la clave de la especificidad del apareo de las cadenas del ADN, apareándose siempre una purina con una pirimidina	80
Figura 8	Desnaturalización del ADN. Los puentes se rompen dejando al ADN en forma de cadena sencilla, permitiendo así exponer las diferentes bases nitrogenadas para la hibridación con los oligonucleótidos cebadores	81
Figura 9	Inicio de la reacción de la PCR. Los cebadores complementarios que flaquean al sitio a amplificar se enlazan formando puentes de hidrógeno. De esta manera la polimerasa puede comenzar a extenderlos para copiar ambas hebras molde	82
Figura 10	. Progreso de la reacción de la PCR. A la temperatura óptima de la ADN polimerasa Taq (72°C), la enzima agrega los dNTPs a partir del 5' hasta el extremo 3'	83
Figura 11	Funcionamiento de PCR	84
Figura 12	Conclusión de la PCR. Teóricamente entre más ciclos de reacción integren el programa de amplificación, más productos idénticos se generarán. Pero al aumentar los ciclos también se aumenta proporcionalmente la posibilidad de agregar errores en las nuevas secuencias	85
Figura 13	Técnicas de aislamiento de m.o	94
Figura 14	Pasos para una tinción de gram	95
Figura 15	Primers universales	102
Figura 16	Cepas y cuenta colonias	103
Figura 17	Gram Lactobacillus	103
Figura 18	Detección de controles positivos a partir de primers seleccionados a partir de un programa bioinformático, en un gel de agarosa al 2%. (PM) marcador de peso molecular 1kb	106
Figura 19	Identificación de 5 variedades de yogur comerciales a partir de los primers seleccionados, en un gel de agarosa al 2%. (PM) marcador de peso molecular 1kb	107
Figura 20	Identificación de 5 variedades de yogur comerciales a partir de los primers seleccionados, en un gel de agarosa al 2%. (PM) marcador de peso molecular 1kb	108



## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Microorganismos usados como probióticos	15
Tabla 2	Productos tradicionales y otros más modernos con cepas probióticas	17
Tabla 3	Principales mecanismos de acción propuestos de los probióticos	17
Tabla 4	Principales microorganismo probióticos y algunos de sus efectos beneficiosos para la salud	17
Tabla 5	Clasificación científica de <i>Lactobacillus</i>	20
Tabla 6	Características del género <i>Lactobacillus</i>	24
Tabla 7	Análisis químico proximal de yogurt con frutas	36
Tabla 8	Influencia de la homogenización y el tratamiento térmico sobre la viscosidad de una leche acidificada.	41
Tabla 9	Producción de compuestos carbonilo (ppm) por cultivos estárter del yogurt	52
Tabla 10	Posible origen de los compuestos responsables del aroma producidos por <i>S. thermophilus</i> y <i>L. bulgaricus</i> durante la producción de yogurt	54
Tabla 11	Mercado de Alimentos Funcionales (US\$ millones) en Estados Unidos, Europa y Asia Pacífico 2007 – 2012	68
Tabla 12	Características de la PCR	74
Tabla 13	Características de algunas polimerasas termoestables de DNA	78
Tabla 14	Muestras de productos comerciales procesadas a base de leche	90
Tabla 15	Oligonucleótidos utilizados como primers para la PCR	91
Tabla 16	Materiales, equipo y reactivos utilizados durante la experimentación	91
Tabla 17	Oligonucleótidos utilizados como primers	92
Tabla 18	Componentes de la PCR	99
Tabla 19	Etapas y condiciones programadas en el termociclador para lactobacillus	100
Tabla 20	Características morfológicas de las bacterias lacticas	104
Tabla 21	Controles positivos y valores de concentración aproximada a 60 ng/ $\mu$ l.	104





## RESUMEN

Los probióticos son microorganismos vivos que cuando se administran en cantidades adecuadas confieren en beneficio a la salud del hospedador. El presente trabajo se realizó con la finalidad de detectar la presencia de *Lactobacillus* (*Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus bulgaricus*) en productos lácteos que reportan en su etiquetado la presencia de cada uno de ellos, ya que las bacterias ácido lácticas son esenciales en la industria láctea, donde son utilizados en la elaboración de quesos, yogurt y otros productos fermentados. Como algunas bacterias lácticas tienen necesidades de crecimiento nutricionales similares y, a menudo es difícil de usar métodos microbiológicos clásicos para identificar a nivel de género. Nuestra investigación se enfoca en la aplicación de técnicas de biología molecular para la rápida identificación y detección. Al alcanzar este objetivo se recurrió a la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando primers específicos que codifican ácido ribonucleico ribosómico (rRNA) debido a la alta variabilidad entre esta región de secuencias de ADNr que codifican para los 16 y los 23 s rRNA.

Así mismo se utilizó un kit de PCR directo para 10 muestras de yogurt comerciales lo cual significo ahorros económicos significativos así como disminución en tiempos de experimentación. El objeto de este trabajo fue encontrar la presencia de *Lactobacillus* en diferentes marcas comerciales de yogurt, los resultados obtenidos fueron la presencia de ambas especies de *Lactobacillus*, sin embargo se detectaron dobles bandas en cada una de ellas debido a que ambas especies pueden amplificar en las dos regiones del genoma, Por otra parte, se observo que otras especies de *Lactoballicus* se encuentran presenten en los diversos yogurts estudiados.



## INTRODUCCIÓN

En los últimos años, ha aumentado el interés en el desarrollo y la producción de nuevos alimentos que contienen microorganismo probióticos debido a sus aportes a la salud humana. (Kourkoutas et al., 1988). La calidad de los productos que contienen las bacterias lácticas es variable, depende de las condiciones de preparación, estándares de almacenamiento y la manipulación de los consumidores (Özen, et al., 1992). Las bacterias lácticas (LAB) se utilizan ampliamente en la industria alimentaria, las cuales contribuyen significativamente a la salud y a la nutrición humana, Las bacterias lácticas están involucradas en los grandes procesos de fermentación para la preservación y transformación de muchas materias primas alimentarias como el yogurt (Chavan and Kadam, 1989). Las especies de *Lactobacillus spp* son esenciales para la industria láctea donde se utilizan en la preparación de yogurt y otros lácteos fermentados, estas bacterias lácticas son beneficiosas para el tracto intestinal ya que refuerzan la respuesta inmune. Recientemente se han desarrollado muchos productos funcionales usando bacterias lácticas. Entre estas bacterias lácticas, los *Lactobacillus spp* se utilizan con frecuencia para productos probióticos (Hamilton-Miller, 2002). La verificación de la presencia de las bacterias lácticas en yogurt es un tema importante para la evaluación de la calidad y la confirmación del carácter probiótico del producto. Además, el etiquetado debe ser preciso y claro en lo que respecta al contenido de estos *Lactobacillus spp* en los productos lácteos fundamentalmente para las personas que los consumen. Sin embargo, las bacterias lácticas tienen los mismos requerimientos nutricionales y de crecimiento, lo que dificulta su identificación por métodos microbiológicos convencionales y bioquímicos, estos son laboriosos, consumen mucho tiempo y muestran menos sensibilidad. (Mohania et al., 2008).



## JUSTIFICACIÓN

En los últimos años, la preocupación de los consumidores respecto a la calidad de los alimentos que consume, ha dado lugar a la adopción de medidas por parte de las administraciones en lo que a materia de legislación se refiere para garantizar un etiquetado completo y veraz de los alimentos. Este hecho ha motivado la aparición de numerosos laboratorios que utilizan técnicas moleculares para controlar la calidad de los alimentos. La utilización de éste tipo de técnicas es especialmente útil para detectar fraudes alimentarios, ya que suele comercializarse una especie por otra similar, generalmente de menor valor económico.

En la actualidad la industria alimenticia cuenta con una amplia variedad de productos cuyo etiquetado no cuenta con la información completa que permita identificar su composición. Para el caso de los yogurts comerciales que reportan adición de microorganismos probióticos es importante poder corroborar la presencia de los mismos, razón por la cual los ingenieros en alimentos buscan mejoras en la calidad nutrimental del ser humano; es por esto que nos enfocamos al desarrollo de una técnica que permita identificar este tipo de microorganismos y determinar la presencia de los mismos en el producto.

Con el fin de identificar las bacterias lácticas, en este se objetivo evaluará la presencia del género *Lactobacillus spp* en yogurts comerciales, mediante la aplicación de la técnica de PCR directa.



## CAPITULO 1. ANTECEDENTES

### 1.1. Importancia y generalidades de productos probióticos

#### *Historia*

Hipócrates (460 a.c- 377 a.c), el médico griego considerado como el creador de la verdadera Medicina, decía: "Haz que tus alimentos sean tus medicinas y que tus medicinas sean tus alimentos"(Farid, 2003).

La observación original de la función positiva desempeñada por algunas bacterias se atribuye a Eli Metchnikoff (1907), ruso galardonado con el premio Nobel por sus trabajos en el Instituto Pasteur a comienzos del siglo pasado, que afirmó que "la dependencia de los microbios intestinales con respecto a los alimentos hace posible adoptar medidas para modificar la flora de nuestro organismo y sustituir los microbios nocivos por microbios útiles".

El *Bifidobacterium* fue descubierto en 1899 - 1900 por el doctor Tissier, del Instituto Pasteur de Francia. (Jayamanne, 2006). Para entonces el pediatra francés Henry Tissier observó que los niños con diarrea tenían en sus heces un escaso número de bacterias caracterizadas por una morfología peculiar en forma de Y. Estas bacterias "bífidas" eran, por el contrario, abundantes en los niños sanos (Tissier, 1906). Sugirió la posibilidad de administrar estas bacterias a pacientes con diarrea para facilitar el restablecimiento de una flora intestinal sana. Las obras de Metchnikoff y Tissier fueron las primeras en las que se hicieron propuestas científicas con respecto a la utilización probiótica de bacterias, aun cuando la palabra "probiótico" no se acuñó hasta 1960, para designar las sustancias producidas por microorganismos que promovían el crecimiento de otros microorganismos. En 1965 Lilly y Stillwell utilizaron por primera vez el término de probiótico, para nombrar a los productos de la fermentación gástrica. Esta palabra se deriva de dos vocablos, del latín -pro- que significa por o en favor de, y del griego - bios - que quiere decir vida. (Cruz, 2005).



Las observaciones de Metchnikoff y Tissier resultaron tan atractivas que, inmediatamente después, sus obras científicas fueron objeto de explotación comercial. Lamentablemente, los resultados no siempre fueron positivos y la mayoría de esas observaciones tuvieron un carácter anecdótico. Por consiguiente se consideró que el concepto de probiótico no estaba demostrado científicamente y durante decenios recibió escasa atención, aparte de algunas investigaciones sobre piensos encaminadas a encontrar sucedáneos saludables para los agentes promotores del crecimiento. Sin embargo, en los últimos 20 años la investigación sobre los probióticos ha progresado considerablemente y se han realizado avances notables en la selección y caracterización de cultivos de probióticos concretos y la justificación de las declaraciones de propiedades saludables en relación con su consumo (Farid, 2003).

### **1.1.1. Definición de microorganismos probióticos**

Es una palabra de origen griego que significa "a favor de la vida". De acuerdo a la definición adoptada por la FAO/WHO, los probióticos son "microorganismos vivos los cuales, al ser administrados en cantidades adecuadas, confieren efectos benéficos en la salud del huésped". Son considerados reguladores biológicos. También incluye una definición de género, especie y cepa, tanto como estudios de seguridad y eficacia en humanos (Madsen, 2001).

Fuller (1989), con objeto de recalcar el carácter microbiano de los probióticos, definió de nuevo el término como "un suplemento dietético a base de microbios vivos que afecta beneficiosamente al animal huésped mejorando su equilibrio intestinal".

Según el ISAPP\* (Asociación Científica Internacional para Probióticos y Prebióticos) la definición de Fuller sigue siendo aplicable dentro de las comunidades científicas, industriales y reguladoras pero deja lugar a malas interpretaciones (como por ejemplo usar el término para componentes bacterianos, bacterias muertas, o bacterias con efectos no caracterizados para la salud) (Madsen, 2001).



En 1998 el ILSI (International Life Science Institute, de la Unión Europea) en Bruselas definió a los Probióticos como microorganismos vivos, que cuando son ingeridos en cantidades suficientes, tienen efectos beneficiosos sobre la salud, lo que va más allá de los efectos nutricionales convencionales. Afectan beneficiosamente a una o varias funciones del organismo. Proporcionan un mejor estado de salud y bienestar y/o reducen el riesgo de enfermedad. Pueden ser funcionales para la población en general o para grupos particulares de la misma (Czeurecka, 2000). Hay que mencionar que, para ser considerada como Probiótica, una bacteria tiene que sobrevivir al medio fuertemente ácido del estómago y colonizar el intestino delgado y grueso (Madsen, 2001).

### **1.1.2. Definición de alimentos probióticos**

El término probiótico actualmente se utiliza para designar las bacterias que tienen efectos beneficiosos para los seres humanos y los animales. Los alimentos que contienen microorganismos probióticos en número suficiente para alterar o modificar la flora intestinal y así ejercer efectos beneficiosos para la salud. Son productos alimenticios que, además de su valor nutritivo intrínseco, ayudan a mantener el estado de salud general del organismo y a la vez pueden tener un efecto benéfico adicional, terapéutico o preventivo en el huésped (Czeurecka, 2000).

Una definición muy similar: "un monocultivo o cultivo mixto viable de bacterias que, cuando se aplica a animales o seres humanos, afecta beneficiosamente al huésped mejorando las propiedades de la flora autóctona". Una definición más reciente, aunque probablemente no será la última, es la siguiente: "microorganismos vivos que, cuando se consumen en cantidades apropiadas, confieren al huésped efectos saludables" (Havenaar y Huis in 't Veld 1992). Es evidente que estas definiciones:

- Han circunscrito la utilización del término probiótico a los productos que contienen microorganismos vivos.



- Indican la necesidad de proporcionar una dosis apropiada de bacterias probióticas para obtener los efectos deseados.

### 1.1.3. Características de alimentos probióticos

Los requisitos que deben cumplir los alimentos probióticos son:

Sinergismo entre los cultivos de microorganismos y los iniciadores de la fermentación (fermentos, cultivos iniciadores), para obtener un producto fermentado con óptimas características sensoriales. Los microorganismos probióticos deben permanecer viables y activos en el alimento y durante el tránsito gastrointestinal, para garantizar su potencial efecto benéfico en el huésped. En este aspecto, son importantes el pH derivado del proceso de fermentación, el oxígeno disuelto (especialmente para las bifidobacterias), el antagonismo entre especies, la composición química del medio de cultivo, la concentración de azúcares, las prácticas de inoculación del cultivo probiótico, la temperatura y duración de la fermentación, y las condiciones de almacenamiento del producto (Czeurecka, 2000).

### 1.1.4. Tipos de probióticos

**Probióticos Naturales:** Se encuentran en lácteos fermentados, como yogurt, leche y quesos, vegetales fermentados (aceitunas, chucrut, soya y cereales), carnes, pescados fermentados y bebidas alcohólicas artesanales. El problema de los probióticos naturales es que es difícil usarlos en condiciones terapéuticas y en entornos médicos, porque la mayoría de ellos necesita de condiciones de almacenamiento a bajas temperaturas y tienen una vida media, en buenas condiciones, limitada. Sin embargo, la principal limitante para su uso es que la cantidad de microorganismos que contienen es tan baja que habría que tomar varios litros de yogurt cada día, por ejemplo, para obtener algún efecto terapéutico. Entonces, estos productos pueden ser parte de una alimentación sana, pero no tienen eficacia terapéutica (Farid, 2003).



**Probióticos comercializados:** Son los probióticos naturales pero incorporados en algún producto alimenticio, por ejemplo yogurt en formato comercial, obtenido a partir de diferentes cepas de microorganismos, y algunas leches maternizadas (Farid, 2003).

**Suplementos alimenticios con probióticos:** Son microorganismos viables, en forma seca, incorporados en gránulos o cápsulas. Su distribución se rige por criterios de las leyes de alimentos, no de medicamentos (Farid, 2003).

**Agentes Psicoterapéuticos:** Son probióticos con efecto terapéutico comprobado. Se consideran medicamentos. Deben tener efectos terapéuticos inmediatos, ser resistentes a los antibióticos de uso común, impedir la adhesión de patógenos, presentar efectos de inmunomodulación, competencia con las toxinas por los receptores de éstas y competencia por los nutrientes (Farid, 2003).

#### 1.1.5. Microorganismos empleados como probióticos

Tabla 1. Microorganismos usados como probióticos

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

FUENTE: Guadalini, 2000.





La selección de una cepa como probiótico requiere que sus efectos fisiológicos beneficiosos sean demostrados científicamente, que la cepa sea de origen humano y segura para uso humano, que sea estable al ácido y la bilis, y que se adhiera a las células de la mucosa intestinal, así como también excluya o reduzca la presencia de agentes patógenos y colabore en la formación de una flora normal equilibrada. Entre los microorganismos comúnmente empleados como probióticos se encuentran las bacterias ácido-lácticas, que agrupan una gran cantidad de géneros que incluyen un considerable número de especies (Tabla 1) (Farid, 2003).

Una característica de los microorganismos considerados probióticos es que son bacterias aisladas del tracto intestinal de un individuo saludable e introducido nuevamente en el intestino, generalmente por medio de algún tipo de vehículo alimenticio. El tipo de vehículo más común es el de las leches fermentadas, como el popularmente conocido yogur, de textura cremosa característica y ligero sabor ácido. Otra leche fermentada tradicional es el kéfir, originario del Cáucaso, elaborado a partir de la leche fermentada con una mezcla compleja de bacterias y levaduras, de textura algo espesa, de sabor más o menos ácido y ligeramente efervescente como se muestra en la Tabla 2, (Guadalini, 2000).

En general, las leches fermentadas pueden ser el resultado de una fermentación desarrollada con un solo tipo de microorganismo probiótico y contener bacterias vivas y diversos compuestos generados durante la fermentación (Yakult®, LC1-go®), o bien contener bacterias vivas que son agregadas durante alguna etapa del proceso (Actimel®). Existen también presentaciones comerciales con una mezcla de microorganismos probióticos (Protexin®, Nature Sunshine®) (Jayamanne, 2006).



Tabla 2. Productos tradicionales y otros más modernos con cepas probióticas

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

FUENTE: Guadalini, 2000.

### 1.1.6. Mecanismos de acción

Diversas pruebas realizadas con animales y estudios in vitro han demostrado que las cepas probióticas ejercen una acción protectora contra la adherencia, la colonización, la reproducción y la acción patógena de agentes enteropatógenos específicos mediante distintos mecanismos de acción que aún no han sido completamente esclarecidos. No obstante, entre los mecanismos más significativos (Tabla 3) (Brook, 1999), que se han propuesto destaca la privación a los agentes patógenos de los nutrientes específicos. Los nutrientes están presentes en cantidad limitada en el intestino; si las bacterias beneficiosas consumen estos nutrientes necesarios para el desarrollo de agentes patógenos, limitan así su proliferación (Fons, 2000; Rao Pulsani, 1981).



Tabla 3. Principales mecanismos de acción propuestos de los probióticos

Acción	Mecanismo	Ejemplo
Prevención de la colonización por microorganismos patógenos	Bloqueo de receptores específicos (adherencia) y competencia por nutrientes.	<i>L. rhamnosus</i> GG, <i>L. plantarum</i> , <i>S. boulardii</i>
Actividad microbiana	Producción de sustancias con acción antimicrobiana ( $H_2O_2$ , bacteriocinas, ácidos grasos)	<i>L. rhamnosus</i> GG, <i>S. boulardii</i>
Inmunomoduladora	Regulación de la respuesta inmunitaria humoral y celular.	<i>L. rhamnosus</i> GG, <i>L. acidophilus</i> , <i>Bifidobacterium</i> spp., <i>L. reuteri</i>
Actividad enzimática	Disminución en la actividad de enzimas asociadas con la síntesis de lactosas, procarcinógenos, etc.	<i>S. thermophilus</i> , <i>Lactobacillus</i> spp., <i>Bifidobacterium</i> spp.

FUENTE: Brook, 1999

También pueden llegar a producir una disminución en la actividad enzimática en la concentración de lactosa en la leche fermentada por la actividad de la lactasa bacteriana durante la fermentación. Los microorganismos probióticos compiten con los patógenos no sólo por los nutrientes sino también por el espacio físico (Famuralo, 1999).

Algunas bacterias pueden inhibir la adherencia de los agentes patógenos a los sitios receptores por un mecanismo de obstrucción estérica o de bloqueo específico del receptor, con lo que se produce una prevención de la colonización de microorganismos patógenos por inhibición competitiva en los lugares de adhesión. Estos mecanismos han sido estudiados en un modelo que recurre al cultivo de células intestinales humanas (Chauvière, 1992).

Por otro lado, los probióticos producen numerosas sustancias antimicrobianas específicas, como las bacteriocinas, ácidos grasos volátiles de cadena corta, peróxido de hidrógeno y ácido láctico (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*), por lo que se reduce el pH luminal (Fons, 2000; Rao Pulsani, 1981).



Se considera el principal mecanismo por el cual las bacterias lácticas inhiben el crecimiento de diferentes bacterias patógenas como *E. coli*, *Streptococcus* y *Salmonella* (Madsen, 2001).

Un reciente estudio *in vitro* ha demostrado que algunos probióticos producen metabolitos que modifican directamente la permeabilidad epitelial y refuerzan la integridad de la barrera (Madsen, 2001).

Otros estudios, tanto *in vitro* como *in vivo*, han mostrado este mecanismo y refuerzan la hipótesis de que los probióticos pueden restaurar una permeabilidad epitelial perturbada y fortalecer la barrera intestinal (Czeurecka, 2000).

Meydani y colaboradores (2000) realizaron estudios en animales y en humanos, indicando que las bacterias lácticas influyen en la modulación inmunitaria, y a su vez incrementan la resistencia del organismo a las enfermedades del sistema inmunitario.

En los estudios llevados a cabo en seres humanos, la producción de citocina, la actividad fagocítica, la producción de anticuerpos y de células NK aumentan con el consumo de yogur (Links, 1994). También se ha demostrado que los probióticos son capaces de regular la proliferación de linfocitos *in vitro* (Nagafuchi y col., 1999). Al igual que la producción de anticuerpos específicos (Marteau, 1997) y no específicos, tanto en humanos como en ratones (Vitini y col., 2006).

Los estudios *in vitro* muestran que los probióticos también fortalecen la producción de citocina (Pessi et al., 2000). Aunque todavía no se sabe con exactitud el mecanismo antitumoral de los probióticos, algunos estudios (Pessi et al., 2000) han demostrado la capacidad de cepas probióticas de producir una disminución en las actividades enzimáticas de la  $\beta$ -glucuronidasa y la  $\beta$ -glucosidasa, asociadas con la síntesis de procarcinógenos (Spanhaak et al, 1998).



### 1.1.7 Beneficios para la salud

Al uso de probióticos se le atribuyen numerosos efectos saludables, y son muchos los trabajos que demuestran los beneficios de éstos para la salud humana (Tabla 4) (Chandan, 1999). La utilización de Probióticos se recomienda a cualquier persona que quiera favorecer el equilibrio de la flora intestinal (Takahashi et al., 1993). Los alimentos funcionales elaborados con Probióticos deben contener por lo menos 10 millones de células viables por cada 100 ml, dosis ideal para lograr los efectos deseados y aumentar las defensas naturales, sin embargo la dosis dependerá del microorganismo utilizado, de la forma de consumo y del efecto que se desee obtener (Takahashi et al., 1993).

Tabla 4. Principales microorganismo probióticos y algunos de sus efectos beneficiosos para la salud.

Microorganismo	Efecto Beneficioso
<i>L. acidophilus</i> LC1	Equilibrio flora intestinal, efecto en sistema inmunitario.
<i>L. acidophilus</i> NCFCO1748	Reducción actividad enzimas procancerígenas, diarrea y constipación.
<i>L. acidophilus</i> NCFM	Reducción actividad enzimas procancerígenas.
<i>L. jonsonni</i> LA1	Inmunoestimulador, tratamiento de gastritis y úlceras.
<i>L. rhamnosus</i> GG	Inmunoestimulador, diarrea, inflamación del intestino.
<i>L. Bulgaricus</i>	Inmunoestimulador, absorción de lactosa.
<i>L. casei</i>	Promotor del crecimiento y de la viabilidad de probióticos.
<i>B. bididum</i>	Diarrea por rotavirus, equilibrio de la microbiota.
<i>S. thermophilus</i>	Inmunoestimulador, absorción de lactosa.
<i>S. Boulardii</i>	Prevención de diarrea y tratamiento de colitis.

FUENTE: Saarela et al, 2000



## 1.2. GENERALIDADES: YOGUR, PROCESAMIENTO Y BACTERIAS LACTICAS

### 1.2.1. Productos ácido lácticos

Los productos lácteos preparados por medio de la fermentación del ácido láctico (yogurt) o una combinación de ésta y fermentación con levaduras (ejemplo kéfir) se denominan leches fermentadas o acidificadas (Muñoz, 2007).

Leche acidificada es el nombre del colectivo que incluye productos tales como el yogurt, ymer, kéfir, mazada acidificada, fimjöik (leche escandinava), nata acidificada y koumiss (un producto de leche de yegua). Este nombre genérico deriva del hecho de ser la leche prima que se inocula con un cultivo de fermentos que convierte parte de la lactosa en ácido láctico. En ese proceso de conversión se producen también otras sustancias tales como el anhídrido carbónico, ácido acético, diacetilo, acetaldehído, y algunas otras que dan a los distintos productos sus características de fresco sabor y aroma. Los microorganismos utilizados en la producción de kéfir y koumiss producen también alcohol etílico (Lopéz, 2003; Okonkwo y Kinsella, 1969).

Los productos lácteos acidificados proceden de oriente próximo y se hicieron muy populares en la Europa central y oriental. El primer ejemplo de leche acidificada fue presumiblemente producido de forma accidental por nómadas. La leche se volvía “ácida” y congelaba bajo la influencia de ciertos microorganismos. Por suerte, las bacterias eran del tipo acidófilo, no dañinas, en vez de ser organismos productores de sustancias tóxicas (Muñoz, 2007).

### 1.2.2. BACTERIAS ACIDOLÁCTICAS: *Lactobacillus acidpohillus* y *Lactobacillus bulgaricus*

Las bacterias acidolácticas se encuentran sobre las plantas en la naturaleza, pero algunas especies están en la leche en grandes cantidades. Otras se encuentran en los intestinos de los animales. El grupo incluye bacilos y cocos, que pueden formar cadenas de longitud variable pero que nunca dan lugar a esporas. Las bacterias ácidolácticas son anaerobias facultativas. La mayor parte de ellas



mueren por calentamiento a 70°C, aunque la temperatura letal para algunas es hasta 80°C. Las bacterias acidolácticas prefieren la lactosa como fuente de carbono (Muñoz, 2007).

La fermentan dando lugar a ácido láctico. La fermentación puede ser pura o impura, es decir, el producto final puede ser casi exclusivamente ácido láctico (fermentación homofermentativa), o bien otras sustancias pueden ser producidas, tales como el ácido láctico, anhídrido carbónico e hidrogeno (fermentación heterofermentativa) (López, 2003; Okonkwo y Kinsella, 1969).

### 1.2.2.1. *Lactobacillus*: ORIGEN

*Lactobacilo*, *Lactobacillus* o bacteria del ácido láctico es un género de bacterias Gram positivas anaerobias facultativas, denominadas así debido a que la mayoría de sus miembros convierte lactosa y otros monosacáridos en ácido láctico. La producción de ácido láctico hace que su ambiente sea ácido, lo cual inhibe el crecimiento de bacterias dañinas. Algunas especies de *Lactobacillus* son usadas industrialmente para la producción de yogurt y otros alimentos fermentados. (Takahashi et al., 1993). En la Tabla 5 se muestra una relación de las especies de *Lactobacilos* más comúnmente utilizadas como probióticos en humanos. En la actualidad una de las principales áreas de investigación en el género *Lactobacillus*, se basa en la comprobación de las propiedades probióticas que tienen muchos de sus miembros. El descubrimiento de nuevos probióticos o nuevas aplicaciones de los ya existentes, genera grandes expectativas para el desarrollo en campos como la nutrición, la salud y la industria alimentaria. (Takahashi et al. 1993).

Tabla 5. Clasificación científica de *Lactobacillus*

Domini o	Bacteria	Homofermentativo obligado	Heterofermentativo facultativo	Heterofermentativo obligado
Filo:	Firmicutes	<i>L. acidophilus</i>	<i>L. casei</i>	<i>L. fermentum</i>
Clase:	Bacilli	<i>L. crispatus</i>	<i>L. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>	<i>L. reuteri</i>
Orden:	<i>Lactobacillales</i>	<i>L. amylovorus</i>	<i>L. paracasei</i> subsp. <i>tolerans</i>	
Familia:	<i>Lactobacillaceae</i>	<i>L. gallinarum</i>	<i>L. plantarum</i>	
Género:	<i>Lactobacillus</i>	<i>L. gasseri</i>	<i>L. rhamnosus</i>	
		<i>L. johnsonii</i>		
		<i>L. helveticus</i>		
		<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>		
		<i>L. salivarius</i> subsp. <i>salivarius</i>		

**Fuente:** Takahashi et al. 1993.

#### 1.2.2.2. El género *Lactobacillus*

El género *Lactobacillus* está conformado por bacilos o cocobacilos Gram positivos, no formadores de esporas, estrictamente fermentativos, anaerobios facultativos, con importantes requerimientos nutricionales y un contenido de G+C en su DNA inferior al 50%. Beijerinck en 1901 propone el género *Lactobacillus* y Orlan-Jensen en 1919 hace una primera clasificación de este grupo basado en características morfológicas, de crecimiento y la utilización de algunos azúcares (Muñoz, 2007).

Con glucosa como fuente de carbono, los *Lactobacillus* pueden ser homofermentativos, cuando el producto final de su metabolismo es casi exclusivamente ácido láctico, o heterofermentativos cuando producen una mezcla de ácido láctico, CO<sub>2</sub>, etanol y/o ácido acético. Esta característica permitió a Kandler y Weiss en 1986 clasificar los *Lactobacillus* en tres grupos (Tabla 6):





1. **Grupo A:** homofermentativos obligados, solo pueden fermentar los azúcares por la vía de la glucólisis, poseen la enzima fructosa-1,6-difosfato aldolasa, pero carecen de fosfoacetolasa, por lo que no fermentan pentosas ni gluconato.
2. **Grupo B:** heterofermentativos facultativos, poseen tanto fructosa-1,6-bifosfato aldolasa como fosfoacetolasa.
3. **Grupo C:** heterofermentativos estrictos, solo pueden fermentar las hexosas por la vía de las pentosas fosfato, también denominada vía del fosfogluconato, debido a que carecen de fructosa-1,6-difosfato aldolasa.

En 1991 Collins y colaboradores, basándose en el análisis de las relaciones filogenéticas de acuerdo a la secuencia del gen que codifica para el 16S rRNA, forman tres subgrupos que no difieren mucho de la primera clasificación: grupo **a** de *Lactobacillus delbrueckii*; grupo **b** de *Lactobacillus casei- Pediococcus*; y grupo **c** de *Leuconostoc* (Takahashi et al., 1993)

La utilización de letras mayúsculas para asignar los grupos según las características fenotípicas y las letras minúsculas para los grupos filogenéticos se debe a Hammes and Vogel, que en 1995 propusieron una nomenclatura basada en la combinación de ambas propiedades (Takahashi et al., 1993).

Los *Lactobacillus* son habitantes normales del tracto gastrointestinal y mucosas de mamíferos y otros animales, también se encuentran en vegetales y en alimentos fermentados de origen animal y vegetal, en la industria alimentaria y desde tiempos antiguos los lactobacilos han sido utilizados para la elaboración y conservación de alimentos (Takahashi et al., 1993).

Se cree desde la antigüedad y actualmente se ha comprobado, que algunos *Lactobacillus* tienen propiedades beneficiosas para la salud resultado de su consumo y permanencia en el tracto gastrointestinal, en algunas cepas del género *Lactobacillus* se ha comprobado científicamente dichas propiedades beneficiosas (cepas probióticas).



### 1.2.2.3. Especies de *Lactobacillus*

*L. acidophilus*, *L. bulgaricus*, *L. casei*, *L. delbrueckii*, *L. fermentum*, *L. gasseri*, *L. johnsonii*, *L. lactis*, *L. paracasei*, *L. plantarum*, *L. reuteri*, *L. rhamnosus*, *L. salivarius* y *Rhamnossus*

### 1.2.2.4. Características morfológicas

Se caracteriza por presentar células en forma de bacilos largos y extendidos, aunque con frecuencia pueden observarse bacilos cortos o coco-bacilos corineformas (Kandler, 1983). La pared celular de los lactobacilos, observada al microscopio electrónico es típicamente Gram positiva y contiene peptidoglicanos (mureínas) de varios quimiotipos, de ahí que el peptidoglicano del tipo Lisina-D-Asparagina sea el más ampliamente distribuido. Esta pared también contiene polisacáridos unidos al peptidoglicano mediante enlaces fosfodiéster, pero sólo presenta ácidos teicoicos relacionados a ella en algunas especies (Knox y Wicken, 1973; citados por Bergey, 1992). También pueden apreciarse al microscopio electrónico grandes mesosomas que caracterizan a este género (Takahashi et al. 1993).

Las colonias de *Lactobacillus* en medios sólidos son pequeñas (2-5 mm), convexas, suaves, con márgenes enteros, opacas y sin pigmentos. Sólo en algunos casos presentan coloración amarillenta o rojiza (Takahashi et al. 1993).

Estos bacilos se presentan comúnmente formando cadenas y en general son no móviles, pero cuando tienen movilidad es por la presencia de flagelación peritrica. Son gram positivos y solo las células muertas pueden dar resultados variables a la tinción de gram. Además, no esporulan y algunas cepas presentan cuerpos bipolares que probablemente contengan polifosfato. Los grandes bacilos homofermentativos presentan gránulos internos revelados por tinción de gram o por tinción con azul de metileno (Kandler, 1983).

Son sacarolíticos obligados. Su característica principal es la de fermentar azúcares con producción de ácido láctico, pudiendo ser homofermentadores u



heterofermentadores (Kandler, 1983). Su crecimiento se ve favorecido por la anaerobiosis o por tensiones de oxígeno reducidas. Crecen entre 2°C y 53°C, aunque su temperatura óptima es de 30 a 40°C. Son acidúricos, creciendo óptimamente a pH comprendidos entre 5.5 a 6.2. Se han descrito siete grupos serológicos (A-G) de lactobacilos, basándose en sus determinantes antigénicos específicos. Se han descrito más de 102 especies y la especie tipo es *Lactobacillus delbrueckii* que pertenece al grupo E (Kandler, 1983).

Los *Lactobacilos* se encuentran ampliamente distribuidos en los vegetales, carnes y pescados. Forman parte de la flora normal de la boca, tracto intestinal y aparato reproductor femenino humano y de muchos animales. No son considerados patógenos (excepto algunas especies que parecen intervenir en la caries dental). Tienen una gran importancia industrial, pues se utilizan en diversos procesos de fermentación láctica (yogur, quesos...). Intervienen también, en la fabricación de productos derivados de los vegetales (pepinillos, aceitunas...).

Algunas especies forman colonias rugosas. Otras, como *Lactobacillus confusus*, presentan colonias viscosas por excepción. Generalmente no presentan actividad proteolítica ni lipolítica que pueda apreciarse mediante halos claros formados en medios sólidos que contengan proteínas o grasas. Sin embargo, muchas cepas presentan ligera actividad proteolítica debido a proteasas y peptidasas ligadas a la pared celular o liberadas por ésta, así como una débil actividad lipolítica debido a la acción de lipasas (Takahashi et al. 1993).

Normalmente no reducen los nitratos, pero esta reacción puede ocurrir en algunos casos, cuando el pH está por encima de 6,0. Los *Lactobacilos* no licúan la gelatina ni digieren la caseína, aunque muchas cepas producen pequeñas cantidades de Nitrógeno soluble. Tampoco producen indol ni sulfídrico (H<sub>2</sub>S). Son catalasa negativos, pero algunas cepas producen la enzima pseudocatalasa que descompone el peróxido de hidrógeno. Son citocromo negativos, por la ausencia de porfirianos; presentan una reacción bencidina negativa (Takahashi et al. 1993).



La producción de pigmentos por estas bacterias es rara y cuando ocurre, éstos pueden ser de color amarillo o naranja hacia un tono ferroso o rojizo. Su crecimiento en medio líquido se presenta a través de éste, aunque sus células precipitan rápidamente después que el crecimiento cesa; dando lugar a un sedimento suave y homogéneo, sin formación de películas. En raras ocasiones este sedimento es granular o viscoso (Takahashi et al. 1993).

Los *Lactobacilos* no desarrollan olores típicos al crecer en medios comunes, pero contribuyen a modificar el sabor de alimentos fermentados, produciendo compuestos volátiles como diacetilo y sus derivados y hasta sulfuro de hidrógeno (H<sub>2</sub>S) y aminas en el queso (Takahashi et al. 1993).

Tabla 6. Características del género *Lactobacillus*.

Características	Grupo I Homofermentativos obligados	Grupo II Heterofermentativos facultativos	Grupo II Heterofermentativos Obligados
Fermentación de pentosas	-	+	+
CO <sub>2</sub> a partir de glucosa	-	-	+
CO <sub>2</sub> a partir de gluconato	-	+	+
Presencia de aldolasa	+	+	-
Presencia de Fosfoacetolasa	-	+	-
	<i>L. acidophilus</i>	<i>L. casei</i>	<i>L. Brevis</i>
	<i>L. delbrueckii</i>	<i>L. curvatus</i>	<i>L. buchneri</i>
	<i>L. helveticus</i>	<i>L. plantarum</i>	<i>L. fermentum</i>
	<i>L. salivarius</i>	<i>L. sake</i>	<i>L. reuteri</i>

Fuente: Kandler, 1983



### 1.2.2.5. Condiciones para su desarrollo

#### - pH:

Los *Lactobacilos* crecen bien en medios ligeramente ácidos, con pH inicial de 6.4 – 4.5 y con uno óptimo de desarrollo entre 5.5 y 6.2. Su crecimiento cesa cuando el pH alcanza valores desde 4 hasta 3.6 en dependencia de especies y cepas y disminuye notablemente en medios neutros o ligeramente alcalinos. Los *Lactobacilos* son capaces de disminuir el pH del sustrato donde se encuentran por debajo de 4.0 mediante la formación de ácido láctico. De esta forma evitan o al menos disminuyen considerablemente el crecimiento de casi todos los otros microorganismos competidores, exceptuando el de otras bacterias lácticas y el de las levaduras (Bergey, 1992).

#### - Necesidades de Oxígeno:

La mayoría de las cepas de *Lactobacillus* son principalmente aerotolerantes; su crecimiento óptimo se alcanza bajo condiciones microaerofílicas o anaeróbicas y se conoce que un incremento de la concentración de CO<sub>2</sub> (de aproximadamente 5% o hasta el 10%) puede estimular el crecimiento, sobre todo en el caso del crecimiento superficial sobre medios sólidos (Takahashi et al. 1993).

#### - Temperatura de crecimiento:

La mayor parte de los *Lactobacilos* son mesófilos (30 - 40°C), con un límite superior de 40°C. Aunque su rango de temperaturas para el crecimiento oscila entre 2 y 53°C, algunos crecen por debajo de 15°C y hay cepas que crecen por debajo de 5°C. Otros crecen a temperaturas bajas, cercanas al punto de congelación (por ejemplo, los que habitan en carnes y pescados congelados). Los llamados *Lactobacilos* “termófilos” pueden tener un límite superior de temperatura de 55°C y no crecen por debajo de 15°C. Aún no se conocen los verdaderos *Lactobacilos* termófilos que crezcan por encima de 55°C (Takahashi et al. 1993).



## - **Metabolismo:**

En su metabolismo, los *Lactobacilos* pueden encontrarse en la vida anaerobia a la aerobia. Estos microorganismos carecen de sistemas de citocromos para ejecutar la fosforilación oxidativa y no poseen enzimas superóxido dismutasas ni catalasas (Kandler, 1983).

Los miembros de este género transforman la glucosa y las hexosas aldehídicas similares, los carbohidratos que producen estos azúcares simples y los alcoholes polihidroxicos en ácido láctico por homofermentación o bien, en ácido láctico y otros productos finales adicionales como ácido acético, etanol, dióxido de carbono, ácido fórmico y ácido succínico por heterofermentación constituyendo al menos un 50% de los productos finales el ácido láctico, el cual usualmente no es fermentado (Kandler, 1983).

Las principales vías de la fermentación para las hexosas son: la de Embden-Meyerhof, donde se convierte 1 mol de hexosa en 2 moles de ácido láctico por fermentación homoláctica y la vía del 6-fosfogluconato, cuyo resultado es 1 mol de CO<sub>2</sub>, 1 mol de etanol (o de ácido acético) y 1 mol de ácido láctico, por fermentación heteroláctica (Kandler, 1983).

En condiciones aerobias, la mayoría de las cepas reoxidan el NADH<sub>2</sub> utilizando el O<sub>2</sub> como aceptor final de electrones, de modo que el Acetil-CoA no es, o al menos no es completamente reducido a etanol. De esta manera, se forma ATP adicional por fosforilación a nivel de sustrato, así como proporciones variables de ácido acético y etanol, en dependencia del suministro de Oxígeno. En cuanto a los niveles enzimáticos, los lactobacilos heterofermentativos poseen fosfoacetolasas, pero no aldolasas, mientras que los homofermentativos poseen aldolasas, pero no fosfoacetolasas (Kandler, 1983).



- **Habitat:**

Los *Lactobacilos* pueden encontrarse en productos lácteos, quesos, granos, productos cárnicos o de pescado, agua, aguas locales, cervezas, vinos, frutas y jugos de frutas, col y otros vegetales fermentados, ensilajes, masas agrias y pulpas (Kandler, 1983.). Aunque también forman parte de la flora normal de la boca, el tracto gastrointestinal y la vagina de muchos animales de temperatura estable, incluyendo al hombre. También pueden encontrarse en habitats secundarios como los fertilizantes de origen orgánico. Algunas especies individuales se han adaptado a determinados nichos ecológicos, que son de hecho sus habitats naturales, siendo muy difícil encontrarlos fuera de éstos (Kandler, 1983.).

#### **1.2.2.6. Metabolismo de las bacterias lácticas**

Los *Lactobacilos* tienen requerimientos para su crecimiento muy complejos. Requieren bajos niveles de oxígeno, carbohidratos fermentables, proteínas, un gran número de vitaminas del complejo B, ácidos grasos insaturados y minerales. Los *Lactobacilos* fermentan glucosa a ácido láctico en el caso de una homofermentación, o producen cantidades equimolares de ácido láctico y CO<sub>2</sub> en el caso de la heterofermentación (Kandler, 1983.).

Las bacterias ácido lácticas producen ácidos grasos de cadena corta en diversas cantidades como productos metabólicos, los cuales ejercen acción antagónica contra otros organismos (Kandler, 1983.). Se ha sugerido que las bacterias ácido lácticas tienen la habilidad de eliminar bacterias patógenas al convivir estrechamente con ellas ya que producen sustancias antimicrobianas. La mayor parte de estas sustancias son ácidos orgánicos, especialmente lácticos y acéticos. Pueden producir también peróxido de hidrógeno y dióxido de carbono. Si las bacterias ácido lácticas están metabólicamente activas durante su paso a través de los intestinos, es muy probable que algunas de las sustancias mencionadas se produzcan. Algunos indicadores de esto provienen de la observación de que ciertas cepas probióticas reducen el pH de las heces fecales, lo que indica la



producción de ácidos orgánicos. La producción de otros componentes antimicrobianos como diacetilo, ácido piroglutámico y bacteriocinas, no es muy común bajo condiciones *in vitro* (Kandler, 1983).

#### 1.2.2.7. *Lactobacillus acidophilus*

Es una bacteria del género *Lactobacillus*. Se usa junto con el *Streptococcus thermophilus* en la producción del yogur. Esta bacteria crece, fácilmente, en medios mucho más ácidos que los ideales para otros microorganismos (pH 4-5 o menores) y crece en condiciones óptimas a unos 45 °C. El *Lactobacillus acidophilus* crece de manera natural en una gran variedad de alimentos, incluidos la leche, la carne, el pescado y los cereales (Quintero, 2001).

El *Lactobacillus acidophilus* absorbe la lactosa y la metaboliza formando ácido láctico. Ciertas variedades genéticamente similares (conocidas como heterofermentivas) también producen etanol, dióxido de carbono y ácido acético como subproductos (hay que reseñar que el *Lactobacillus acidophilus* produce exclusivamente ácido láctico). Como cualquier bacteria puede ser eliminada por un exceso de calor, humedad, o la luz solar directa. El *Lactobacillus acidophilus* se considera un probiótico o bacteria beneficiosa para el hombre. Este tipo de bacterias habitan en los intestinos (y en la vagina de los mamíferos) protegiendo a sus poseedores del efecto nocivo de otros microorganismos. La degradación de nutrientes efectuada por este microorganismo produce ácido láctico, peróxido de hidrógeno y otros subproductos que crean un medio hostil para otros organismos indeseables (Quintero, 2001).

El *Lactobacillus acidophilus* consume los nutrientes de otros muchos microorganismos entrando en competencia con ellos y controlando, por la disminución de nutrientes, el desarrollo desmedido de estos. Durante la digestión, también ayuda en la producción de niacina, ácido fólico y vitamina B6 (piridoxina). Algunos estudios demuestran que el *Lactobacillus acidophilus* puede ayudar a la desconjugación y separación de los aminoácidos por los ácidos biliares, que posteriormente pueden ser reciclados por el cuerpo (Quintero, 2001).





### 1.2.2.8. *Lactobacillus bulgaricus*

Es un bacilo homofermentativo grampositivo, largo, no móvil, el cual produce ácido D-(-) láctico. Es capaz de fermentar fructuosa, galactosa, glucosa y lactosa, pero no así maltosa y sacarosa. Puede crecer a temperaturas superiores a 45<sup>0</sup>C, pero normalmente su óptimo entre 45<sup>0</sup>C y 43<sup>0</sup>C; no es capaz de crecer a temperaturas menores de 15<sup>0</sup>C. Tiene la habilidad de crecer a pH inferiores a 5, y presenta metabolismo fermentativo aun en presencia de aire (Quintero, 2001). La especie tiene requerimientos nutricionales muy complejos. Son conglomerados de bacterias lácticas y levaduras de asociación simbiótica estable embebidas en una matriz de polisacáridos, cuyo tamaño varía de entre 5mm y 2.5 mm; de consistencia elástica y de color blanco-amarillento (Kandler,1983).

Los *Lactobacilos* búlgaros presentan tres formas estructurales diferentes: laminar, enrollada y convoluta; los microorganismos que las constituyen presentan una disposición de estratos definida. La forma laminar presenta dos superficies, una lisa, colonizada por *Lactobacilos* cortos y una rugosa, en la que predominan las levaduras; entre ambas se encuentra una porción intermedia, donde existe una sustitución de bacilos cortos por levaduras. La forma de convoluta presenta tres capas: la externa, con predominancia de *Lactobacilos* cortos, la media con *Lactobacilos* largos rectos, *Lactobacilos* largos curvos y algunas levaduras y la interna con *Lactobacilos* excrementus y abundantes levaduras embebidos en una matriz cavernosa (Kandler, 1983).

La leche contiene los materiales necesarios para cubrir tales requerimientos. La lactosa, único carbohidrato presente en la leche en cantidades significativas, satisface los requerimientos energéticos de la especie. La leche contiene, además, en abundancia los aminoácidos indispensables para estas bacterias, aunque no en forma libre, sino formando las proteínas. También contiene las vitaminas y minerales que este organismo requiere. La bacteria transforma la lactosa en ácido láctico, en la formación de pequeñas cantidades de otros metabólicos. El ácido es responsable de la formación del coágulo, firmeza y sabor



ácido característicos de yogurt. Esta acidez también inhibe el crecimiento de otras bacterias; por ejemplo, las patogénicas *Salmonella* y *Staphylococcus aureus* y algunos microorganismos que deterioran el producto (Quintero, 2001).

*Lactobacillus bulgaricus* produce además peróxidos de hidrogeno, bulgaricano y otro biocida de naturaleza no proteica, los cuales también inhiben el crecimiento de algunos microorganismos indeseables. Se ha observado que *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli* son incapaces de sobrevivir en el yogurt; el efecto letal de este alimento sobre estas bacterias patógenas es parcial debido al ácido láctico, pero no es el único factor bactericida. La formación de ácido láctico por ambas especies es a través de la vía Embden-Meyerhof, con un paso terminal de conversión de piruvato a lactato, aunque cada especie produce un enantiómero diferente; la proporción del isómero L en el yogurt es 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 (Quintero, 2001).

La hidrólisis de la lactosa por *Lactobacillus bulgaricus* es por medio de la  $\beta$ -galactosidasa mas que por la  $\beta$ -fosfogalactosidasa, aunque ambas se encuentran presentes. La porción de galactosa puede ser fosforilada por medio de la galactocinasa y así metabolizarla a través de la vía de Leloir; aunque este sistema opera solamente si la galactosa es el único azúcar asimilable presente (Quintero, 2001).

El principal componente responsable del sabor a yogurt es el acetaldehído. Este es producido ya sea como un subproducto de la vía Embden-Mayerhof (que es la principal ruta de *Streptococcus salivarius ss. thermophilus*), o bien a partir de treonina (ruta preferida por *Lactobacillus bulgaricus*) Ambas bacterias crecen en la enzima alcohol deshidrogenasa, por lo cual son incapaces de transformar al acetaldehído en etanol (Quintero, 2001).

*Lactobacillus bulgaricus* y *S.salivarius Ss. 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 *Lactobacillus delbruekii ss. bulgaricus*; el formaldehído es un precursor de la pruna por lo cual estimula la síntesis de ARN. Este efecto sinérgico resulta en un incremento en el crecimiento y en la producción de ácido láctico y de acetaldehído. También se ha sugerido que la glicina producida por el bacilo, como un subproducto de la etapas de fermentación, *S.salivarius ss. thermophilus* crece rápidamente causando una depleción de oxígeno disuelto, lo cual también favorece el crecimiento del bacilo (Quintero A., 2001).

Las condiciones de crecimiento (temperatura, pH y osmolaridad) son factores determinantes durante la fermentación. Reportan que temperaturas superiores de 40<sup>0</sup>C a 45<sup>0</sup>C favorecen al bacilo, mientras que temperaturas de alrededor de 31<sup>0</sup>C permiten que el coco domine; no obstante, independientemente de la temperatura de fermentación, el coco siempre alcanza cuentas superiores a las del bacilo. Ambas especies pero *S.salivarius ss. thermophilus* crece mejor a pH más altos, es decir, al principio de la fermentación. Cuando el pH cae debajo de 5.5, *L. Bulgaricus* es más activa que el coco, y a pH a 4.2 la fermentación es enteramente dominada por el bacilo (Quintero, 2001).

Hacia el final de la fermentación, la proporción de bacilo a coco varía de 1:1 a 1:8. Pero esta puede cambiar e incrementar mucho la proporción de *L. bulgaricus* sobre la del coco si el producto se almacena a temperaturas relativamente altas (10<sup>0</sup>C). En un estudio realizado con yogures comerciales mexicanos, la relación de bacilo a coco vario entre 1:03 y 1:3 La presencia de sal y altas concentraciones de azúcar inhiben la fermentación. A medida que se incrementa la concentración de azúcar, se disminuye la producción de acidez; este mismo efecto inhibitorio resulta de un incremento equivalente de los sólidos de la leche sin adición de azúcar. Una inhibición severa se encontró a partir de 24% de sólidos totales (de leche o azúcar) (Quintero, 2001).

En cualquier caso, la única especie afectada resulto ser *Lactobacillus bulgaricus*; estudios recientes del decremento de actividad de agua (*Aw*) mostraron que esta



especie es más susceptible a la inhibición por un decremento en la cantidad de agua libre, pero también el coco se afecta; a valores de  $A_w$  ajustados con glicerol inferiores a 0.965, *Lactobacillus bulgaricus* fue incapaz de producir ácido, mientras que el coco fue capaz de acidificar el medio aun a valores de 0.943, aunque a una velocidad significativamente más baja a valores inferiores a 0.975; por esto, a medida que se disminuye la  $A_w$  de la leche, la relación coco a bacilo se incrementa; las inhibiciones por reducción de la  $A_w$  cuando se utilizan azúcares en lugar de glicerol resultaron más severas, encontrándose valores de  $A_w$  inhibitorios más altos (Quintero, 2001).

La aplicación de la ingeniería genética a los cultivos de yogurt se encuentra apenas en etapas iniciales por lo que la consolidación de estas perspectivas se dará a mediano plazo (Quintero, 2001).

### 1.2.3 Necesidades generales de la producción de leches acidificadas

La conversión de lactosa en ácido tiene un efecto conservador sobre la leche. El bajo pH de la leche acidificada inhibe el crecimiento de las bacterias de la putrefacción y de otros organismos perjudiciales. De esta forma se prolonga la vida útil del producto. Por otra parte, la leche acidificada es un medio muy favorable para levaduras y mohos que causarían olores y sabores desagradables si se les permitiese infectar los productos lácteos (López, 2003; Okonkwo y Kinsella, 1969).

El sistema digestivo de algunas personas carece de la enzima lactasa. Por ello, la lactosa no será descompuesta en el proceso digestivo en azúcares más simples. Este tipo de personas puede consumir sólo muy pequeños volúmenes de leche normal. Sin embargo, pueden tomar productos lácteos acidificados, en los que la lactosa ha sido ya parcialmente desdoblada por las enzimas bacterianas (López, 2003; Okonkwo y Kinsella, 1969).

En la producción de leche acidificada se deben crear las mejores condiciones posibles para el crecimiento de cultivo de fermentos. Ello se consigue mediante tratamiento térmico de la leche, de forma que se inhibe el desarrollo de



microorganismos que pudiesen competir con el citado cultivo. Por otra parte, la leche debe mantenerse a la temperatura óptima para el desarrollo del cultivo de que se trate. Cuando se ha alcanzado el sabor y aroma deseados, la leche acidificada debe enfriarse rápidamente con objeto de detener el proceso fermentativo. Si el tiempo de fermentación es muy largo o muy corto se estropeará el sabor del producto, así como su consistencia (López, 2003; Okonkwo y Kinsella, 1969).

Además de un buen sabor y un buen aroma, la leche acidificada debe tener una apariencia y consistencia adecuadas. Estas características son determinadas por medio de una adecuada elección de los parámetros de proceso. El adecuado tratamiento térmico y homogenización de la leche, algunas veces combinado con métodos para incrementar el contenido de SNG (Sólidos lácticos no grasos), como en la leche destinada a yogur, son las bases esenciales para conseguir un coágulo adecuado durante el periodo de incubación (López, 2003; Okonkwo y Kinsella, 1969).

#### **1.2.4 Yogurt y tipos de yogurt**

El yogurt es un producto que se obtiene al fermentar la leche utilizando un cultivo mixto formado por las bacterias *Lactobacillus delbrueckii*, subespecie *bulgaricus*, y *Streptococcus salivarius*, subespecie *thermophilus*. Como resultado de la fermentación, se produce ácido láctico a partir de la lactosa presente en la leche y una serie de compuestos que le imparten al yogurt un sabor y un aroma típicos (Hernández, 2005). La consistencia, sabor y aroma varía de un lugar a otro. En algunas partes, el yogurt se produce bajo la forma de un líquido altamente viscoso, mientras que en otros países presenta la apariencia de un gel blanco. El yogurt también se produce en forma congelada para postres o como una bebida. El aroma y sabor del yogurt difiere del de otros productos acidificados. Sus sustancias aromáticas volátiles incluyen pequeñas cantidades de ácido acético y acetaldehído. 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 (López, 2003; Okonkwo y Kinsella, 1969).



El yogurt se clasifica normalmente de la forma siguiente:

- **Yogurt firme** (incubado y enfriado en el mismo envase Figura 1): La leche inoculada con los microorganismos se debe empacar en los recipientes definitivos antes de que se inicie la fermentación. 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 (Muñoz, 2007).

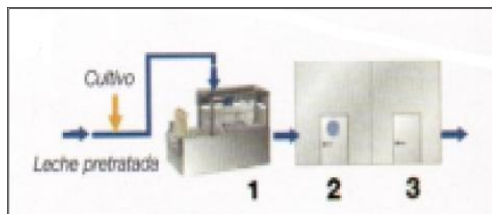


Figura 1. Yogurt Firme

- Llenadora de tarrinas
- Cámara de inoculación
- Cámara de enfriamiento

**Yogur batido:** (incubado en depósitos y enfriado antes de su envasado Figura 2): también conocido como yogurt a granel es producido en tanques de fermentación y se empaca una vez que las frutas o los saborizantes hayan sido mezclados con el yogurt (Muñoz, 2007).

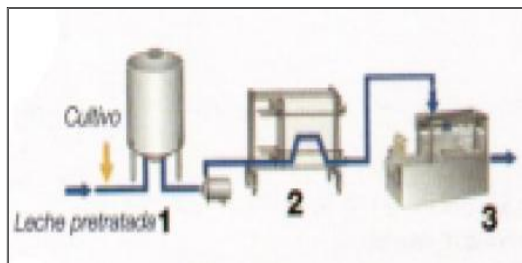


Figura 2. Yogurt batido

- a) Tanque de incubación
- b) Enfriador
- c) Llenadora de tarrinas

- **Yogurt líquido**, (Similar al yogurt batido, aunque su coagulo se rompe hasta obtener una forma líquida antes de su envasado, Figura 3): se describe como un yogurt de menor viscosidad. Se obtiene a partir de una leche con bajo contenido de sólidos totales (11% p/v) o mezclando iguales cantidades de agua y yogurt, sin embargo, una desventaja de este último método es que, a veces, se separan la fase líquida y la fase sólida (Muñoz, 2007).

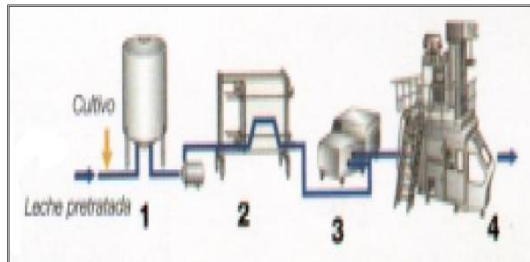


Figura 3. Yogurt Para beber

1. Tanque de incubación
2. Enfriador
3. Homogeneizador
4. Maquina de llenado

- **Yogurt congelado**, El producto se puede preparar a partir de los yogures convencionales firme o batido (Figura 4), aunque se precisa una mayor concentración de azúcar y estabilizantes para mantener el coágulo durante la congelación y el almacenamiento; puede añadirse una pequeña cantidad de nata para mejorar la sensación en la boca y también es posible reemplazar los sólidos lácteos por concentrado de proteínas del suero, es incubado en tanques y congelado como un helado de crema (Muñoz, 2007).

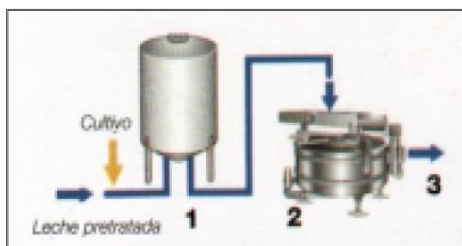


Figura 4. Yogurt Congelado

- 1- Tanque de incubación.
- 2- Congelador de barras de helado de crema.
- 3- Al túnel de endurecimiento.

- **Yogurt concentrado** (incubado en de ser envasado, Figura 5). consiste en una separación centrifuga del yogurt elaborado con leche desnatada para obtener una base concentrada que a continuación se recombina con aceite de mantequilla o nata hasta el contenido graso final deseado. Este procedimiento se utiliza para producir yogures “espesos y cremosos” de estilo Griego, con un contenido en sólidos totales del 24% y un contenido graso aproximado del 10Este tipo es a veces llamado yogurt colado, o labneh (Muñoz, 2007).

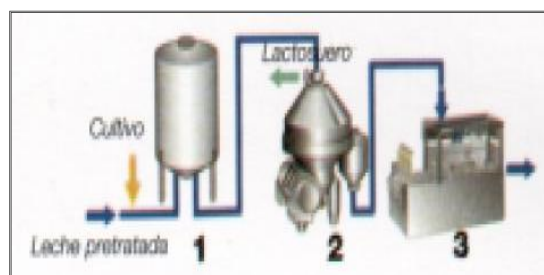


Figura 5. Yogurt Concentrado

1. Tanque de incubación.
2. Desnatadora.
3. Llenadora de tarrinas.



- **yogurt con aromas o frutas:** El yogurt aromatizado es muy popular, aunque la tendencia de vuelta hacia el yogurt natural se aprecia claramente en algunos mercados. Entre los aditivos más comunes utilizados en el yogurt están las frutas y bayas en jarabe, procesadas o como purés. La proporción de fruta es normalmente de alrededor del 15%, del cual el 50% es azúcar (López, 2003; Okonkwo y Kinsella, 1969). La fruta se mezcla con el yogurt antes o durante el envasado. Se puede también colocar en el fondo del envase antes de llenarlo con yogurt. Otra alternativa es envasar la fruta de forma separada en una “capa doble” integrarla en la copa que constituye el envase. En ocasiones, también se aromatiza el yogurt con diversas esencias, tales como la vainilla, café, miel, etc. También se añaden colorantes y azúcares en forma de sacarosa, glucosa o aspartamo, o de edulcorante dietético libre de azúcar, junto con los productos aromáticos (López, 2003; Okonkwo y Kinsella, 1969).

### 1.2.5. Composición química del yogurt

Con objeto de conseguir la consistencia deseada se añaden a veces sustancias estabilizantes. Los aditivos aumentan el contenido en materia seca del yogurt final. A continuación, en la Tabla 7 se indica la composición típica de un yogurt de frutas (López, 2003; Okonkwo y Kinsella, 1969).

Tabla 7. Análisis químico proximal de yogurt con frutas

Ingredientes	%
<b>Grasa</b>	0.5-3
<b>Lactosa</b>	3-4.5
<b>Solidos lácteos no grasos (SNG)</b>	11-13
<b>Estabilizantes, en su caso</b>	0.3-0.5
<b>Fruta</b>	12-18

Fuente: López, 2003





### 1.2.6. Factores que afectan la calidad del yogur

Diversos factores deben ser cuidadosamente controlados durante el proceso de fabricación con objeto de obtener un yogurt de alta calidad, un adecuado sabor, aroma, viscosidad, consistencia, apariencia y libre de suero separado, con un prolongado periodo de conservación (López, 2003; Okonkwo y Kinsella, 1969):

1. Elección de la leche
2. Normalización de la leche
3. Aditivos lácteos
4. Desaireación
5. Homogenización
6. Tratamiento térmico
7. Preparación de los cultivos

Los tratamientos previos de la leche incluyen entonces toda una serie de medidas que afectan todas ellas de forma muy importante a la calidad del producto acabado. El tratamiento mecánico al que se somete el yogur durante su producción afecta también a su calidad (López, 2003; Okonkwo y Kinsella, 1969).

#### 1.2.6.1. Elección de la leche

La leche para la producción de yogur debe ser de la más alta calidad. Debe tener un bajo contenido en bacterias y sustancias que puedan impedir el desarrollo de los cultivos típicos del yogurt. La leche no debe contener antibióticos, bacteriófagos, ni residuos de soluciones de limpieza o agentes desinfectantes. Por ello, la industria láctea debe obtener la leche para la producción de yogurt de ganaderos seleccionados, con prácticas de producción apropiadas. Por otra parte, dicha leche debe ser cuidadosamente analizada en la industria láctea (López, 2003; Okonkwo y Kinsella, 1969).

#### 1.2.6.2. Normalización de la leche

El contenido en grasa y en sólidos de la leche se normaliza habitualmente de acuerdo con las normas y principios FAO/OMS que se indican a continuación (López, 2003; Okonkwo y Kinsella, 1969).



**Grasa:** El yogur puede tener un contenido en grasa de 0 a 10%. Sin embargo, lo más habitual es un contenido en grasa de 0.5-3.5%. El yogur se puede clasificar en los siguientes grupos, según el código y principios establecidos por la FAO/OMS (López, 2003; Okonkwo y Kinsella, 1969):

1. Yogurt con un contenido graso mínimo de 3%.
2. Yogurt parcialmente desnatado con menos del 3% de contenido de grasa mínimo pero más del 5%.
3. Yogurt desnatado con un máximo de grasa del 0.5%.

**Contenido en materia seca (MS):** Según lo establecido por la FAO/OMS, el contenido mínimo de sólidos no grasos de origen lácteo debe ser del 8.2%. El incremento en el contenido total de materia seca (MS), especialmente de la proporción de caseína y proteínas del suero, dará lugar a un yogurt de más consistencia, reduciéndose la tendencia a la separación del suero (Muñoz, 2007). Los métodos más comunes para normalizar el contenido de materia seca (MS) son:

- ❖ Evaporación, donde normalmente se evapora un 10-20% del volumen de la leche.
- ❖ Adición de leche desnatada en polvo, normalmente hasta el 3%.
- ❖ Adición de leche concentrada.
- ❖ Adición de retentado de UF de leche desnatada.

### 1.2.6.3. Aditivos en la leche

En la producción de yogurt se pueden añadir a la leche sustancias estabilizantes y azúcar o edulcorantes (Muñoz, 2007).

1. **Azúcar o edulcorantes:** El disacárido sacarosa, o un monosacáridos como la glucosa, se pueden añadir solos o en combinación con frutas. Para satisfacer a las personas a dieta, entre los cuales los diabéticos constituyen una importante categoría, se deben utilizar edulcorantes. Un edulcorante no tiene valor nutritivo pero proporciona el sabor dulce incluso si se añade en



pequeñas dosis. (Hay que remarcar que un edulcorante no se puede utilizar como conservante para la leche condensada edulcorada) (Muñoz, 2007). La fruta normalmente contiene alrededor de un 50% de azúcar, que equivale a una determinada cantidad de edulcorante, por lo que la dulzura requerida se puede conseguir normalmente mediante la adición de un 12-18% de fruta (Muñoz, 2007). Se ha de señalar que la adicción de demasiada cantidad de azúcar (más del 10%) a la leche antes del período de inoculación/incubación tiene un efecto adverso sobre las condiciones de fermentación debido a que cambia la presión osmótica de la leche (López, 2003; Okonkwo y Kinsella, 1969).

**2. Sustancias estabilizantes:** Los coloides hidrófilos tienen la propiedad de ligar agua. Con ellos se aumenta la viscosidad del producto y contribuyen a la prevención de la separación de suero en el mismo. El tipo de estabilizante y la proporción en que debe ser añadido se determinan de forma experimental por cada fabricante. Si se utiliza un exceso de estabilizante, o éste no es el correcto, el producto puede adquirir una consistencia dura y elástica, como de goma (Muñoz, 2007). Si se produce de forma correcta, el yogur natural no necesita la adición de estabilizantes, ya que se origina un gel fino y consistente con una alta viscosidad de forma natural. Los estabilizantes se emplean en la producción de yogurt con frutas y pasteurizado. Los estabilizantes (0.1-0.5%) tales como la gelatina, pectina, almidón y agar-agar son las sustancias más comúnmente usadas (López, 2003; Okonkwo y Kinsella, 1969).

#### 1.2.6.4. Desaireación

El contenido de aire de la leche utilizada en la fabricación de productos lácteos acidificados debe ser tan bajo como sea posible. Sin embargo es inevitable que tenga lugar una cierta entrada de aire en la leche si el contenido de sólidos lácteos no grasos (SNG) se aumenta mediante la adición de leche en polvo. Si se hace esto, la leche se ha de desarear en una etapa de proceso dedicada a este fin (López, 2003; Okonkwo y Kinsella, 1969).



Cuando el contenido de sólidos lácteos no grasos SNG se aumenta por evaporación, la desaireación es una parte de ese proceso. Mediante la desaireación se consiguen las siguientes ventajas (López, 2003; Okonkwo y Kinsella, 1969):

- Mejoran las condiciones de trabajo del homogenizador.
- Menos riesgo de ensuciamiento durante el tratamiento térmico.
- Estabilidad y viscosidad.
- Eliminación de malos aromas volátiles.

#### **1.2.6.5. Homogeneización**

Los motivos principales de la homogenización de la leche que se va utilizar en la fabricación de productos lácteos acidificados son prevenir la separación de la nata durante el periodo de incubación y asegurar una distribución uniforme de la grasa de la leche (Muñoz, 2007).

La estabilidad y consistencia de las leches acidificadas se ven mejoradas por la homogenización, incluso en aquellos productos con bajo contenido en grasa. La homogenización con el posterior calentamiento a alta temperatura, normalmente a 90 a 95°C durante alrededor de 5 minutos, tiene una muy buena influencia sobre la viscosidad (Muñoz, 2007).

La Tabla 6 ilustra la doble influencia sobre la viscosidad de una leche acidificada (3% de la grasa y alrededor de 8.7% de SNG) cuando se pretrata a varias presiones de homogenización y temperaturas de calentamiento. La temperatura de homogenización es de 60°C en todos los casos (López, 2003; Okonkwo y Kinsella, 1969).

La viscosidad de la corriente de leche homogenizada circula en paralelo a la presión de homogenización independientemente de que se halla sometido a un tratamiento térmico ordinario o no. La Tabla 8 también muestra que el tratamiento térmico a alta temperatura hace el producto más viscoso (Muñoz, 2007).



Como recomendación general, la leche se homogeniza de 20 a 26 mpa (megapascales) y 65 a 70°C para obtener unas propiedades físicas óptimas en el producto. La homogenización se utiliza frecuentemente incluso en la producción de leches acidificadas de bajo contenido en grasa (Muñoz, 2007).

Tabla 8. Influencia de la homogenización y el tratamiento térmico sobre la viscosidad de una leche acidificada.

Presión a 60°C MPa	Viscosidad=tiempo de flujo, en segundos a 20°C leche past. Ordinaria (72°C/20s)	Leche calentada a alta temperatura (95°C/5min)
0	5.7	15.0
2.5	5.6	14.6
5.0	7.1	15.8
7.5	8.0	19.0
10.0	8.9	22.1
15.0	10.4	28.7
20.0	11.2	30.2
30.0	13.8	32.7

Fuente: López, 2003

#### 1.2.6.6. Tratamiento térmico

La leche que se trata térmicamente antes de proceder a la inoculación de los cultivos se hace con el objeto de (López, 2003; Okonkwo y Kinsella, 1969):

- ❖ Mejorar las propiedades de la leche como sustrato para las bacterias del cultivo industrial.
- ❖ Asegurar que el coágulo del yogur terminado sea firme
- ❖ Reducir el riesgo de separación de suero en el producto terminado.

Se consiguen resultados óptimos por medio del tratamiento térmico de la leche a 90-95°C durante un tiempo de mantenimiento de unos 5 minutos. Esta combinación tiempo temperatura desnaturaliza alrededor del 70 al 80% de las seroproteínas. En particular la  $\beta$ -lactoglobulina, que es la principal seroproteína interactúa con la k-caseína, con lo que se facilita que el yogur adquiera “cuerpo”.



El tratamiento UHT (Procesamiento de ultra alta temperatura) y la esterilización de la leche destinada o no a la producción de leches acidificadas, tienen la misma influencia favorable sobre la viscosidad, por razones aún no muy bien conocidas (López, 2003; Okonkwo y Kinsella, 1969).

#### 1.2.6.7. Elección del fermento

Los laboratorios de fermentos actualmente utilizan técnicas avanzadas para producir fermentos de yogurt para satisfacer requerimientos específicos de sabor y viscosidad. Algunos ejemplos de propiedades del producto final que se pueden conseguir son: (López, 2003; Okonkwo y Kinsella, 1969).

- Alta viscosidad con bajo contenido de acetaldehído y un pH final relativamente alto.
- Baja viscosidad y contenido de acetaldehído medio, deseable para yogurt líquido, etc.

#### 1.2.6.8. Preparación del cultivo

El manejo del cultivo para la producción de yogurt y todas las otras leches fermentadas requiere una higiene y precisión máxima. Los métodos básicos de preparación de cultivo tradicional (López, 2003; Okonkwo y Kinsella, 1969). El cultivo debe aportar a la leche las bacterias acidolácticas que son responsables del proceso de acidificación de esto, es necesario prestar atención preferentemente a la composición y a la temperatura del cultivo (Muñoz, 2007).

#### 1.2.6.9. Composición del cultivo

El cultivo para el yogurt debe constar exclusivamente de las especies bacterianas termófilas siguientes (Muñoz, 2007):

- ❖ *Lactobacillus bulgaricus*.
- ❖ *Streptococcus thermophilus*.

No debe de contener otras especies no termófilas, ya que, de lo contrario, sufriría el cultivo una acidificación demasiado intensa de la refrigeración. Ambas especies bacterianas, viven en el yogurt en una simbiosis (vida asociada de organismos



distintos con beneficio mutuo) esta simbiosis exige una determinada proporción entre cocos y bacilos en el cultivo (Muñoz, 2007).

La relación cuantitativa entre el *Streptococcus thermophilus* y el *Lactobacillus Bulgaricus* debe ser de 1:1 a 2:3 aproximadamente (Muñoz, 2007).

Durante la incubación, es decir en el curso de la acidificación, varía dicha relación, para restablecerse nuevamente al final. La causa de la variación estriba, sobre todo, en que el *Lactobacillus bulgaricus* desdobla fácilmente las proteínas y origina así el aminoácido valina. Los cocos tienen un poder de acidificación menor que los bacilos y mueren antes bajo la acción del ácido láctico formado. *Lactobacillus bulgaricus* es el principal productor del aroma. Contribuye a la hidrólisis de la materia grasa de la leche liberando ácidos grasos (por ejemplo, cáprico, caprílico y caproico) y puede producir cantidades considerables de acetaldehído (etanol). Las temperaturas más favorables para el desarrollo del *Streptococcus thermophilus* son de 38 a 44°C, las del *Lactobacillus bulgaricus*, de 41 a 46 °C. Por consiguiente, la temperatura de incubación influye sobre la proporción entre ambas especies bacterianas. Lo mismo cabe decir respecto a la duración de la incubación y cantidad sembrada (Muñoz, 2007).

- ❖ La cantidad sembrada al preparar el cultivo es del 2.5 al 3%. La temperatura de incubación es de 42°C y la duración de esta viene a ser de unas 25 h.
- ❖ La incubación debe terminarse cuando se haya alcanzado el punto isoeléctrico y se produce, por tanto, la coagulación.
- ❖ Un buen cultivo debe contener de 2 a 4 millones de germenos por ml.

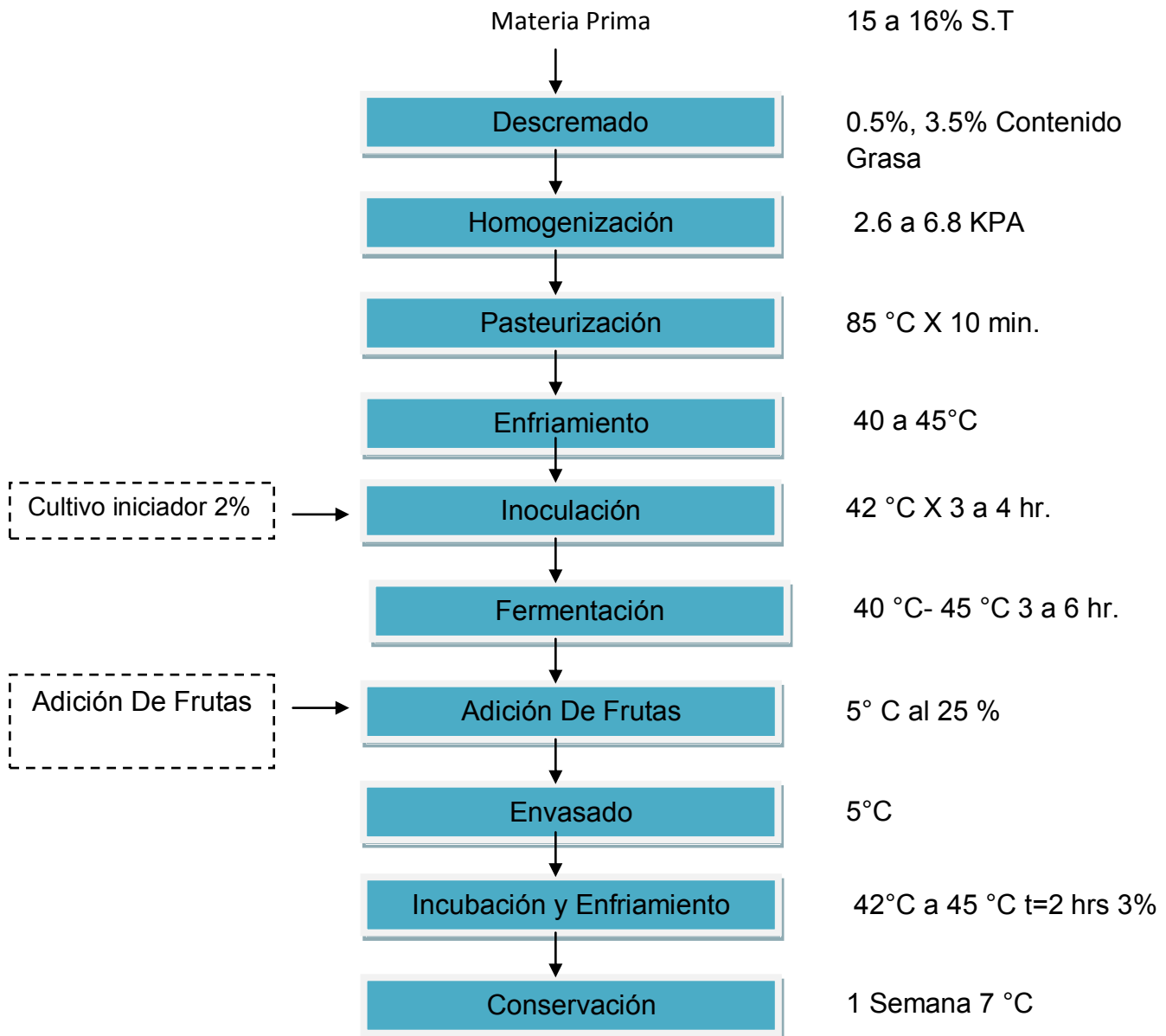
#### ➤ **Siembra**

Después de la pasteurización y de la concentración, la leche se enfría de 1 a 2°C sobre la temperatura de incubación y se siembra con cultivo usual en la proporción de 2 al 3% (Muñoz, 2007).



### 1.2.7. DIAGRAMA DE PROCESO DE ELABORACIÓN DEL YOGURT

En el esquema, se representan las etapas del proceso general para la elaboración de yogurt.



Esquema 1. Etapas del Proceso de elaboración del yogurt (Hernandez, 2000)





### 1.2.7.1. Descripción del diagrama de Proceso de yogurt

#### ➤ **Materia Prima**

El yogurt se elabora tanto con leche entera como descremada, preferible de vaca, aunque en otros países se emplea leche de cabra, de yegua o de búfala. También, puede utilizarse leche en polvo reconstituida. La leche debe estar libre de antibióticos, porque su presencia inhibe el desarrollo de los microorganismos que llevan a cabo la fermentación (esquema 1) (Hernández, 2000).

El contenido de sólidos totales (ST) es vital en el proceso de elaboración de este producto. En general, el contenido de sólidos totales (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, este porcentaje debe de aumentar (Hernández, 2000).

#### ➤ **Descremado**

Para aumentar el contenido de sólidos totales en la leche, primero es necesario estandarizar la cantidad de grasa. Bottazzi (1983) reportó que el contenido de la grasa del yogurt debe estar entre el 0.5%, en el caso del descremado y el 3.5%, en el caso del entero (Muñoz, 2007).

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 de agua presente en ella (Muñoz, 2007).

Actualmente se prefiere agregar leche descremada en polvo u otros sólidos de la leche hasta alcanzar el contenido de los sólidos totales requerido, porque es un proceso más práctico y barato. Otros métodos utilizados, aunque con menos frecuencia, para aumentar el contenido de sólidos son la ultrafiltración y la ósmosis inversa (Hernández, 2000).



### ➤ Homogenización

La etapa de homogeneización generalmente se lleva a cabo antes de la pasteurización, pero puede ser realizada después. Consiste en someter la leche a altas presiones (entre 2.6 y 6.8 KPA (kilopascales)) 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 yogur más viscoso, más estable y con mejores características organolépticas (Hernández, 2000).

### ➤ Pasteurización

La pasteurización es una de las etapas más importantes de este proceso porque:

1. Se elimina la mayor parte de la flora contenida en la leche. La disminución de la flora asociada a la leche permite el crecimiento de los microorganismos (productores del yogur) libres de competencia, con todos los nutrientes de la leche a su disposición (Hernández, 2000).
2. Se logra la inactivación de enzimas que afectan las características organolépticas del yogur (Muñoz, 2007).
3. Se desnaturalizan las proteínas de la leche. Mediante la desnaturalización de las proteínas, se libera 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 yogur y su capacidad de retención de agua e impide la separación del suero de la leche (Hernández, 2000).
4. Existe una gran gama de temperaturas y tiempos asociados a la pasteurización de la leche, de acuerdo con el proceso de fabricación del yogur y el equipo disponible para realizarla. Algunos ejemplos son los siguientes: de 80 a 85°C por treinta minutos, o a 90°C por cinco minutos, para leche procesada por lotes, entre 72 y 75 °C por dieciséis segundos, si se utiliza equipo especializado (Hernández, 2000).
5. Se debe tomar en cuenta que un calentamiento débil de la leche genera un yogur bajo en viscosidad, mientras que un sobrecalentamiento puede



provocar una textura granular y una tendencia a la separación del suero (esquema 1) (Muñoz, 2007).

#### ➤ **El enfriamiento postpasteurización**

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 y 45 °C. El enfriamiento se puede llevar a cabo de dos formas (esquema 1) (Hernández, 2000):

- ❖ Se hace pasar la leche por un intercambiador de calor de placas.
- ❖ En el mismo tanque de pasteurizadores, se hace pasar agua fría (en lugar de caliente) por la camisa del reactor).

#### ➤ **La inoculación y la fermentación**

El cultivo iniciador se encuentra compuesto por los microorganismos *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus* en una relación 1:1, la cual garantiza una adecuada consistencia del yogur y un agradable aroma. La manera de aplicación es la siguiente (Hernández, 2000):

Para reconstituir, se preparan cultivos madre y se hacen los trasposos necesarios de acuerdo con el volumen de yogurt producido. Para preparar el cultivo madre, se inocula el cultivo iniciador en un matraz con leche estéril y se coloca en las condiciones óptimas de desarrollo (Hernández, 2000).

Para “aplicación directa”. Se adiciona el contenido de los sobres directamente a la leche pasteurizada. 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 (Muñoz, 2007).

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 el valor del pH se encuentra entre 4.6 y 3.7 (esquema 1) (Hernández, 2000).

#### ➤ **El enfriamiento posfermentación**

Cuando se alcanza la acidez deseada, se debe detener el proceso de fermentación. Para detener la fermentación, se disminuye la temperatura, porque los microorganismos involucrados en el proceso no son capaces de crecer a temperaturas inferiores a 10°C esquema 1; además a bajas temperaturas, se suspende la actividad de las enzimas generadas por los microorganismos. La temperatura recomendada es la de refrigeración (5°C). El enfriamiento, a la vez tiene un efecto positivo, pues aumenta la firmeza del gel (Hernández, 2000).

#### ➤ **La agitación y la adición de frutas**

La adición de frutas al yogur le confiere una mayor aceptación por parte del consumidor. Una vez que el yogur se encuentra frío, se debe agitar cuidadosamente para romper el coágulo o gel, si la agitación se realiza en forma brusca, el yogur pierde su viscosidad. Durante esta etapa, se adiciona la fruta, previamente preparada 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, ya que, de lo contrario, son fuente de hongos y levaduras que contaminarán el yogur y disminuirán su vida útil (esquema 1) (Hernández, 2000).

#### ➤ **Envasado**

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 debe conservarse en refrigeración con el fin de aumentar su vida útil, que se calcula en un mes (esquema 1) (Hernández, 2000).



### ➤ **Incubación y refrigeración**

La leche envasada debe incubarse inmediatamente a temperaturas de 42 a 45°C para lograr la acidificación, la consistencia y el sabor deseados. La temperatura de incubación se mantendrá constante para regular el proceso de acidificación de manera que pueda establecerse la debida proporción entre cocos y bacilos. La refrigeración se llevará a cabo tan pronto como sea posible para que la leche no se acidifique después en exceso pH=0.3 (Muñoz, 2007).

En 1.5-2 horas alcanzará una temperatura de 16 a 17°C. A la refrigeración previa sigue otra más intensa (5-6°C) después de un almacenamiento de unas 2 horas, durante el cual se desarrolla principalmente el aroma. El yogurt puede ser expedido a las 10-12 horas de almacenamiento a esas temperaturas (esquema 1) (Muñoz, 2007).

### ➤ **Conservación**

Un yogurt bien elaborado debe conservarse durante una semana aproximadamente, a una temperatura de +7°C, gracias al ácido láctico (esquema 1) (Muñoz, 2007).

## **1.3. FERMENTACIÓN LÁCTICA**

### **1.3.1. Fermentaciones**

Las fermentaciones acontecen cuando los microorganismos durante sus procesos metabólicos consumen substratos orgánicos adecuados. Tales acciones son fundamentales para la descomposición de materiales naturales y, en última instancia, para el retorno al suelo y al agua de los elementos químicos sin los que la vida sería posible (Potter, 2007).

Las bacterias ácido lácticas sólo pueden obtener la energía a través de la fermentación de los carbohidratos; siendo la lactosa el único azúcar presente en la leche y utilizado para este fin por los microorganismos del yogurt. El catabolismo de la lactosa por *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus* tiene lugar en el interior de la célula microbiana, por lo que el paso inicial es el transporte de



moléculas de lactosa a través de la pared celular (Lawrence, Thomas & Terzaghi, 1976).

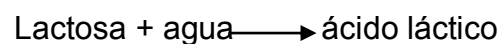
### 1.3.2. Beneficios de la fermentación

La fermentación tiene otras consecuencias importantes de su papel en la conservación de los alimentos y en la variedad de la dieta. Varios de los productos finales de las fermentaciones, particularmente ácidos y alcoholes, inhiben a los microorganismos patógenos que pueden contaminar a los alimentos. Los microorganismos, al fermentar los componentes de los alimentos, obtienen energía y se multiplican (Potter, 2007).

La segunda causa por la que los alimentos fermentados puede ser mejores desde el punto de vista nutritivo tiene que ver con la liberación de los nutrientes encerrados en estructuras y células vegetales formadas por materiales indigestibles. Esta circunstancia es especialmente importante en el caso de ciertos granos y semillas (Potter, 2007).

### 1.3.3. Producción del ácido láctico

El catabolismo de la lactosa por *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus* determina principalmente la producción de ácido láctico y, aunque el proceso comprende muchas reacciones bioquímicas, puede simplificarse en la siguiente ecuación:



La importancia del ácido láctico en la elaboración del yogurt se debe a las siguientes razones:

- Contribuye a la desestabilización de las micelas de caseína mediante el paso del fosfato y de calcio de un estado coloidal (en las micelas) a una forma soluble, que difunde en la fracción acuosa de la leche, lo que determina una progresiva depleción de calcio de las micelas que conduce a



la precipitación de la caseína a valores de pH de 4.6 a 4.7, dando lugar a la formación del gel que constituye el yogurt (dyatchenko, 1971).

- El ácido láctico proporcionan al yogur su sabor característico, es decir de ácido pudiendo también contribuir o acentuar el sabor a nuez y/o aromático del producto. Las bacterias ácido-lácticas poseen la enzima láctico-deshidrogenasa (LDH), que cataliza la síntesis de lactato a partir del ácido piruvico (Garvie, 1978; Hemme, Nardi & Wahl, 1981).
- La enzima láctico-deshidrogenasa (LDH) se localiza en el citoplasma de la célula bacteriana y, de acuerdo con garvie 1980, la actividad de esta enzima depende, en los microorganismos de la flora del yogur, del NAD (nicotín adenín dinucleótido) (Garvie, 1978; Hemme, Nardi & Wahl ,1981).

Durante la elaboración del yogurt el crecimiento de *Streptococcus thermophilus* es más rápido que el de *Lactobacillus*, por lo que se produce en primer lugar ácido L (+) láctico y a continuación ácido D (-), siendo el porcentaje entre estos isómeros indicativo de los siguientes hechos:

- Si el yogurt contiene mas de un 70% de ácido L (+) láctico ello indica que ha sido inoculado con un cultivo estárter consistente principalmente en *Streptococcus thermophilus*, que la fermentación se ha desarrollado a temperaturas inferiores a 40°C o, si el yogur contiene un 0.8% o menos de ácido láctico, que ha sido refrigerado cuando presentaba acidez baja (Kunath & kanderl, 1980).
- Si el yogurt contiene, más ácido D (-) láctico que L (+) láctico, ello indica: que ha sido incubado a una temperatura demasiado alta, es decir, de 45 °C o superior, que ha sido incubado durante mucho tiempo, por lo que el producto ha alcanzado una acidez muy alta, que ha sido almacenado por un periodo prolongado, que el inóculo de estarter superior fue al 3%, o bien que el cultivo estarter empleado contenía más bacilos que cocos.

El yogurt contiene normalmente un 45-60% de ácido L (-) láctico y un 40-45% de ácido D (-) (Puhan, Banhegyi y Flüer, 1973).



### 1.3.4. Producción de los compuestos responsables del sabor

Los cultivos estárter son los principales responsables de la producción de los compuestos que contribuyen al aroma del yogurt, los cuales pueden ser agrupados en cuatro categorías (Pette y Lolkema, 1950):

1. Ácidos no volátiles, como el láctico, pirúvico, oxalíco o succínico.
2. Ácidos volátiles, como el fórmico, acético, propiónico o butírico.
3. Compuestos con grupos carbonilo, como acetaldehído, acetona, acetoína o diacetilo.
4. Un grupo heterogéneo de sustancias, entre las que se incluyen algunos aminoácidos y/u otros compuestos formados por degradación de las proteínas, la grasa o la lactosa por acción de la temperatura.

El aroma y el sabor del yogurt se deben básicamente a la producción de ácido láctico y de compuestos carbonilo (Tabla 9), llegaron a la conclusión de que el aroma era debido a la presencia de acetaldehído y otros compuestos no identificados. Sin embargo, también observaron que la producción de acetaldehído era muy superior en cultivos mixtos, debido a la simbiosis establecida entre los microorganismos del yogur, si bien *Lactobacillus bulgaricus* juega el papel más importante (Pette y Lolkema, 1950).

Tabla 9. Producción de compuestos carbonilo (ppm) por cultivos estárter del yogurt

Microorganismo	Acetaldehído	Acetona	Acetoína	Diacetilo
<i>S. thermophilus</i>	1.0-8.3	0.2-5.0	1.5-7.0	0.1-13.0
<i>L. bulgaricus</i>	1.4-12.2	0.3-3.2	Trace-2.0	0.5-13.0
Cultivos mixtos	2.0-41.0	1.3-4.0	2.2-5.7	0.4-0.9

**Fuente:** Pette y Lolkema, 1950 (loc.cit).

Durante el proceso de elaboración del yogurt, la formación de acetaldehído se hace presente evidente solamente en determinados valores de acidez, es decir a pH 5.0, alcanzando el máximo a pH 4.2 y estabilizándose a pH 4.0 (Pette y Lolkema, 1950).





Otros compuestos posiblemente relacionados, quizás indirectamente con el aumento de sabor característico o que podrían actuar como precursores de los principales responsables del sabor y del aroma del yogurt son (Pette y Lolkema, 1950):

1. Ácidos grasos volátiles: ácido acético, ácido propiónico, ácido Butírico, ácido Isovalérico, ácido caproico, ácido caprílico y ácido. Cáprico (Turcic, Rasic y Canic, 1969; Dumont & Adda, 1973).
2. Aminoácidos: serina, ácido-glutámico, prolina, valina, leucina, isoleucina y tirosina (Groux, 1976).
3. Productos procedentes de la degradación por acción del calor de determinados constituyentes de la leche, a temperaturas de 80-90°C durante 15-30 minutos (Viani & horman, 1976), como son:
  - a) Ceto-ácidos (acetona, butanona, hexanona).
  - b) Hoidroxiácidos ( $\gamma$ -valerolactona,  $\delta$ -caprolactona,  $\epsilon$ -caprilactona).
  - c) Micelaneos (2-heptanona, 2-nonanona, 2-undecanona, pentano).
  - d) Procedentes de la degradación de la lactosa (fufural, furfural-alcohol, 5-metilfurfural, 2-pentilfurano).
4. Procedentes de la grasa y/ o la lactosa (alcohol bencélico, benzaldehído, metilbenzoato).
5. Procedentes de la degradación de las proteínas:
  - I. Metionina (dimetilsulfhidrico)
  - II. Valina (isobuturaldehido)
  - III. Fenilalanina (fenilacetaldehido).



### 1.3.5. Rutas metabólicas y reacciones iniciadas por *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus*

Tabla 10. Posible origen de los compuestos responsables del aroma producidos por *S. thermophilus* y *L. bulgaricus* durante la producción de yogur

Constituyente de la leche	Reacción que implica la formación de acetaldehído	referencias
<b>Lactosa</b>	Via piruvato durante el ciclo glucolítico. Via acetilfosfato o piruvato decarboxilación directa del piruvato	Seneca, HENDERSON AND COLLINS (1950)
	Valina → acetaldehído + alanina Treonina → acetaldehído + glicina escisión de a treonina en glicina y acetaldehído.  Conversión de la metionina en treonina y de esta en cetaldehído + glicina	White, Handler and Smith (1959)
<b>Acido nucleico</b>	Timidina → acetaldehído gliceraldehído 3-fosfato	+ Less and jago (1977)

Fuente: Less y Jago (1978)

Los ingredientes de la leche principalmente requeridos para los estater para la producción de acetaldehído en el yogur son: la lactosa (principalmente el resto de glucosa) y los aminoácidos treonina y metionina (Shankar, 1977).

Otro aminoácido, la metionina puede determinar también un aumento en la concentración de acetaldehído en un medio de cultivo sembrado únicamente con *Streptococcus thermophilus* (Tabla10) (Shankar, 1977).

### 1.3.6. Metabolismo proteico

Aunque los cultivos estárter del yogurt sólo son débilmente proteolíticos *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus* pueden provocar durante la fermentación un significativo grado de proteólisis, actividad importante por las siguientes razones (Shankar, 1977):



1. La proteólisis enzimática de las proteínas de la leche determina la liberación de péptidos de tamaño variable y de aminoácidos libres y estos cambios afectan a la estructura física del yogurt (Shankar, 1977).
2. La liberación de aminoácidos en la leche resulta esencial para el crecimiento de *Streptococcus thermophilus* (Shankar, 1977).
3. Aunque los aminoácidos y péptidos no contribuyen directamente al desarrollo del sabor del yogurt, actúan como precursores y a una multitud de reacciones que conducen a la formación de compuestos responsables del mismo (Shankar, 1977).

### 1.3.7. Péptido hidrolasas de los microorganismos del yogurt

La actividad proteolítica de *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus* indican que ambos microorganismos poseen diversas peptidasas y proteasas. La actividad de los primeros es superior a la de *Lactobacillus bulgaricus*, pero solo se presenta una débil actividad proteásica mientras que la capacidad de *Lactobacillus bulgaricus* para hidrolizar la casína confirma una actividad proteasa muy superior en los *lactobacillus*. Este modelo de hidrólisis peptídica por parte de los microorganismos del yogurt evidencia la relación simbiótica existente entre *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus*. Por tanto la actividad proteásica de *Lactobacillus bulgaricus* hidroliza las caseínas dando lugar a polipéptidos que son degradados por las peptidasas de *Streptococcus* hasta la liberación de aminoácidos constituyentes (Miller y Lander, 1967).

Los estudios sobre peptidasas de *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus* muestran que estas enzimas pueden encontrarse ligadas a las membranas o ser intracelulares. Sin embargo, *Lactobacillus bulgaricus* presenta una proteasa extracelular (Miller y Lander, 1967).

La actividad peptidásica de los microorganismos del yogurt parece alcanzar su máximo en las siguientes condiciones (Miller y Lander, 1967):



- A. La actividad es más intensa durante la fase logarítmica de crecimiento.
- B. La fase de proteólisis disminuye durante el almacenamiento o después de alcanzar la fase estacionaria.
- C. La concentración de aminoácidos en el yogur depende de la relación entre *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus* en los cultivos estárter.
- D. En el yogurt (tras 24 horas de incubación) el espectro de aminoácidos varía en función de la relación coco: bacilos. A una relación de 1:1 el 56% de los aminoácidos corresponden a tirosina, fenilalanina y leucina, pero para una relación de 3:1, la prolina representa el 7.1 % de los aminoácidos libres.
- E. La hidrólisis de las proteínas del suero de la leche da lugar a concentraciones inferiores a medida que disminuye la relación de *Lactobacillus bulgaricus* a *Streptococcus thermophilus*.
- F. Los ácidos grasos libres, por ejemplo el ácido cáprico y en menor grado el ácido oleico, pueden reducir la actividad proteolítica de los cultivos estárter, afectando la textura del coágulo.
- G. Durante la elaboración del yogurt de lactosa hidrolizada se observó un aumento de la actividad proteolítica, debido tal vez a la presencia de residuos de proteasas en las preparaciones de  $\beta$ -D-galactosidasa (Hemme et al., 1979).
- H. En la leche preincubada con bacterias psicrotrofas antes de la elaboración del yogurt se observa un aumento de la actividad proteolítica, pero el producto presenta aromas desagradables.
- I. El sabor amargo del yogurt contribuye normalmente a la formación de péptidos amargos como consecuencia de la actividad proteolítica de *Lactobacillus bulgaricus*. Si embargo, la fermentación de la leche a temperaturas de 44°C da lugar a un producto con menos probabilidades de resultar amargo que los productos incubados a temperaturas de 38°C.



### 1.3.8. Productos de la proteólisis

El cambio básicamente supone un aumento en la concentración de compuestos nitrogenados solubles, que incluye así mismo la liberación de péptidos y aminoácidos a partir de las proteínas (Miller y Lander, 1967).

### 1.3.9. Liberación de aminoácidos

El cambio básicamente supone un aumento en la concentración de compuestos nitrogenados solubles, que incluye así mismo la liberación de péptidos y aminoácidos a partir de las proteínas (Miller y Lander, 1967).

### 1.3.10. Compuestos nitrogenados solubles

Las distintas cepas de microorganismos del yogurt difieren en su actividad proteolítica y las cantidades de nitrógeno dializable liberadas por *Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus* (490 y 302 mg/l) confirman que el primero de estos microorganismos es más proteolítico que *Streptococcus thermophilus* (Miller y Lander, 1967).

### 1.3.11. Liberación de aminoácidos

*Lactobacillus bulgaricus* presenta una actividad proteolítica superior a las de *Streptococcus thermophilus*, cuanto mayor es la relación bacilos: cocos en el cultivo estáter, mayor es la concentración de aminoácidos en el yogurt (Miller y Lander, 1967).

### 1.3.12. Condiciones de almacenamiento

Cuanto mayor es la temperatura de conservación (5°C A 4°C) mayor es la concentración de aminoácidos libres (Ottogali et al. 1974).

### 1.3.13. Concentración del ácido láctico

El contenido en aminoácidos del yogurt depende de la acidez titulable el producto (yogurts con un 1.9 y un 1.72-1.73% de ácido láctico presentaban concentraciones



de aminoácidos totales de 70 y 41-50 mg/100 g respectivamente) (Ottogali et al. 1974).

#### 1.3.14. Metabolismo lipídico

Los acigliceroles representan el 96-98% de los lípidos de la leche constituido el resto de esta fracción por fosfolípidos, esteroides, vitaminas liposolubles (A, D, E Y K), ácidos grasos, ceras y escualeno. Los lípidos de la leche se encuentran formando membranas de los mismos o bien en el suero de la leche. Los acigliceroles presentes en la leche están constituidos por una molécula de glicerol esterificada en 1, 2 o 3 de sus radicales con ácidos grasos (mono-di, triacilglicéridos y triglicéridos) respectivamente. La hidrólisis enzimática de los lípidos de la leche tiene lugar a nivel de los enlaces éster, rindiendo ácidos grasos libres y glicerol. Las enzimas se conocen como lipasas (Ottogali et al. 1974).



Las lipasas del yogurt pueden proceder del cultivo estárter o de los microorganismos contaminantes que resistan el tratamiento térmico de la leche. Las lipasas propias de la leche inactivan a las temperaturas de pasteurización, cualquier disminución en el porcentaje de grasa, aumento de la concentración de ácidos grasos (libres o esterificados) o incremento en la concentración de ácidos grasos volátiles en el yogurt, puede atribuirse al metabolismo lipídico de los microorganismos, incluyendo *Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus* (Deeth y Fitzgerald, 1976).

#### 1.3.15. Contenido en grasa del yogurt

El contenido en grasa del yogurt varía según los países en función de las normas legales establecidas para la composición del producto o en relación con los tipos de yogurt, existen los siguientes tipos (Deeth y Fitzgerald, 1976):

- I. <1%
- II. >1 y <3%



- III. >3 y <4%
- IV. >4.5%
- V. Siendo mayor el grado de lipólisis en los yogures con un elevado contenido en grasa.

#### **1.4. Especificaciones, garantía de la calidad y cuestiones de reglamentación relativas a los productos probióticos**

Las reglamentaciones de los gobiernos difieren entre países, pero en la actualidad no se ha establecido a nivel internacional la situación de los probióticos como componente de los alimentos. En su mayor parte, los probióticos se presentan en forma de alimentos y suplementos dietéticos, porque en su mayoría se administran oralmente como alimentos. Estos se diferencian de los medicamentos en diversos aspectos, especialmente en lo que concierne a las declaraciones de propiedades. En el caso de los medicamentos están autorizadas las declaraciones de propiedades relativas a su eficacia en el tratamiento, la mitigación o la cura de una enfermedad, mientras en los casos de los alimentos, los aditivos alimentarios y los suplementos dietéticos sólo pueden hacerse declaraciones de propiedades saludables de carácter general (Adams, 1995).

Con el fin de comprender dónde se ubican actualmente los productos probióticos en lo que respecta a los organismos de reglamentación, y las declaraciones de propiedades que pueden realizarse en relación con su uso, se cita el siguiente ejemplo de los Estados Unidos (Agencia de Alimentos y Medicamentos). Está autorizado el acceso de los consumidores a productos que se ingieren en forma de píldoras, cápsulas, comprimidos y líquidos, o que se venden en forma de cápsulas en tiendas de alimentos dietéticos o a través de Internet (Adams, 1995).

- Se entiende por “declaración de propiedades saludables” una declaración en la que se describe la relación de cualquier sustancia con una enfermedad o un estado de salud. Esa declaración debe basarse en un conocimiento bien establecido y generalmente aceptado de datos de publicaciones científicas y/o recomendaciones de organismos sanitarios nacionales o internacionales. Por ejemplo: “protege contra el cáncer” (Adams, 1995).



- Se entiende por 'declaración de propiedades estructurales/funcionales' una declaración en la que se describe la función de un nutriente o ingrediente alimentario que influye en la estructura o el funcionamiento del organismo humano, o el mecanismo documentado mediante el cual un nutriente o ingrediente alimentario actúa para mantener esa estructura o función. Por ejemplo: 'refuerza el sistema inmunitario'. Las declaraciones en que se afirma que una sustancia puede tratar, diagnosticar, curar o prevenir una enfermedad no son declaraciones de propiedades estructurales/funcionales (Adams, 1995).

La consulta (Consulta de Expertos FAO/OMS sobre Evaluación de las Propiedades Saludables y Nutricionales de los Probióticos en los Alimentos, incluida la Leche en Polvo con Bacterias Vivas del Ácido Láctico, 14 de octubre de 2001) recomendó que se permitan las declaraciones relativas a la propiedad de determinados probióticos de reducir una enfermedad, siempre que se haya demostrado esa propiedad utilizando las directrices esbozadas en el presente informe.

El nuevo paradigma del análisis de riesgos se está abriendo paso en los sistemas de reglamentación de la inocuidad de los alimentos y se centra en una distinción funcional entre la evaluación de riesgos y la gestión de riesgos, basadas ambas en criterios científicos. Sin embargo, actualmente se considera que la cuestión de la comunicación es también una parte importante del análisis de riesgos. La comunicación incluye el intercambio entre evaluadores y gestores y una interacción en ambos sentidos con otras partes interesadas. Dentro de este concepto, se hace hincapié en la transparencia del proceso de adopción de decisiones relativas a la acción reglamentaria en materia de inocuidad de los alimentos, así como en la importancia de ofrecer a los consumidores y otros interlocutores un medio para participar en el proceso de desarrollo. Por consiguiente, las actividades de comunicación relacionadas con la utilización de probióticos deberían considerarse parte integrante de la adopción de iniciativas en materia de reglamentación (Conway, 1987).





### 1.4.1. La legislación vigente de productos probióticos

Muchos académicos, científicos y organismos reguladores están trabajando para encontrar maneras de establecer una base científica que apoye las delegaciones beneficiosas que se asocian a los componentes funcionales o los alimentos que los contienen. Para que los alimentos funcionales puedan aportar todos los beneficios posibles para la salud pública, los consumidores tienen que comprender bien y confiar en los criterios científicos utilizados para documentar sus efectos y atribuciones beneficiosas (Mackay, 1999)

### 1.4.2. La situación en la unión europea

En primer lugar, debe tenerse en cuenta que en la actualidad, en los EU no existe una definición legal del término probiótico, no existe una legislación específica que les sea aplicable, o la categoría más amplia de alimentos funcionales a las que pertenecen. Sin embargo, una serie de consideraciones legislación horizontal se deben tener en cuenta, por ejemplo, de la seguridad alimentaria, el etiquetado y la información sobre el medicamento (Mackay, 1999).

No existe una legislación armonizada sobre las legislaciones de salud, y por lo tanto las cuestiones relativas a dichas legislaciones se resuelven a nivel nacional. El reto en los Estados Miembros de la UE es conseguir, bajo el marco regulador existente, que los mensajes que se comunican no hagan ninguna referencia a que dichos alimentos puedan reducir el riesgo de padecer enfermedades, incluso aunque existan pruebas científicas que avalen dichas afirmaciones. La legislación europea relativa al etiquetado prohíbe atribuir a los alimentos propiedades preventivas, terapéuticas o curativas, y la referencia a dichas propiedades. En ausencia de una Directiva relativa a legislaciones de salud, los Estados Miembros de la UE han aplicado diferentes interpretaciones de la actual legislación sobre etiquetado. A su vez, la opinión generalizada es que las legislaciones de salud deben estar adecuadamente corroboradas para proteger al consumidor, fomentar el comercio justo y potenciar las investigaciones y la innovación en la industria alimentaria (Mackay, 1999).



Durante la pasada década, se tomaron una serie de iniciativas, que se comenzaron en Suecia, para facilitar el uso de las delegaciones de salud, que incluyen la adopción de directrices y procedimientos prácticos en los diferentes Estados Miembros de la UE, como Suecia, Países Bajos y el Reino Unido, éste último mediante la Iniciativa Conjunta con respecto a delegaciones de Salud (Joint Health Claims Initiative, JHCI). En la mayoría de estos países, los expertos en alimentación, las autoridades, los grupos de consumidores y los científicos se han unido para elaborar normas que regulen la justificación científica, la publicidad y la presentación de delegaciones de salud (Mackay, 1999).

#### **1.4.3. La situación en japon**

Japón está por delante del resto del mundo en este aspecto. En 1991, se estableció el concepto de "Alimentos para Uso Específico en la Salud" (Foods for Specified Health Use, FOSHU). Los alimentos que se incluyan dentro de la categoría de FOSHU deben ser autorizados por el Ministro de Salud, tras la presentación de pruebas exhaustivas con fundamento científico, que apoyen las propiedades de dichos alimentos, cuando son consumidos como parte de una dieta ordinaria. Cuando se solicita una licencia FOSHU al Ministerio se debe aportarla siguiente información: 1) ingredientes y composición del alimento, 2) efectos beneficiosos para la salud atribuidos al alimento, Y 3) datos sobre su seguridad (Mackay, 1999)

Una vez aprobado el alimento, se pueden indicar en la etiqueta del producto sus efectos beneficiosos para la salud, pero no de forma exagerada ni engañosa. Los fabricantes no pueden fomentar el consumo excesivo del alimento, ni incitar de forma alguna al consumidor a que no reciba tratamiento médico, ni difamar a los productos de la competencia. Japón es el único país que cuenta con una legislación específica para la comercialización y rotulado de este tipo de alimentos (Mackay, 1999).



#### 1.4.4. La situación en estados unidos

En Estados Unidos se permite desde 1993 que se prueben las propiedades "que reducen el riesgo de padecer enfermedades" en ciertos alimentos. Las "alegaciones de salud" están autorizadas por la Administración para Alimentos y Medicamentos (Food and Drug Administration, FDA), siempre que existan "evidencias científicas públicamente disponibles y haya suficiente consenso científico entre los expertos de que dichas delegaciones están respaldadas por pruebas". Aunque los fabricantes pueden utilizar delegaciones de salud para comercializar sus productos, la intención de la FDA es que el fin de dichas delegaciones sea el beneficio de los consumidores, y que se facilite información sobre hábitos alimenticios saludables, que pueden ayudar a reducir el riesgo de contraer enfermedades, como las afecciones cardíacas y el cáncer. Según la FDA, las legislaciones pueden basarse también en "declaraciones autorizadas" de Organismos Científicos Federales, como los Institutos Nacionales de la Salud (National Institutes of Health) y los Centros para la Prevención y el Control de Enfermedades (Centers for Disease Control and Prevention), así como de la Academia Nacional de las Ciencias (National Academy of Sciences). Algunas de las "declaraciones de beneficios para la salud" autorizadas por la FDA establecen las siguientes relaciones: 1) productos de cereales que contienen fibra, frutas y vegetales, reducen el riesgo del Cáncer; 2) frutas, vegetales y productos de cereales que contienen fibra, particularmente fibra soluble, evitan el riesgo de Enfermedad Cardíaca Coronaria; 3) frutas y vegetales, son beneficiosos en aportar calcio y evitan el padecimiento de osteoporosis; 5) Reducen Sodio e Hipertensión; 6) beneficiosos en ácido fólico, ayudan a evitar defectos del tubo neural (espina bífida, o anencefalia); 7) proteína de soja, reduce del riesgo de enfermedad cardíaca coronaria; etc (Mackay, 1999).

Una gran ayuda para la comercialización de los alimentos y componentes funcionales en los Estados Unidos, ha sido la aprobación del Acta de Suplementos Dietéticos para la Salud y Educación (*Dietary Supplement Health and Education Act-DSHEA*) de 1994. Esta legislación permite el uso de "declaraciones de



estructura función” para los suplementos dietarios sin previa autorización por la FDA. Dichas declaraciones colocadas en el envase de un alimento describen como un componente o un ingrediente alimentario afecta alguna estructura y/o función determinada en un organismo (por ejemplo, “el alto contenido de fibra favorece la regularidad intestinal”, o “el calcio favorece la formación de huesos fuertes”) sin relacionarlo con una enfermedad específica. Debido a que estas declaraciones pueden hacerse sin previa aprobación de la FDA, muchas empresas están escogiendo comercializar los alimentos funcionales como suplementos dietéticos, lo cual es un vacío legal permisible durante el tiempo que la empresa notifica a la FDA 30 días después de la primera comercialización del producto que lleva la declaración (Mackay AD., 1999).

#### **1.4.5 La situación en america latina**

En América Latina, el conocimiento de los alimentos funcionales es relativamente reciente, en algunas ciudades las autoridades sanitarias reconocen legalmente las propiedades saludables de determinados alimentos. Sólo Brasil posee una regulación en la que se define como funcional un componente alimenticio nutritivo o no, que puede producir efectos benéficos para la salud, diferentes de la nutrición básica cuando forman parte de una dieta normal sin ser un medicamento. La Agencia Nacional de Vigilancia Sanitaria Brasileira exige demostrar la seguridad y eficacia de dichos componentes alimenticios para legalizar su publicidad, comercialización y consumo (Mackay, 1999).

#### **1.4.6. Etiquetado apropiado**

La consulta (Consulta de Expertos FAO/OMS sobre Evaluación de las Propiedades Saludables y Nutricionales de los Probióticos en los Alimentos, *incluida la Leche en Polvo con Bacterias Vivas del Ácido Láctico, 14 de octubre de 2001*). Con el fin de aclarar la identidad del probiótico presente en alimento, se declarara en la etiqueta la especie microbiana. Si se ha realizado un proceso de selección en lo que respecta a la cepa, debería incluirse también la identidad de



ésta, dado que el efecto probiótico parece ser específico de cada cepa (Marteau, 2002).

Es necesario enumerar con precisión las bacterias probióticas presentes en los productos alimenticios con el fin de incluirlas en la etiqueta. En ésta debería declararse la concentración viable de cada probiótico presente al final de su período de conservación (Reid et al., 2001c).

#### **1.4.7. Procedimientos de fabricación y manipulación**

Para garantizar que cualquier cultivo conserve sus propiedades beneficiosas, se debe mantener el material cultivado en condiciones apropiadas y comprobar periódicamente la identidad y las propiedades probióticas de la cepa. Por otra parte, se debe mantener la viabilidad y la actividad probiótica durante todo el proceso de elaboración, manipulación y almacenamiento del producto alimenticio que contiene el probiótico, verificándolas cuando concluya el período de conservación (Marteau, 2002).

Deben establecerse programas adecuados de garantía de la calidad. Deben aplicarse buenas prácticas de fabricación en la producción de alimentos probióticos. La Consulta recomendó que se aplicaran los Principios Generales del Codex para la Higiene de los Alimentos y las Directrices del Codex para la Aplicación del HACCP (Comisión del Codex Alimentarius, 1997).

#### **Productos a base de leche en polvo**

Dado que una de las finalidades de la Consulta (Consulta de Expertos FAO/OMS sobre Evaluación de las Propiedades Saludables y Nutricionales de los Probióticos en los Alimentos, *incluida la Leche en Polvo con Bacterias Vivas del Ácido Láctico, 14 de octubre de 2001*). Era examinar las propiedades saludables y nutricionales de la leche en polvo con bacterias vivas del ácido láctico, se consideró necesario estudiar más detenidamente esta cuestión en el presente informe. Se deberían utilizar métodos de producción de probióticos en polvo que permitieran mantener un número suficiente de bacterias probióticas viables en el polvo después de la



fabricación, y asegurar también la retención/estabilidad de las propiedades probióticas durante todo el período de conservación (Rautio, 1999)

La Consulta convino en que no hay información adecuada sobre la estabilidad de los probióticos en la leche en polvo y que se dispone de poca información sobre la cuestión de la calidad de los probióticos después del secado por pulverización. Durante el proceso de secado por pulverización se producen daños en las células y una pérdida de viabilidad del cultivo probiótico (Daemen y van der Stege, 1982; Gardiner et al., 2000).

Por consiguiente, hace falta mejorar los métodos de secado por pulverización a fin de asegurar una mayor supervivencia, incluidas la utilización de agentes protectores que han demostrado potenciar la supervivencia de los lactobacilos (Prajapati et al., 1986; Selmer-Olsen et al., 1999) y la adaptación al medio ambiente (Desmond et al., 2001).

La estabilidad probiótica durante el almacenamiento en forma de polvo está inversamente relacionada con la temperatura de almacenamiento, y se han indicado métodos para resolver este problema. Aunque no se indica en las publicaciones, ciertas empresas que producen cultivos matrices tienen la tecnología necesaria para producir bacterias del ácido láctico liofilizadas, incluidos probióticos que están 'estabilizados' y por consiguiente conservan un alto grado de viabilidad durante el secado y el almacenamiento. La incorporación de esos cultivos desecados en la leche en polvo podría ser el método elegido para preparar productos a base de leche en polvo que contengan probióticos. Sin embargo, es necesaria una investigación, incluidas pruebas de almacenamiento para confirmar la viabilidad de ese proceso. Por lo que respecta a la viabilidad de los probióticos, deberían examinarse atentamente factores como los siguientes (Gardiner et al., 2000):

- Método de secado
- Tipo de envasado
- Dimensiones del envase



- Condiciones de almacenamiento (temperatura, humedad, etc.)
- Calidad de la leche en polvo (referencia a la Norma)
- Procedimiento de rehidratación
- Manipulación del producto rehidratado

#### 1.4.8. El mercado de los alimentos funcionales

La estimación del tamaño del mercado no es sencilla, especialmente por no existir un consenso global respecto a la definición de alimentos funcionales. Es así como pueden encontrarse diversos estudios cuyas cifras y proyecciones varían en forma significativa (Gardiner et al., 2000).

A principios del 2000's se estimaba que el mercado de los alimentos funcionales aumentaría a tasas del 15% (se proyectaba un mercado global de alimentos funcionales que podía llegar a cifras entre US\$ 28 billones y US\$ 51 billones para el 2003) mientras que el de la industria alimentaria tradicional crecía a tasas de sólo 1% a 3%. En una visión más actualizada recogida por la consultora Datamonitor, al año 2007 la combinación del mercado de Europa, USA y Asia Pacífico alcanzaba los US\$72,3 billones. La misma empresa proyecta una tasa de crecimiento compuesto anual (CAGR) del 5,7% entre 2007 y 2012. Por su parte Just-Food, otra firma especializada en mercado de la industria de alimentos, proyecta que al 2013 el mercado global de alimentos y bebidas funcionales alcanzará al menos del orden de los US\$ 90,5 billones (Richard, 2000).

En una estimación actualizada al año 2007 por la empresa Datamonitor, Asia Pacífico es el principal mercado a nivel global con una participación del 50,6%, seguido siempre por los Estados Unidos con un 37,7% y Europa con 11,7% (Tabla10). Japón es el país pionero en cuanto a innovación en el mercado de los productos funcionales y por lo tanto es el que marca las tendencias que posteriormente se van a desarrollar en el resto de mercados. Por su parte Estados Unidos representa el mercado más dinámico y de mayor proyección de crecimiento a nivel global (Richard, 2000).



En Europa los mercados principales son: Reino Unido que es un mercado de alta tradición hacia productos alimentarios de mayor valor, y que históricamente ha sido un mercado preocupado de temas del bienestar animal y donde productos especiales como los orgánicos han tenido buen desarrollo, Francia también participa con su tradición gourmet y preocupada por la alta cocina, Alemania, España e Italia son los otros mercados europeos relevantes. Un mercado que también se presenta interesado en estos productos es el de Australia que en alimentos se ha ido sofisticando a través de los años, en parte como producto de su cercanía a Japón, mercado de importancia para varios rubros de la producción australiana y que también cuenta con inversiones de ese origen en algunas industrias (Tabla 11) (Richard,2000).

Tabla 11. Mercado de Alimentos Funcionales (US\$ millones) en Estados Unidos, Europa y Asia Pacífico 2007 – 2012

	2007	2012	CAGR (%)
Estados Unidos	5 36.653	0 6	1
27.230			
Europa 8.476	9 10.667	3 4	7
Asia - Pacífico 36.616	4 48.027	7 5	6
Total 72.323	8 95.348	0 5	7

**Fuente:** Data monitor, Functional food, drinks and ingredients: consumer attitudes and trends (Richard, 2000).

Respecto a la participación en el mercado de alimentos funcionales, la categoría principal son los productos lácteos, con 40%, debido a su importancia en Japón y Europa. La segunda categoría son los productos de panadería y cereales, con un 35% de representación en las ventas y que están principalmente concentrados en los Estados Unidos donde ha ocurrido un importante fortalecimiento del mercado de los cereales para el desayuno (Richard, 2000).





Las bebidas y los productos para untar representan una menor participación que sería del orden del 10%. Un estudio reciente sobre la tendencia de los ingredientes funcionales realizado en el 2007 por la empresa Business Insight, analiza el comportamiento de la participación de alimentos funcionales en el lanzamiento de nuevos productos alimentarios por segmento durante el periodo 2004 – 2007. En la Figura 6 se presenta una gráfica donde se aprecia que lácteos y bebidas o refrescos son los sectores que tienen una mayor participación porcentual de la categoría AF entre los nuevos productos lanzados al mercado; en ambos casos con alrededor del 2,5% (Spinosa, 2000).

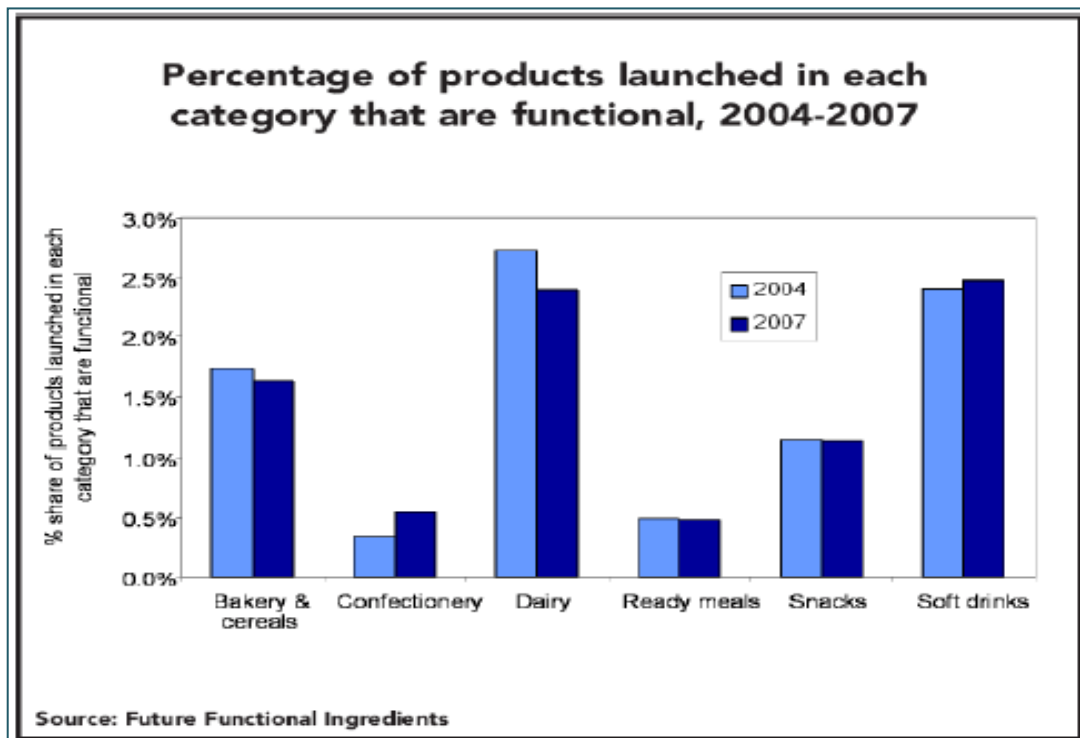


Figura 6. Porcentaje de alimentos funcionales lanzados al mercado por categoría durante el período 2004 – 2007. (Spinosa, 2000).

Si bien el panorama de los alimentos funcionales es alentador, se ve oscurecido por otra tendencia del mercado que va en sentido contrario: la búsqueda de alimentos con componentes naturales. En un reciente informe se advierte cierto escepticismo de los consumidores hacia los productos funcionales. En este



trabajo, la empresa registró un número importante de consumidores de los países de Asia, Europa y Estados Unidos, que creen que los alimentos funcionales solo sirven para que las compañías le agreguen un precio "Premium" a sus productos (Spinosa MR.,2000).

## **1.5. MÉTODOS PARA LA AUTENTIFICACIÓN DE ALIMENTOS.**

Debido a su sensibilidad, especificidad, robustez y rapidez en comparación con los métodos basados en proteínas, la PCR parece ser la prueba ideal para confirmar la identidad y cuantificar las especies presentes en los productos alimenticios de carne, lácteos y marinos, además de detectar y cuantificación de las líneas de genes derivados de organismos genéticamente modificados (OGM). Los primeros métodos para la discriminación de las especies se basaron en la hibridación ADN-ADN con sondas específicas. Sin embargo, más recientemente, la amplificación de especies específicas de secuencias diana de ADN a través de la PCR ha demostrado ser una técnica más sensible y rápido. Además, el análisis de restricción de amplificaciones resultantes ha permitido que la discriminación sea aún mayor (López. M. et al., 2003).

### **1.5.1. Historia y desarrollo**

Hasta mediados de los 80's, la única estrategia posible para aislar un gen y obtener grandes cantidades del mismo en estado puro era el "clonado molecular". Este método se basa en la introducción de fragmentos de ADN, uno de los cuales contendrá el gen de interés, en vectores. Éstos son moléculas de ADN (plásmidos o ADN de bacteriófagos) capaces tanto de transportar fragmentos ajenos a su estructura original como de multiplicarlos dentro de bacterias. Si se conoce un pequeño tramo de la secuencia de aminoácidos de una proteína cuyo gen se desea "clonar" (multiplicar), se pueden diseñar métodos para identificar qué bacterias llevan el vector que transporta dicho gen. Este reconocimiento también se puede realizar si se dispone de un anticuerpo contra la proteína resultante del gen que se desea clonar. En este caso se reconoce la bacteria portadora porque fabrica la proteína codificada por el fragmento de interés, la cual se une



específicamente al anticuerpo. Una vez aislado el gen no sólo resulta posible determinar con exactitud su secuencia de bases o analizar en detalle la información de la que es portador, sino que también se puede estudiar su expresión (la manera en que dirige la síntesis de la proteína correspondiente) en distintos organismos y tipos celulares, introducido en células en cultivo o en animales de experimentación, etcétera. Estas técnicas, ya clásicas, han permitido el aislamiento y caracterización de decenas de miles de genes de microorganismos, animales y plantas, lo que provocó un cambio cualitativo en la comprensión del funcionamiento de la célula (Sanchinandan D.et al., 2001)

En 1985, K. Mullis, un investigador de la Corporación Cetus, inventó un método para lograr la multiplicación in vitro de fragmentos definidos de ADN sin necesidad de recurrir a los vectores y su replicación en bacterias. Este método revolucionaría en corto tiempo el conjunto de técnicas de la biología molecular. Su uso se extendió rápidamente a miles de laboratorios, no sólo de investigación básica, sino también de diagnóstico clínico. Se trata de la reacción en cadena de la polimerasa, ya muy conocida como PCR, siglas provenientes del inglés Polymerase Chain Reaction (López. M. et al., 2003).

Esta técnica permite multiplicar ("amplificar" es, en realidad, el término que se ha impuesto) pequeñas cantidades de ADN entre cientos de miles y millones de veces. El tramo destinado a reproducirse puede tener desde cincuenta hasta más de dos mil nucleótidos de longitud. El segmento de ADN que sirve de molde no requiere estar necesariamente en estado puro, sino que puede ser parte de mezclas complejas. Cuando el proceso era manual la técnica de PCR era lenta y requería de trabajo intensivo. Por lo tanto, los científicos de Cetus comenzaron a buscar las maneras de automatizar el proceso (López. M. et al., 2003).

La purificación de la polimerasa de Taq dio lugar a la necesidad de una máquina que realizará un ciclo más rápidamente entre diversas temperaturas. En 1985, Cetus se asoció con la corporación Perkin-Elmer e introdujo la DNA Thermal Cycler. De esta manera es posible mezclar todos los componentes de la PCR al comenzar el primer ciclo y la reacción en cadena puede llevarse a cabo mediante equipos



automatizados que realizarán los ciclos térmicos programados (López. M. et al., 2003).

En 1989, Cetus anunció un acuerdo de colaborar con Hoffman-LaRoche en el desarrollo y la comercialización de productos de diagnóstico humanos in vitro y de servicios basados en tecnología de PCR.

En 1990, los científicos alcanzan la primera amplificación y detección simultánea de las secuencias específicas de DNA usando un colorante fluorescente, poniendo el fundamento para la PCR en tiempo real o PCR "cinético" (pruebas **TaqMan**).

En 1991 Hoffmann-La Roche Inc. adquiere los derechos y las patentes mundiales de la PCR. El Dr. Kary Mullis comparte el premio Nobel de Química en 1993 por inventar la tecnología de PCR.

La PCR es un método in vitro de síntesis de ADN con el que un segmento particular de éste es específicamente amplificado al ser delimitado por un par de cebadores o iniciadores que lo flanquean. Su copiado se logra en forma exponencial a través de repetidos ciclos de diferentes periodos y temperaturas de incubación en presencia de una enzima ADN polimerasa termoestable. Así se obtienen en cuestión de horas millones de copias de la secuencia deseada del ADN (Mullis, 2003).

### **1.5.2. Reacción de la cadena de la polimerasa (PCR)**

La PCR es una técnica de biología molecular altamente específica, rápida, sensible y versátil para detectar cantidades ínfimas de un cierto ADN específico, posibilitando su fácil identificación y prescindiendo del uso de radioisotópicos, indispensables antes de su invención (Diagn, 1992).

Al principio, su inventor enfrentó dos problemas fundamentales: uno era que en cada ciclo había que añadir la enzima ADN polimerasa, ya que ésta se inactiva con las temperaturas tan altas demandadas para desnaturalizar el ADN y exponer las bases nitrogenadas de sus nucleótidos. Otra inconveniente era que había que hacerlo manualmente en tres baños mantenidos a las diferentes temperaturas



requeridas, pasando rápidamente la muestra de un baño al otro y luego al último, repitiendo esto varias decenas de veces (Mullis,1986).

El descubrimiento de una bacteria (*Thermus aquaticus*) que vive en aguas termales junto a geissers a 75°C, la cual tiene una ADN polimerasa que funcionaba bien a altas temperaturas (72°C) e incluso es estable a 94°C, supuso un gran avance, ya que sólo tenía que ser añadida al principio y se mantenía activa durante todo el proceso (Saiki RK.,1988) Esto, junto con el diseño de los termocicladores o aparatos que consisten en un bloque que puede ser programado para calentarse y enfriarse rápidamente en determinados tiempos, condujo a la automatización total del proceso (Mullis,1986).

### **1.5.3. Fundamento de pcr**

El fundamento se basa en la síntesis de millones de copias de un fragmento específico de DNA delimitado por el apareamiento de dos moléculas cebadoras sintéticas (primers) con la molécula de DNA. La síntesis y copia del fragmento de DNA sucede por la acción de una DNA polimerasa, que une ácidos nucleicos sintéticos a la hebra simple de la molécula de DNA (que resulta de la desnaturalización de la cadena doble original), formando una cadena doble que posteriormente será sujeto de desnaturalización y plantilla de nuevas moléculas de DNA. (Calleja, 2003).

### **1.5.4. Elementos que conforman la pcr primers:**

Los oligonucleótidos iniciadores o primers son fragmentos complementarios que se van a unir a cada una de las dos cadenas separadas del templado de ADN.

La selección de oligonucleótidos indicadores es muy importante en la reacción en cadena de la polimerasa. De este paso depende el éxito en el laboratorio. En la Tabla 12 se muestran los criterios principales a considerar para la selección adecuada de los primers (Micklos.et.al, 2003).



Tabla 12. Características de la PCR

Tamaño	Tamaño ideal: 20-25 nucleótidos de longitud generalmente 18-30 nucleótidos de longitud
Base en el extremo 3´	Debe ser una G o una C
Temperaturas de fusión (Tm)	50-65 °C
Contenido GC	40-60%
Auto complementariedad	Debe ser evitada Para minimizar la formación de estructuras secundarias y los dímeros de primer
Similaridad	Debe tener un 100% de apareamiento con el molde

**Fuente:** Micklos.et.al, 2003.

Cuándo el objetivo a amplificar es un locus, la posición de los iniciadores debe ser relativa a los codones de inicio y terminación. Es recomendable que el cebador “forward” se encuentre más o menos a 35 pb del inicio de la secuencia que codifica, de la misma forma el cebador “reverse” debe localizarse 35 pb después de la región que codifica (Micklos.et.al, 2003).

Las concentraciones óptimas de los primers son generalmente entre 0.1 y 0.5  $\mu$ M. altas concentraciones de primer pueden promover “mispriming” y acumulación de producto no específico y puede incrementar la probabilidad de generar un templado independiente llamando dímero de primer. Los productos no específicos y los dímeros de primers son por si mismos sustratos para PCR y compiten con el producto deseado por encima, DNTPs y primers, resultando en un bajo rendimiento del producto deseado. Una razón menos obvia por la que los primers pueden contener extensiones en el extremo 5´ o “mismatches” para incorporar sitios de enzimas de restricción, un codón de inicio ATG, o secuencias promotoras en la secuencia blanco. Pueden ser usados primers degenerados para extraer



genes nuevos en base a su similitud o su secuencia de aminoácidos (Micklos.et.al, 2003).

Los primers fallan en la presencia de estructuras secundarias en el templado de DNA. En este caso la sustitución de dGTP por 7-deazo-2' deoxiGTP ha sido muy usada (Micklos.et.al, 2003).

**Especificidad:** La especificidad de los primers es en parte dependiente de su longitud. Los primers deben ser elegidos de modo que tengan una secuencia única dentro del DNA que será amplificado. Un primer diseñado con una secuencia altamente repetida dará lugar a productos no deseados. Sin embargo, el mismo primer puede dar una sola banda si se amplifica una sola clona de una biblioteca genómica (Micklos.et.al, 2003).

**Secuencias complementarias del primer:** Los primers necesitan ser diseñados con menos de 3 pares de bases de homología entre ellos. Si un primer tiene tal región de homología se formarán estructuras parciales de doble cadena que interferirán con el alineamiento. Si la homología ocurre en el extremo de 3' de cualquier primer, ocurrirá la formación de dímeros de primer que, a menudo, prevendrá la formación del producto deseado por competición (Micklos.et.al, 2003).

**Contenido de g/c:** La composición base de los primers debe estar entre el 45% y el 55% de GC. La secuencia de los primers debe ser elegida de tal forma que no haya regiones de poliG o depoliC que puedan promover el reconocimiento no específico. Las regiones poliA y poliT deben también ser evitados ya que interfieren con el complejo del primer-templado. Esto puede bajar la eficacia de la amplificación. El primer tendrá un contenido de G/C del 50% y 20 bases de largo. Esto pondrá la Tm en la gama de 56°C-62°C (Micklos.et.al, 2003).

**Secuencia de los extremos 3':** Es establecido que la posición terminal 3' en primers de PCR es esencial para el control del "mispriming". La inclusión de un residuo de G o de C en el extremo 3' de los primers ayuda a asegurar el correcto enlace en el extremo terminal 3' debido al enlace de hidrógeno más fuerte de los



residuos G/C. También ayuda a mejorar la eficacia de la reacción reduciendo al mínimo la respiración que pudo ocurrir (Micklos.et.al, 2003).

**Temperatura de asociación:** La temperatura de asociación de los primers es uno de los factores más determinantes de la reacción. Se recomienda que se emplee como temperatura de asociación la temperatura de fusión  $-5^{\circ}\text{C}$ , aproximadamente. Existen muchos métodos para calcular la temperatura de fusión, pero siempre, después de efectuado el cálculo es necesario ir al laboratorio y ensayar con diferentes temperaturas de asociación cercanas a la temperatura de fusión para determinar la temperatura óptima para cada reacción (Micklos.et.al, 2003).

#### 1.5.5. Cálculo de la temperatura de fusión (T<sub>m</sub>)

Existen muchos métodos para estimar el valor de la temperatura de fusión. Para secuencias de 20 bp o menos, existe la siguiente aproximación (Micklos.et.al, 2003):

$$T_m = 2^{\circ}\text{C} (A + T) + 4^{\circ}\text{C} (G + C)$$

Donde:

A se refiere al número de adenina  
T se refiere al número de Tiamina  
G se refiere al número de Guanina  
C se refiere al número de Citocina

Donde se asume una concentración de sal de 0.9M, típica de "dot blot" y otros ensayos de hibridización. A continuación tenemos otra expresión para el cálculo de T<sub>m</sub>

$$T_m = 81.5 + 0.41 (\%GC) - 500/L + 16.6 \log[M]$$

Donde:

L se refiere a la longitud del oligonucleótido.  
[M] es la concentración de cationes monovalentes.  
Esta fórmula es únicamente aplicable a secuencias polinucleotídicas largas.





El método más preciso para estimar la  $T_m$  de oligonucleótidos está basado en el análisis termodinámico del proceso de fusión del cual se puede mostrar que,

$$T_m = \frac{\Delta H}{\Delta S + R \ln(C)} - 273.15$$

Los cambios en la entalpía ( $\Delta H$ ) y la entropía ( $\Delta S$ ) de la formación del dúplex se calculan a partir de parámetros termodinámicos de vecindades.  $R$  es la constante molar de los gases ( $1.987 \text{ cal.K}^{-1}\text{mol}^{-1}$ ), y  $C$  es la concentración molar del oligonucleótido. Se puede adicionar un segundo término a la ecuación anterior para tener en cuenta el efecto estabilizante de la sal sobre el dúplex (Walter J. Et al., 2006):

$$T_m = \frac{\Delta H}{\Delta S + R \ln(C)} - 273.15 + 12.01 \log[Na^+]$$

Los efectos de  $Na^+$  y  $K^+$  son equivalentes dentro de los márgenes del error experimental.

#### 1.5.6. Programas de diseño de primers

Existen programas disponibles en la red que ayudan al diseño de primers. Por ejemplo:

- <http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3> [www.cgi](http://www.cgi)
- <http://alces.med.umn.edu/rawprimer.html>

**Templado:** Una de las características más atractivas de la PCR es que la cantidad y calidad de la muestra de DNA sujeta a amplificación no necesita ser alta. Una sola célula o un lisado celular crudo o especímenes con una longitud promedio de unos pocos cientos de pares de bases son usualmente adecuadas para una amplificación exitosa. El criterio esencial es que la muestra contenga al menos una cadena de DNA intacta que abarque la región que va a ser amplificada y que las impurezas sean suficientemente diluidas como para no inhibir la polimerización (Walter et al., 2006).

**DNA polimerasa termoestable:** La enzima polimerasa se encarga de unir nucleótidos los DNTP's a la cadena complementaria a partir del cebador,



formando una nueva cadena doble de DNA a partir de una cadena sencilla. Sólo pueden utilizarse polimerasas que sean capaces de actuar a las altas temperaturas empleadas en la reacción. En la actualidad la mayoría de las polimerasas que se suministran comercialmente son versiones recombinantes e incluso mejoradas por ingeniería genética. Dos enzimas de uso muy extendido son la ADN polimerasa Taq, proveniente de la bacteria termofílica *thermus aquaticus* (Saiki,1988) y la *venta* de la bacteria *thermococcus litorali*. Sus temperaturas óptimas de catálisis oscilan alrededor de los 72°C, temperatura a la cual incorporan aproximadamente 100 nucleótidos por segundo, siendo estables a altas temperaturas, incluso por encima de 92°C (Cariello, 1991).

Un rango de concentración recomendado para *Taq* polimerasa (Perkin-Elmer CETUR) es entre 1 y 2.5 unidades (SA = 20 unidades/pmol) por 100 µl de reacción cuando los otros parámetros son óptimos. Sin embargo, los requerimientos de enzima pueden variar con respecto a la secuencia blanco o los primers. Cuando se optimiza un PCR, se recomienda probar rangos de concentración de enzima de 0.5 a 5 unidades/100 µl. Si la concentración de la enzima es muy alta se acumulan productos no específicos, y si es muy baja se formara una cantidad insuficiente del producto deseado (Tabla 13) (Walter et al., 2006).

Tabla 13. Características de algunas polimerasas termoestables de DNA.

Enzima	Eficiencia relativa <sup>a</sup>	Tasa de error <sup>b</sup>	Procesividad <sup>c</sup>	Tasa de Extensión <sup>d</sup>	3' a 5' exo	5' a 3' exo
Taq Pol	88	$2 \times 10^{-4}$	55	75	No	Si
Tli Pol (Vent)	70	$4 \times 10^{-5}$	7	67	Si	No
Pful Pol	60	$7 \times 10^{-7}$	n.d	n.d	Si	No
Ruth	n.d	n.d	30	60	no	si

Fuente: Cariello NF, 1991



- a Porcentaje de conversión de templado a producto por ciclo.
  - b Frecuencia de error por pares de bases incorporadas.
  - c Número promedio de nucleótidos adicionados antes de la disociación.
  - d Número promedio de nucleótidos adicionados por segundo.
- n.d. = no determinado

**Concentración de magnesio:** Tanto el ión magnesio como el manganeso tienen una función crítica en la reacción, requiriéndose a una concentración que oscila regularmente entre 0.5 y 2.5 mM. La concentración de  $MgCl_2$  debe optimizarse para cada ensayo en particular, ya que puede tener efecto tanto en la especificidad como en el rendimiento de la reacción. En general, concentraciones insuficientes de  $Mg^{+2}$  dan lugar a bajo rendimiento, mientras que en exceso se obtienen amplificaciones inespecíficas. Es benéfico optimizar la concentración del ión magnesio, ya que afecta: el alineamiento de los primers, la temperatura de disociación de las cadenas, tanto del templado como del producto de PCR, la especificidad del producto, la formación de dímeros de primer y la actividad y fidelidad de la enzima. La *Taq* polimerasa requiere magnesio libre en la unión con el templado, los primers y los dNTPs. Los PCR deben contener 0.5 a 2.5 mM de magnesio sobre el total de la concentración de dNTP. La presencia de EDTA u otros quelantes en el stock del primer o del templado puede alterar la concentración óptima aparente de magnesio (Walter et al, 2006).

**Un tampón tris-HCL:** Un buffer recomendado para PCR es de 10-50 mM de Tris-HCl (pH entre 8.3 -8.8). Tris es un buffer iónico bipolar que tiene un pKa de 8.3 a 20°C y un pKa de -0.021/°C sin embargo el verdadero pH de un buffer de 20mM de Tris (pH 8.3 a 20°C) varía entre 7.8 y 6.8 durante las condiciones típicas del termociclador. Hasta 50 mM de KCl puede ser incluido en la mezcla de reacción para facilitar el alineamiento de los primers. NaCl a 50 mM o KCl arriba de 50 mM inhibe la actividad de la *Taq* polimerasa. La gelatina o la albúmina bovina (100 µg/ml) y detergentes no iónicos como el tween 20 o laureth 12 (0.05 a 0.1%) son incluidos para ayudar a estabilizar la enzima, sin embargo muchos protocolos trabajan bien sin estos componentes (Walter et al., 2006).



**Desoxirribonucleósidos trifosfatados (dNTPs):** Los cuatro dNTPs (dATP, dTTP, Dctp y Dgtp (Fig. 7); distinguibles por sus bases nitrogenadas) son los ladrillos con los que se construyen las nuevas cadenas de ADN (Walter et al., 2006).

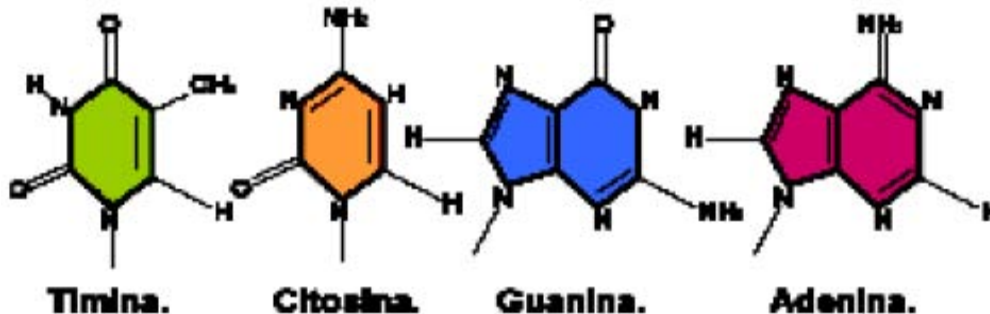


Figura 7. Bases nitrogenadas. Estos componentes de los nucleótidos son la clave de la especificidad del apareo de las cadenas del ADN, apareándose siempre una purina con una pirimidina (Walter et al., 2006).

La variación en su concentración afecta la especificidad y fidelidad de la reacción. Concentraciones altas de los mismos hacen disminuir la fidelidad con la que la polimerasa efectúa su trabajo, e incluso pueden llegar a inhibir su actividad. También afecta a la fidelidad de la reacción el uso de concentraciones desbalanceadas de estos cuatro ingredientes, siendo las concentraciones usuales en la mayoría de los casos, entre 0.2 a 1 Mm (Walter et al., 2006).

Los DNTPs pueden captar iones de magnesio por lo que las concentraciones de ambos componentes deben guardar siempre la misma relación, aconsejándose que la concentración de  $Mg^{+2}$  sea 0.5 a 1 mM superior a la concentración de los DNTPs (Walter J. Et al., 2006).

**DNA:** La cantidad de DNA molde puede ser tan sólo 1 ng en el caso de material genético clonado (en virus o plásmidos) o un mínimo de 20 ng, cuando se utiliza ADN genómico proveniente de células eucariotas. De hecho, como se ha mencionado arriba, el molde puede ser también ARN que sea previamente transformado en ADNc mediante transcripción reversa. Hay muchas formas posibles de preparar el molde para PCR (Walter et al., 2006).



En general, no es necesario purificar el molde porque la reacción puede tolerar la presencia de impurezas, pero hay que tener mucho cuidado de eliminar, lo más posible, la presencia de inhibidores de la polimerasa (Walter et al., 2006).

### 1.5.7. ETAPAS DE LA PCR

**Desnaturalización:** El sustrato de la enzima de la PCR es el ADN de simple cadena que actúa como molde para la síntesis de su nueva cadena complementaria. Mediante un calentamiento a 94°C, el ADN de la doble cadena logra que sus cadenas se separen o desnaturalicen (Fig. 8) (Walter et al., 2006).

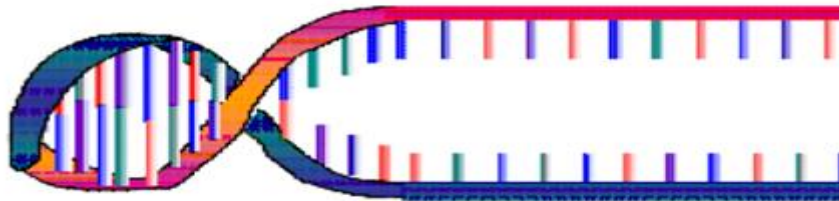


Figura 8. Desnaturalización del ADN. Los puentes se rompen dejando al ADN en forma de cadena sencilla, permitiendo así exponer las diferentes bases nitrogenadas para la hibridación con los oligonucleótidos cebadores (Walter et al., 2006).

Ésta es una etapa crítica, ya que es muy importante que el ADN molde se desnaturalice completamente, lo que se consigue a temperaturas de 94°C, durante por lo menos un minuto. Si la muestra tiene alto contenido de G+C, se recomienda aumentar de preferencia el tiempo (Walter et al., 2006).

Sin embargo, hay que tener en cuenta que la actividad de la enzima decrece de manera muy rápida a partir de los 95°C (vida media a 92.5°C = 2h, a 95°C=4 MIN Y A 97.5°C= 5 min), por lo que a estas temperaturas o superiores es aconsejable disminuir el tiempo de incubación. En la práctica se suele empezar con un periodo de desnaturalización prolongado (cinco minutos a 94°C), para asegurarse que la desnaturalización se lleve a cabo a lo largo de toda la molécula del ADN (Walter et al., 2006).



**Alineamiento:** La enzima, como todas las ADN polimerasas, necesita del grupo  $\text{OH}^-$  libre en el extremo 3' del iniciador ya apareado al sitio blanco de la amplificación, a partir de donde iniciar la síntesis. Este punto constituye el sitio de crecimiento de la cadena complementaria al molde (Figura 9). (Walter et al., 2006).

Mientras que un cebador (referido como el 5' o sentido) es complementario a la secuencia del extremo 5' de la región del ADN molde a amplificar, el otro es al extremo 3' de la misma, pero en la cadena opuesta (Walter et al., 2006).

El alineamiento específico de ambos cebadores se produce a una temperatura determinada por composición de bases y oscila entre 40 y 72°C. Ambas cadenas originales del ADN sirven simultáneamente como moldes para sintetizar sus respectivas cadenas complementarias nuevas (Walter et al., 2006).

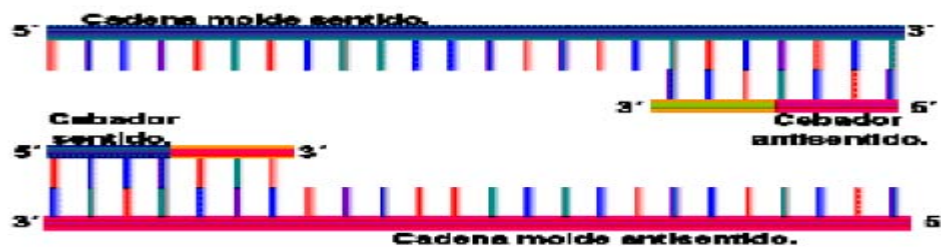


Figura 9. Inicio de la reacción de la PCR. Los cebadores complementarios que flaquean al sitio a amplificar se enlazan formando puentes de hidrógeno. De esta manera la polimerasa puede comenzar a extenderlos para copiar ambas hebras (Walter et al., 2006).

**Extensión:** Con el ADN molde de cadena sencilla, excepto en los sitios donde los iniciadores se aparean, la polimerasa empieza a copiar la hebra, incorporando desoxirribonucleósidos monofosfatos en dirección  $5' \rightarrow 3'$ . Esta etapa debe realizarse a una temperatura alta, que es la que coincide con la máxima actividad de la polimerasa (72°C) para evitar alineamientos inespecíficos de los iniciadores (Figura 10) (Walter et al., 2006).

El tiempo de extensión depende del tamaño de la amplificación, debiendo estimar 1 min. Para alargar 1000 nucleótidos. Es común que al finalizar todos los ciclos se



realice un último alargamiento por 5 min a 72 °C, para asegurarse que todos los productos de amplificación estén completamente terminados y tengan, por ende, exactamente la misma longitud (Walter et al., 2006).

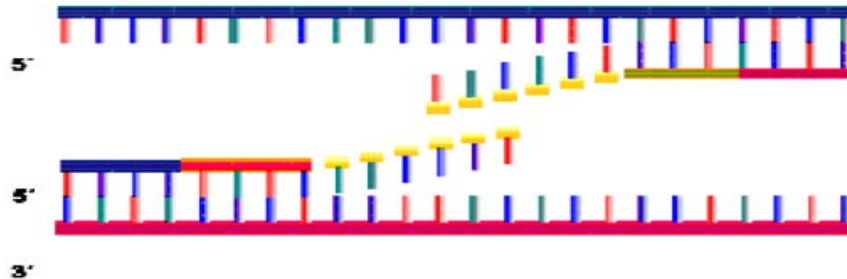


Figura 10. Progreso de la reacción de la PCR. A la temperatura óptima de la ADN polimerasa Taq (72°C), la enzima agrega los dNTPs a partir del 5' hasta el extremo 3' (Walter et al., 2006).

### 1.5.8 Funcionamiento de la PCR

La reacción consta, por lo regular, de una treintena de ciclos repetitivos conformados cada uno de tres pasos: el primero consiste en la ruptura de los puentes de hidrógeno del ADN para desnaturalizarlo, para lo que se incubaba a una temperatura de alrededor de 95°C, por un minuto. Este paso expone las bases nitrogenadas del ADN blanco. En el segundo ocurre la hibridación de las cadenas desnaturalizadas del ADN blanco con los denominados cebadores o iniciadores (ADN sintético de hebra sencilla, Fig. 11), a una temperatura que facilita el apareamiento de las bases nitrogenadas complementarias de ambas clases de ADNS. Esta temperatura depende de la temperatura de fusión  $T_m$  de los iniciadores, lo cual puede calcularse mediante una fórmula, pero generalmente oscila entre 50 y 60 °C. El tercer paso se efectúa a 72°C, temperatura a la cual la polimerasa extiende la longitud de los cebadores, añadiendo los diferentes nucleótidos libres en el orden que le va dictando la secuencia de nucleótidos de la cadena que actúa como molde (Baumforth, 1999).

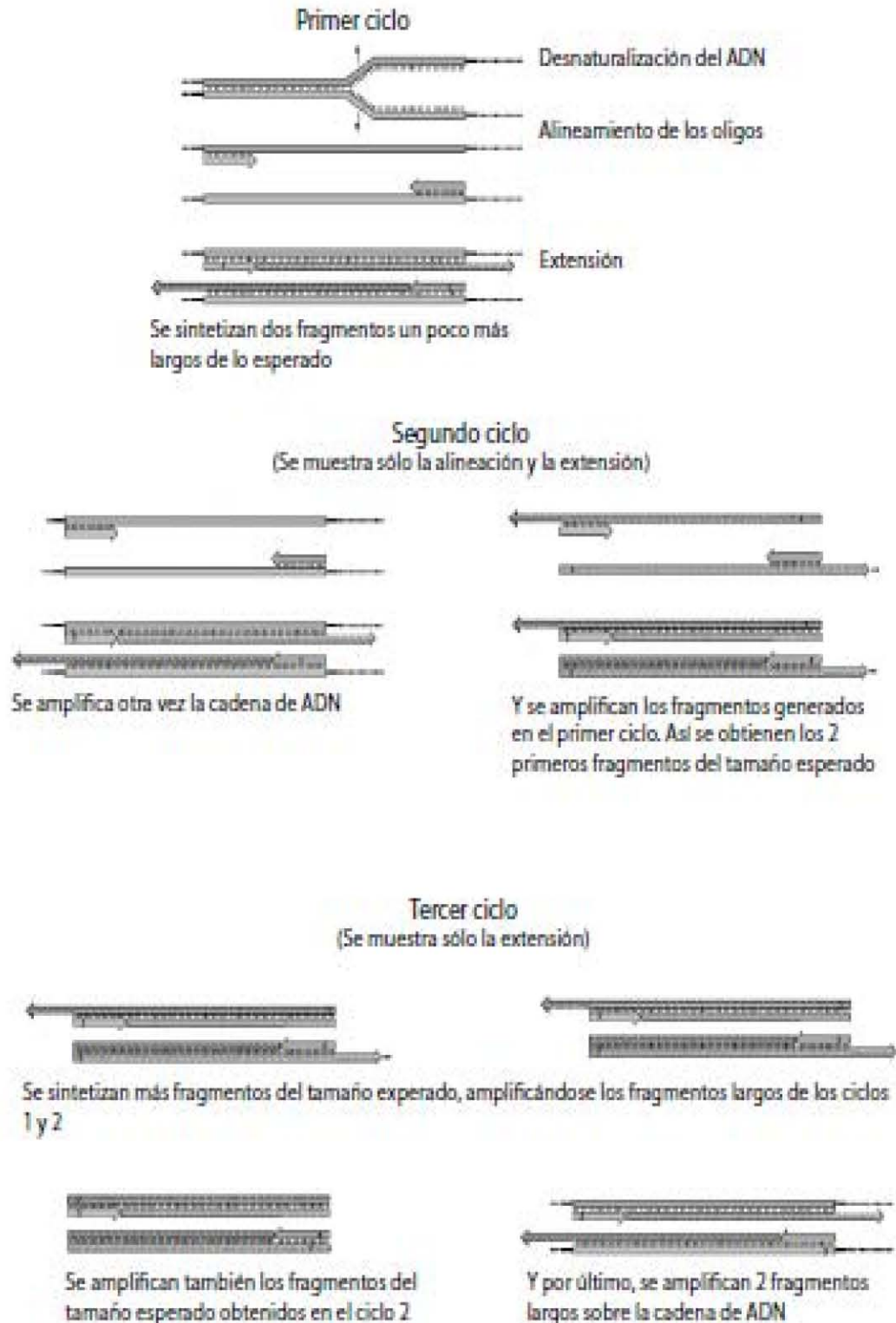


Figura 11. Funcionamiento de PCR Fuente Parkes H. 2003





### 1.5.9. Naturaleza exponencial de los ciclos

Al final del primer ciclo, ambas hebras de una molécula bicatenaria de ADN a las que se les hayan apareado los iniciadores han sido copiadas para generar dos nuevas cadenas bicatenarias. Cuando se repite por segunda ocasión el ciclo de tres pasos, las dos moléculas del primer ciclo se copian para producir ahora cuatro moléculas. El tercer ciclo genera ocho moléculas. En teoría, 20 ciclos producirán aproximadamente un millón de copias de la molécula molde de ADN, y 30 ciclos generaran alrededor de mil millones de copias de ésta (Baumforth, 1999)

Pero en la práctica, el proceso no es tan eficiente. El número de ciclos que se utiliza adquiere gran relevancia a la hora de optimizar una PCR. Este número depende de la cantidad de ADN que existe en la muestra una vez que el resto de factores han sido optimizados (normalmente de manera empírica) (Baumforth, 1999). Es importante evitar un número alto de ciclos, ya que pueden dar lugar a la amplificación de productos no deseados originados por hibridaciones inespecíficas (Figura 12) (Baumforth, 1999).

Hay que tener en cuenta que la enzima sufre el efecto meseta que describe la atenuación en la tasa de la acumulación del producto, reflejándose esto en que después de un número determinado de ciclos la amplificación deja de comportarse de manera exponencial, volviéndose aritmética, y finalmente llega a una fase estacionaria. Afortunadamente, cuando el efecto meseta se presenta, la cantidad de ADN sintetizado es suficiente para su posterior utilización (Baumforth, 1999).

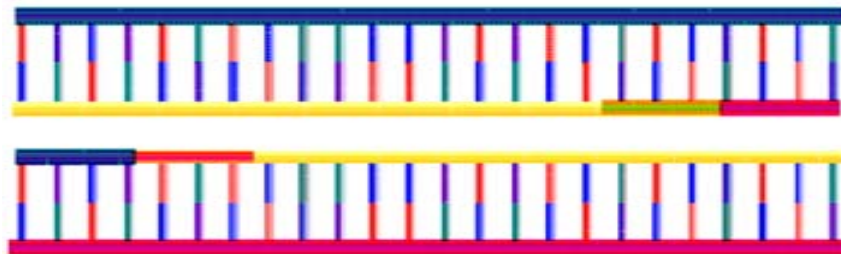


Figura 12. Conclusión de la PCR. Teóricamente entre más ciclos de reacción integren el programa de amplificación, más productos idénticos se generarán. Pero al aumentar los ciclos también se aumenta proporcionalmente la posibilidad de agregar errores en las nuevas secuencias (Baumforth, 1999).



### 1.5.10. Ventajas y desventajas de la PCR

#### ***Ventajas***

- Conocimiento y manejo de la técnica en la mayoría de los laboratorios.
- No se requiere tanta cantidad de DNA como en la técnica anterior.
- La producción de productos de PCR (secuencias de ADNA amplificadas) aumenta de manera exponencial, hasta alcanzar una meseta entre los ciclos de amplificación 30 y 40, debido fundamentalmente a que algunos de los componentes de la reacción son limitantes.
- Los puntos de la PCR se miden en distintos puntos de la reacción en cadena, y las concentraciones obtenidas se representan en función de la cantidad.

#### ***Desventajas***

- Laboriosa
- Requiere mucho tiempo
- Marcaje de la sonda
- Se requieren grandes cantidades de muestra de ADN

### 1.5.11. Aplicaciones de la PCR en trazabilidad alimentaria

Durante la realización del presente informe se consideró oportuno dedicar una sección independiente al conjunto de posibles aplicaciones de la técnica PCR en la trazabilidad alimentaria, ya que su flexibilidad y mayor complejidad requiere un análisis más detallado (Baumforth, 1999).

#### ***Detección de transgénicos***

La detección de OMGs mediante la identificación de secuencias de ADN transgénicas, es un método más rápido y específico, aunque más costoso y complicado. La técnica de PCR es un método muy sensible para la detección de alimentos transgénicos, ya que puede localizarse específicamente cualquier gen



de secuencia conocida. En los alimentos transgénicos hay secuencias exógenas, es decir, introducidas para producir el OMG, que corresponden bien a un promotor, al gen de interés y/o a un terminador. Cualquiera de estas tres secuencias se puede usar como marcador en la detección de alimentos transgénicos (Baumforth, 1999).

La estrategia a seguir cuando se pretende realizar un análisis de un alimento supuestamente transgénico, comienza generalmente por la realización de un estudio de “screening” o cribado, este consiste en la búsqueda del promotor (p35S) o terminador (NOS) utilizados con mayor frecuencia en transgénicos, sin necesidad de conocer la secuencia específica del gen introducido (Barrera, 1992)

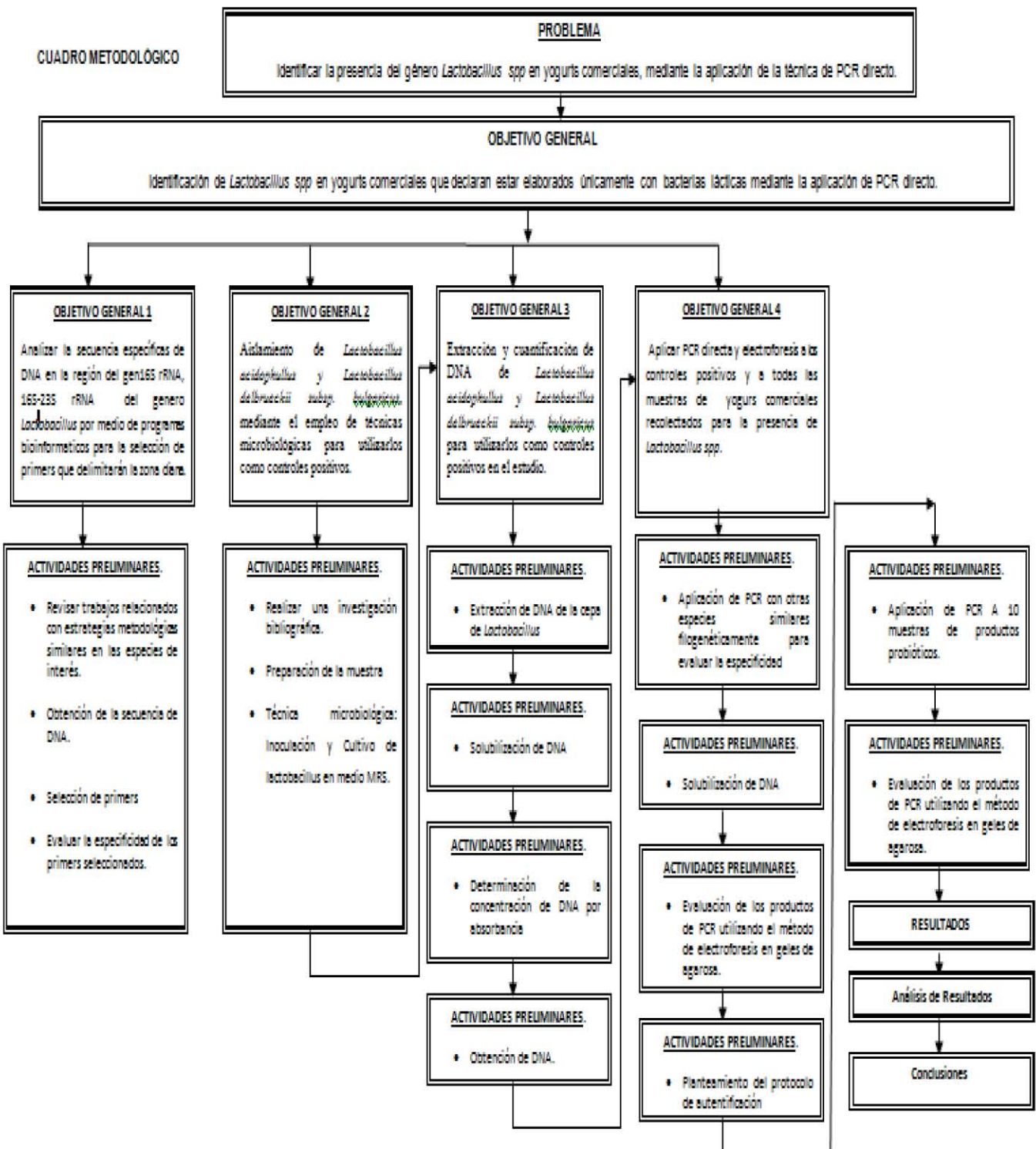
### ***Identificación de especies (autenticación)***

Otra aplicación basada en la técnica PCR consiste en la identificación de especies animales o vegetales en alimentos, mediante la identificación de material genético específico de cada especie (especie-específico): Este método permite confirmar la presencia de ADN de una u otra especie en una muestra de alimentos, y se lleva a cabo realizando tantas PCRs selectivas (ADN porcino, ADN bovino, etc.) como se considere conveniente. Las PCRs selectivas que no den resultado en la amplificación y posterior electroforesis indicaran ausencia de material genético de dicha especie, mientras que la obtención de fragmentos amplificados revelará la presencia de la especie correspondiente. Una vez llevado a cabo el análisis por PCR, los presuntos positivos son usualmente confirmados mediante una verificación que puede ser llevada a cabo, por ejemplo con detección colorimétrica a través de marcadores específicos (Beishir, 1991).

Al ser una técnica muy sensible, existe un riesgo alto de falsos positivos debido a la contaminación. Para evitar que esto suceda, aparte de utilizar controles en todos los análisis deben existir en el laboratorio zonas aisladas para la realización de las distintas etapas del análisis, así como en la preparación de los distintos reactivos (Beishir, 1991).



### CAPITULO 2: METODOLOGÍA EXPERIMENTAL





## Problema

Identificar la presencia del género *Lactobacillus spp* en yogurts comerciales, mediante la aplicación de la técnica de PCR directo.

## Objetivo general:

Identificación de *Lactobacillus spp* en yogurts comerciales que declaran estar elaborados únicamente con bacterias lácticas mediante la aplicación de PCR directo.

## Objetivo Particular 1:

Analizar la secuencia de DNA en la región del gen 16S rRNA, 16S-23S rRNA del género *Lactobacillus spp* por medio de programas bioinformáticos para la selección de primers que delimitarán la zona diana.

## Objetivo Particular 2:

Aislamiento de *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*, mediante el empleo de técnicas microbiológicas.

## Objetivo Particular 3:

Extracción y cuantificación de DNA de *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* para utilizarlos como controles positivos en el estudio.

## Objetivo Particular 4:

Aplicar PCR directa y electroforesis a los controles positivos y a todas las muestras de yogurts comerciales recolectados para la presencia de *Lactobacillus spp*.



## 2.1. Materiales, equipos, reactivos

### 2.1.1. Material Biológico

#### a) Muestras comerciales de yogur

Las muestras fueron obtenidas en diferentes supermercados. En total se consiguieron 10 muestras las cuales declaraban en el etiquetado contener exclusivamente *Lactobacillos*. A continuación en la Tabla 14 se presentan algunas generalidades de dichas muestras.

Tabla 14. Muestras de productos comerciales procesadas a base de leche.

# Muestra	Marca	Lote	Caducidad	Precio
1	Vitalinea	191 10:33 z	ABR2013	4.00
2	Gerber con manzana y yogur	135 00:33 a	SEP2012	12.00
3	Activia	PBR05134	OCT2012	4.50
4	Alpura purificante	13498577	DIC2012	8.00
5	Probiseis	PBS041612	ENE2013	150
6	Sventy gastro protect	BR3476588	MAR2013	7.00
7	Danone natural	128749574	JUN2013	6.00
8	Lala natural	123489524	ABR2013	5.00
9	Yoplait natural	763892673	AGOS2012	5.00
10	Sventy gastro protect	287393479	OCT2012	8.00

#### b) Bacterias

Las bacterias de *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus bulgaricus* fueron proporcionadas de la “Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán Campo 1”, laboratorio de bacteriología a cargo de la Dra. Clara Ines Alvarez Manrique, para ser usadas como controles positivos durante la experimentación.

##### 1) Primers

Las secuencias de los primers se mandaron sintetizar en los laboratorios Invitrogen.



Tabla 15 Oligonucleótidos utilizados como primers para la PCR

Especies	Primers (5'→3')	Tamaño de Amplificado
Genero <i>Lactobacillus</i>	LbLMAI-rev (5' CTC AAA ACT AAA CAA AGT TTC-3') R16-1 (5'CTT GTA CAC ACC GCC CGT CA-3')	250

Tabla 16. Materiales, equipo y reactivos utilizados durante la experimentación

MATERIAL	EQUIPO	REACTIVOS
Tubos eppendorff esterilizados.	Balanza analítica cole parmer PR410 Equipar.	Agua desionizada o biodestilada con pH de 7
Termómetro	Vortex Genie k-55-G.	Solución de lisis (Tris base 50 Mn, pH=8, EDTA o 1M, SDS 0.5%)
Kit de micropipetas Rainin de 0.5-1000µl	Micro centrifuga, Minispin plus eppendorff 14 000 rpm	Enzima proteínasa K a concentración de 20 mg/ml
Gradilla	Termoblok, thermomixer compact Eppendorff.	Mezcla Fenol-Cloroformo-Alcohol isoamilico, en proporción 12:24:1
Micropipetas	Micropipetas	Etanol Frío.
Kit de micropipetas de 0.2 µl-1000µl	Puntas de micropipetas	Soluciones de DNA
Puntas para micropipetas esterelizadas.	Nanoespectrofotómetro, Accesolab Nano Drop ND-1000.	Agua libre de nucleasas.
Matraz Erlenmeyer de 200 ml	Termociclador ATC 4011, Apollo Instrumentation.	Kit de PCR directo Phusión Blood.
Parafilm	Fuente de poder, Bio-rad PowerPac 200	Gel de aragosa 2%
Mechero Busen	Cámara y cassette de electroforesis, Apollo 75,10.	TAE 1X.
Benzal		Bromuro de etidio.
Asa microbiológica		Colorante azul/ naranja.
Tubos		Marcador de peso molecular.
Cajas Petri		benzal



Asa microbiológica	Cristal violeta
Cajas petri con MRS	Lugol
Cultivos Microbiologicos	Alcohol acetona
portaobjetos	Safranina
Cubreobjetos	Aceite de inmersión
Microscopio	

## 2.2. Metodos

### 2.2.1. Selección, y especificidad de primers.

- **Selección de primers**

De la recopilación bibliográfica encontrada Se realizó la selección de primers universales para la identificación de cualquier especie de *Lactobacillus*.

Tabla 17. Oligonucleótidos utilizados como primers.

Especies	Primers (5' → 3')
Genero <i>Lactobacillus</i>	LbLMAI-rev (5' CTC AAA ACT AAA CAA AGT TTC-3') R16-1 (5'CTT GTA CAC ACC GCC CGT CA-3')

- **Evaluar la especificidad de los primers seleccionados.**

La selección de primers es la parte crucial del desarrollo de un protocolo de autenticación. Esta actividad se realizó de acuerdo con lo siguiente: Con programas bioinformáticos (**BLAST 2 SEQUENCES**) para corroborar si pudieran amplificar los primers. Anteriormente seleccionados (Se describe en anexo 1).





- **Aislamiento de bacterias lácticas**

### **Medio de cultivo: AGAR MRS (DE MAN, ROGOSA Y SHARPE)**

**PRINCIPIO:** El contenido de peptona, extracto de carne y de levadura proporcionan los nutrientes necesarios para el crecimiento de los microorganismos. El polisorbato 80, el magnesio y manganeso actúan favoreciendo el crecimiento óptimo de los *Lactobacilos*. La dextrosa es la fuente de energía. El fosfato de sodio ayuda a controlar el pH. El acetato de sodio junto con el valor del pH del medio de cultivo inhibe considerablemente la flora acompañante. Sembrar el medio de cultivo con la muestra de ensayo directamente o a partir del Caldo MRS previamente inoculado e incubado. Se recomienda para mejores resultados el método de vaciado en placa. Incubar 24 –72 h a  $26 \pm 2^\circ\text{C}$  en atmósfera con 5% de  $\text{CO}_2$ .

**NOTA:** La superficie de las placas no debe secarse, porque aumenta la concentración de acetato en la superficie y se inhibe el crecimiento de *Lactobacilos*.

#### **Preparacion del agar rogosa:**

Se Pesó cada uno de los reactivos (ver anexo 2) y se rehidrató el medio en 600 ml de agua destilada. Se dejó reposar 10 a 15 minutos. Se sumergó dentro del matraz una mosca y se llevó el agar a agitación constante para mantener la preparación del agar homogénea. Se verificó el pH del agar usando el potenciómetro ya que el agar debe estar a 7, si el pH es menor de 7 en el agar hay que agregar KOH, pero si el pH es mayor a 7 hay que agregar HCl. Se calentó agitando frecuentemente hasta el punto de ebullición durante 1 minuto para disolverlo por completo. Se esterilizó en autoclave a  $121^\circ\text{C}$  (15 lbs de presión) durante 15 minutos. Se enfrió aproximadamente a  $45^\circ\text{C}$ . Se vació en cajas de Petri estériles. Después del vertido se dejó solidificar a temperatura ambiente. Se Realizó la prueba de esterilidad, en una incubadora por 1 día. Se conservaron en refrigeración a  $2^\circ$  a  $8^\circ\text{C}$ .



## 1. Siembra por estrias para *lactobacillus acidophilus* y *lactobacillus bulgaricus*

Se reestructuró la metodología anterior con la finalidad de obtener el crecimiento de nuestra cepa de interés (más purificada y libre de trazas).

**Estría múltiple en superficie:** Con un asa de siembra, previamente esterilizada, se tomó una muestra del cultivo de la bacteria y se extendió sobre un área pequeña de la superficie de la placa con agar nutritivo, en forma de estrías muy juntas, pero sin hacer presión para no dañar el agar (Fig. 13).

Se flameó el asa, se enfrió y después de rozar la siembra realizada previamente, se extendió de nuevo por otra zona de la placa haciendo nuevas estrías. Este proceso se repitió sucesivamente, flameando y enfriando el asa al comienzo de las sucesivas siembras en estría. Se llevó la placa a incubar, a la temperatura adecuada, siempre en posición invertida.

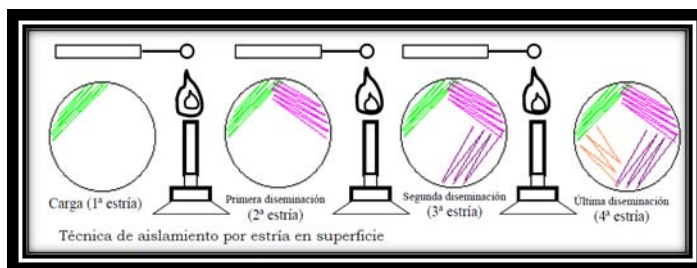


Fig. 13 Técnicas de aislamiento de m.o

Mediante esta técnica se obtienen colonias aisladas a partir de una muestra que contenga un elevado número de bacterias.

## 2. Tinción de gram positivo

**FUNDAMENTO:** El cristal violeta sirve como colorante básico uniéndose a la pared celular bacteriana, con la ayuda del mordente que refuerza la unión del colorante. Las bacterias gram positivas debido a la estructura y composición bioquímica de su pared celular retienen el complejo cristal violeta-lugol y después del tratamiento con el decolorante conserva el colorante básico, por lo que se



observan al microscopio de color azul oscuro o violeta una vez concluida la técnica de tinción (Fig. 14).

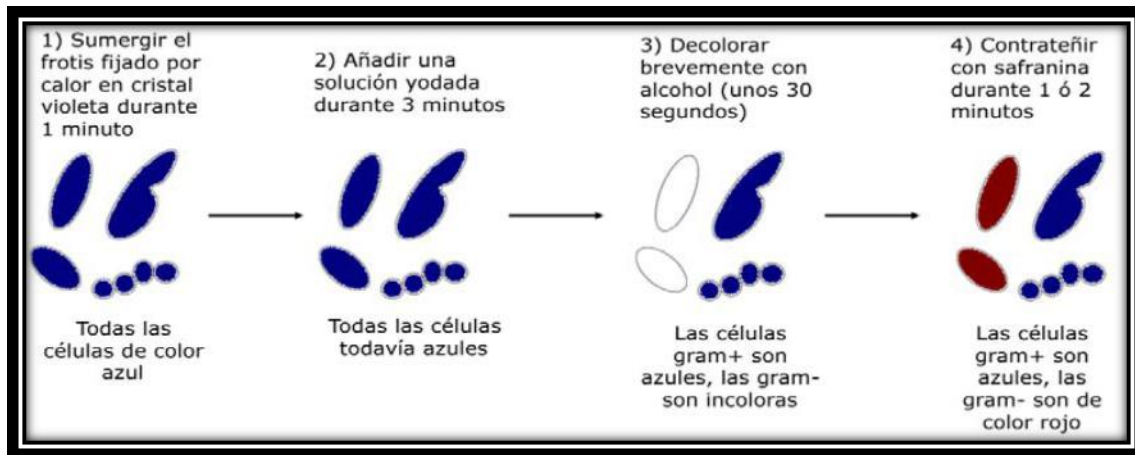


Fig. 14. Pasos para una tinción de Gram

## 2. Fijar un frotis

Se tomó el asa (previamente flameada) y con ésta se tomó un poco de muestra. Una vez obtenida una pequeña cantidad de la muestra (con el asa), se hizo que ésta tuviera contacto con una lámina portaobjetos, el cual sirvió para depositar la muestra contenida en el asa. Con el asa (conteniendo la muestra) sobre el portaobjetos, se procedió a realizar la extensión de la muestra en la laminilla mediante movimientos giratorios (dar vueltas con el asa), de tal forma que al terminar la extensión se obtuvo como producto una espiral en la parte media de la lámina. Se paso en la llama de un mechero para fijar la muestra, teniendo en cuenta que el calor no debe ser directo (sólo se pasa por la llama), puesto que el calor excesivo puede cambiar la morfología celular de las bacterias a observar. El calor deseable es aquél en el que el portaobjetos sea apenas demasiado caliente para ser colocado sobre el dorso de la mano.



### **3. Tinción**

Se colocó cristal violeta sobre la muestra, hasta cubrirla por completo. Se dejó actuar al colorante por 1 minuto. Esta tinción de 1 minuto está dada para trabajar a una temperatura ambiente de 25 °C.

### **4. Enjuague**

Al transcurrir el minuto, se enjuagó la lámina que contenía la muestra con agua corriente. Para realizar el lavado, se tuvo en cuenta que el chorro de agua no debe caer directamente sobre la muestra, ésta debe caer sobre la parte superior de la lámina que no contiene muestra. La solución de cristal violeta, se recomienda sea al 1%.

### **5. Mordiente**

Una vez enjuagado el portaobjetos, se aplicó como mordiente lugol durante 3 minutos.

### **6. Decoloración**

Pasado el minuto de haber actuado el mordiente, el frotis se decoloró con etanol al 75 %, hasta que ya no escurrió más líquido azul. Para esto se utilizó el gotero del frasco del decolorante. Se añadió cantidades suficientes del decolorante hasta lograr que éste saliera totalmente transparente, es decir, hasta que ya no escurrió más líquido azul.

### **7. Lavado y secado**

Se lavó con agua para quitar los residuos de decolorante, se pasó la laminilla por la flama de un mechero de la forma anteriormente descrita.



## 8. Tinción de contraste

Una vez que la lámina ya secó, se procedió a teñir nuevamente, se utilizó el colorante de contraste de safranina, se dejó actuar durante 1 minuto.

## 9. Nuevo enjuague

Pasado el minuto correspondiente, se procedió a enjuagar la lámina con agua, se escurrió el agua sobrante y se secó en la forma anteriormente descrita. De esta manera, se obtuvo el frotis para su respectiva observación microscópica. Nota: se colocó aceite de inmersión para mejorar la visión de la muestra en 100X en el microscopio.

### 2.2.3. Método de extracción de DNA (Sambrook, 2001)

#### ➤ Disgregación del tejido

Se congeló la muestra. Se Pesó 125 mg de muestra en un tubo eppendorff. Se adicionó 1250  $\mu$ l de solución de lisis. Se agitó en el vortex hasta que se visualizaron fragmentos más pequeños. Se Adicionarón 7  $\mu$ l de enzima Proteínasa k. Posteriormente se incubaron los tubos a 50°C en termoblock por 2 horas. Se elevó la temperatura del termoblok a 60°C por una hora; esto con la finalidad de desactivar la enzima. Al salir las muestras del baño seco se tomó aproximadamente la mitad y se colocó en un tubo eppendorff nuevo, por lo tanto se tenían dos tubos eppendorff que contenían la misma muestra. Esto se hizo con la finalidad de tener una réplica de la extracción.

#### ➤ Extracción de Proteínas y polisacáridos

Se adicionó a cada tubo con muestra 500  $\mu$ l de la mezcla fenol-cloroformo-alcohol isoamilico. Se mezcló el tubo suavemente para que la mezcla fenol cloroformo-alcohol isoamilico pudiera interactuar de forma adecuada con todos los demás componentes. Se centrifugó a 10,000 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente.



Se recuperó la fase acuosa superior que contienen el DNA en un tubo eppendorff esteril.

#### ➤ **Precipitación del DNA**

Se adiciono 1500  $\mu$ l de etanol frio a cada tubo. Se Mezclo suavemente. Se Centrifugo a 10,000 rpm por 10 minutos. Se Decantó el etanol y se dejo secar el DNA en la incubadora a 37°C. El DNA se pudo visualizarse pegado al tubo como una mancha blanca. Sé Adicionó agua desionizada libre de nucleasas para resuspender el DNA agitandolo suavemente el tubo hasta que se diluyo el DNA completamente diluido. Se hizo la cuantificación del DNA por medio de un espectrofotómetro.

#### ➤ **Cuantificación de DNA por medio de absorbancia**

Para cuantificar la cantidad de DNA, las lecturas se toman a 260 y 280 nm. La lectura de 260 mn permite el cálculo de la concentración de ácidos nucléicos en la muestra. Una unidad de densidad óptica corresponde a aproximadamente 50  $\mu$ g/ml de DNA de doble hebra. La relación de muestras puras de DNA tiene valores de 1.8, mientras que valores de 2, muestran la exitencia de preparaciones puras de RNA. Si existe contaminación significativa con fenol o proteínas, la relación 260/280 será menor de 1.8, entonces no se puede cuantificar el DNA presente en la solución. (Sambrook J. & Russell D., 2001)

Se encendió el Nanodrop. Se colocó 2 $\mu$ l de agua libre de nucleasas para iniciar el equipo Este programa se encuentra conectado a una computadora. En la computadora abrir el programa de "Nanodrop". Se entró a la opción de ácidos nucléicos. Se colocaron 2 $\mu$ l de agua libre de nucleasas la cual servirá como blanco. En la computadora, se dió en la opción de blanco y se dejó que el equipo lo lea. En este caso todos los valores debieron ser cero. Cuando el equipo arrojo los valores del blanco, se limpió el sensor con ayuda de un pañuelo. Se agregaron 2  $\mu$ l de la muestra que se desea cuantificar y se dejó que el equipo lo leyera. El equipo da diferentes valores, pero los más importantes son:



- ❖ Relación 260/280= idealmente debe ser 1.8
- ❖ La concentración expresada en ng/ $\mu$ l
- ❖

#### 2.2.4. Método de PCR-directo

Las muestras biológicas, así como los controles positivos (*L. acidophilus*, *L. bulgaricus*) fueron sometidos a PCR utilizando el kit de PCR directo Phusion Blood, (Finnzymes).

##### ➤ Dilución de Primers

Los primers que fueron hidratados previamente se diluyeron (25 $\mu$ m) para realizar la PCR, ésta dilución tiene que ser una proporción 1:10. Se prepararon 50 $\mu$ l de disolución..

##### ➤ KIT PCR-directo

La preparación de las muestras para la reacción se llevó a cabo de acuerdo con el protocolo que precisa Phusion Blood. La PCR está compuesta por diversos componentes. La reacción se preparó en tubos eppendorf de 200 $\mu$ l; a continuación se muestra la proporción de cada uno de ellos en la tabla 18.

Tabla 18. Componentes de la PCR

Componente	Volumen ( $\mu$ l)
Buffer	10
Primer F	1.0
Primer R	1.0
Enzima	0.4
Agua Libre de nucleasas	6.6
Muestra	1.0

Posteriormente se colocó a cada tubo la muestra DNA que le corresponda. Agitaron los tubos en el vortex y se colocaron en la microcentrifuga 5 segundos aproximadamente. Se colocaron los tubos en el termociclador y se programó.



### 2.2.5.PCR

La programación del termociclador se efectuó de acuerdo a las condiciones que están basadas en las recomendaciones de Dubernet et al., 2002, para el caso de las 2 especies de bacterias (Tabla 19).

Tabla 19. Etapas y condiciones programadas en el termociclador para lactobacillus

ETAPA	TEMPERATURA °C	TIEMPO (minutos)
Desnaturalización	95	5
Etapa que repite cíclicamente	95	0:30
Etapa que repite cíclicamente	55	0:30
Etapa que repite cíclicamente	72	0:30
Extensión final	72	7:00

- La hidratación de los primers seleccionados se describe en el anexo 2

Al salir las muestras de la PCR se realizó una electroforesis; así se pudieron visualizar los fragmentos de DNA de diferentes tamaños que correspondían al género *Lactobacillus* contenidas en cada una de las muestras.

### 2.2.6. Electroforesis

#### ➤ Método para electroforesis en gel de agarosa

#### ***Preparación del gel agarosa***

Los productos de PCR se analizaron en un gel de agarosa al 2.0% el cual estaba contenido en una cámara de 50 ml. Se Pesó 1000 mg de agarosa. Se Disolvió en 50 ml TAE 1X. Se calentó la disolución en horno de microondas aproximadamente 1 min por espacios de 10 segundos (hasta disolver totalmente la agarosa). Se añadió 1 gota de bromuro de etidio y se mezcló bien. La mezcla se vertió en el soporte cuidando de que no se formaran burbujas, si se formarían las burbujas es





preciso removerlas, inmediatamente después se colocaron los peines. Se dejó solidificar el gel en una zona nivelada y libre de corrientes de aire. Se retiraron los peines y se colocó el soporte con el gel en la cámara de electroforesis. Se Adicionó TAE IX a la cámara de modo que el gel quede cubierto.

➤ **Carga y corrida del gel**

En un trozo de parafilm se colocaron 3  $\mu\text{l}$  de bromuro de etidio; 3  $\mu\text{l}$  de colorante azul/naranja y 1  $\mu\text{l}$  de marcador de peso molecular y 5  $\mu\text{l}$  de la muestra de PCR directo. Se mezcló muy bien con ayuda de una micropipeta todos los reactivos y muestras y se depositó en el porcillo correspondiente. El gel fue corrido en un campo eléctrico de 60 V con una fuente de poder.

➤ **Visualización de Fragmentos**

Una vez finalizada la migración de los fragmentos de DNA, su tamaño se pudo determinar comparando la distancia recorrida en el gel con la de fragmentos de tamaño conocido (Marcadores de peso molecular).

Se colocó el gel dentro del trasluminador. Se fotografió el gel; la imagen se envió a un ordenador que la procesó en el software adecuado.



## CAPÍTULO 3: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Objetivo Particular 1

#### 3. Realizar una investigación bibliográfica.

Para llevar a cabo este trabajo fue necesario realizar una investigación bibliográfica de los trabajos hechos con anterioridad referentes al tema de interés con la finalidad de tener un mayor conocimiento sobre este.

Al realizar esta revisión se encontró un artículo realizado por Dubernet et al., 2002 cuyo objetivo era un método basado en la PCR para la identificación de los *Lactobacilos* en el nivel de género, debido a que el trabajo reportado en este artículo era muy semejante a lo que se pretendía hacer en esta investigación de tesis, se optó por tomarlo como la principal referencia, obteniendo de él los primeros a utilizar así como las condiciones para llevar a cabo la PCR, por lo que solo se necesitó entrar a Mitomap el cual, es un programa bioinformático que comprobó que las secuencias correspondieran a las especies deseadas. (Anexo 3).

#### 4. Obtención de la secuencia de DNA

A continuación se muestra las regiones de la identidad dentro del ARNr 16S, 16S-23S rRNA región espaciadora intergénica y 23S rRNA secuencias donde se encuentran todas las especies de *Lactobacillus*, a continuación se presentan las secuencias utilizadas para la amplificación de cada especie (Figura 15).

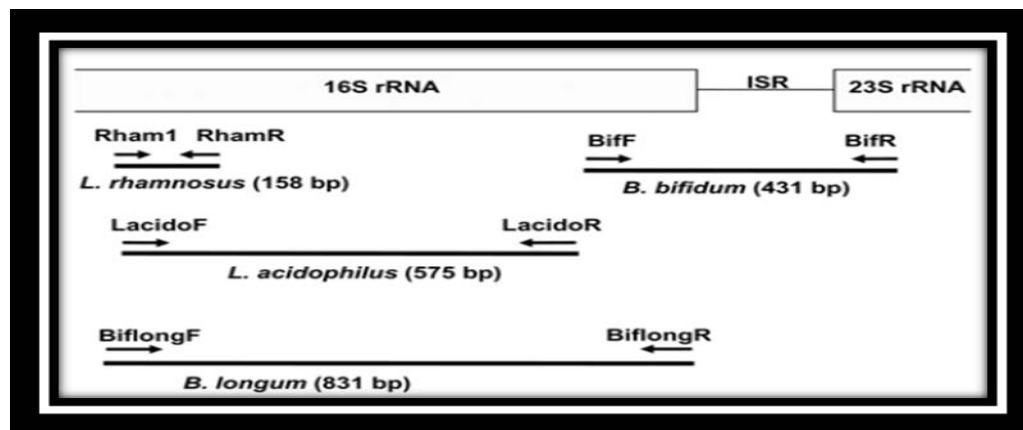


Figura 15. Primers universales para *Lactobacillos* (Dubernet et al., 2002)



## Objetivo particular 2:

### ➤ **Preparación de la muestra**

Se obtuvieron las cepas de *Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus* y *Lactobacillus acidophilus*. Tras la incubación de 48 horas, se observaron las colonias aisladas en la placa inoculada, las cuales tienen una forma filamentosa, se encuentran en medios ácidos y no son patógenas. Con esta técnica se logró la separación de los microorganismos que se encuentran en un cultivo mixto, obteniéndose las especies de interés *Lactobacillus bulgaricus* y *Lactobacillus acidophilus* en las zonas donde existieron colonias aisladas se pudo estudiar la morfología de las colonias (Fig. 16).

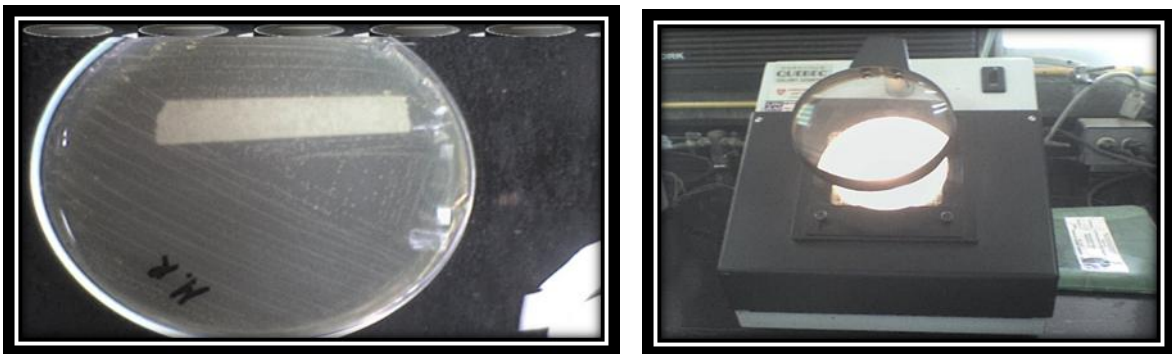


Fig. 16 cepas y cuenta colonias

### ➤ **Tinción de gram positivo**

Se observó al microscopio el portaobjetos que contenía el gram realizado con los *Lactobacillus* (Figura 17), las colonias pueden ser diferenciadas en base a las características morfológicas a partir de cultivos puros, las características a considerar en la diferenciación de colonia bacteriana se muestran en la siguiente Tabla 20.



Fig. 17. Gram lactobacillus



Tabla 20. Características morfológicas de las bacterias lácticas

Características	Atributo
Gram	(+)
Forma	Alargada en forma de bastones
Tamaño	2-5 mm
superficie	Lisa
Elevación	convexa
Borde	filamentoso
Estructura interna	granulosa
Color	Sin pigmentos
Opacidad	opaca
Consistencia	dura

Fuente: Dubernet et al., 2002

### Objetivo Particular 3:

Se trabajó con 10 tipos de yogur, a las cuales se les extrajo el DNA, se les midió la absorbancia 260/280 en el espectrofotómetro Nanodrop, los resultados que se obtuvieron se muestran en la Tabla 21.

Tabla 21. Controles positivos y valores de concentración aproximada a 60 ng/ $\mu$ l.

Muestra/ Control Positivo	Nomenclatura	Relación 260/280	Concentración de DNA (ng/ $\mu$ l)	Relación concentración dilución a 60 (ng/ $\mu$ l)	Concentración de DNA dilución a 60 (ng/ $\mu$ l)
<i>Lactobacillus</i>	1	1.72	854.7	1.84	66.26
<i>Acidophilus</i>	2	2.05	2525.1	1.85	97.26
<i>Lactobacillus</i>	3	1.70	278.53	1.80	74.26
<i>Bulgaricus</i>	4	1.76	3677.17	1.86	214.18
vitalina	5	1.41	454.38	1.81	73.51
gerber con	6	1.65	2399.39	1.65	112.08
manzana con	7	1.58	2388.06	1.88	173.39
yogur	8	1.62	1271.40	1.82	35.95
activia	9	1.42	844.52	1.82	70.57
alpura	10	1.40	843.56	1.80	235.15
purificante	11	1.60	860.15	1.85	195.4
probiseis	12	1.43	2345.2	1.80	170.45
sventy gastro					
protect					
danone natural					
lala natural					
yoplait natural					
sventy gastro					
protect					



Los resultados de la relación 260/280 nos muestran que no hay contaminación significativa con proteínas en las muestras de DNA; por otro lado la concentración de DNA es adecuada para ambas muestras dado que estos dos parámetros nos indican que el DNA de la dos especies se encuentra con la calidad y cantidad requeridas se puede proceder a la utilización de estas muestras para la realización de la PCR.

#### **Objetivo Particular 4:**

Las muestras del objetivo 3, así como los controles positivos (*L. acidophilus*, *L. bulgaricus*) fueron sometidos a PCR utilizando el kit de PCR directo Phusion Blood (Finnzymes), esto se realizó para comprobar experimentalmente que el kit daba mejores resultados con las muestras sin tratamiento que en muestras en las cuales se trabajaba con DNA extraído.

La programación del termociclador se efectuó de acuerdo a las condiciones que están basadas en las recomendaciones de Dubernet et al., 2002 para el caso de las 2 especies de bacterias.

#### ➤ **Especificidad de los primers**

El primer resultado que se obtuvo fue comprobar que los primers que se diseñaron para la identificación de *Lactobacillus*, sólo amplificarán para esta especie y no para otra, ya que mediante el programa bioinformático se mostraba que tenía una identidad del 100%

Los resultados de la PCR fueron evaluados en un gel de agarosa al 2% sometido a un campo eléctrico de 60 V por un tiempo aproximado de 1:30 horas. Una vez finalizada la migración de los fragmentos de DNA, su tamaño puede determinarse comparando la distancia recorrida en el gel con los fragmentos de tamaño conocido (marcadores de peso molecular)

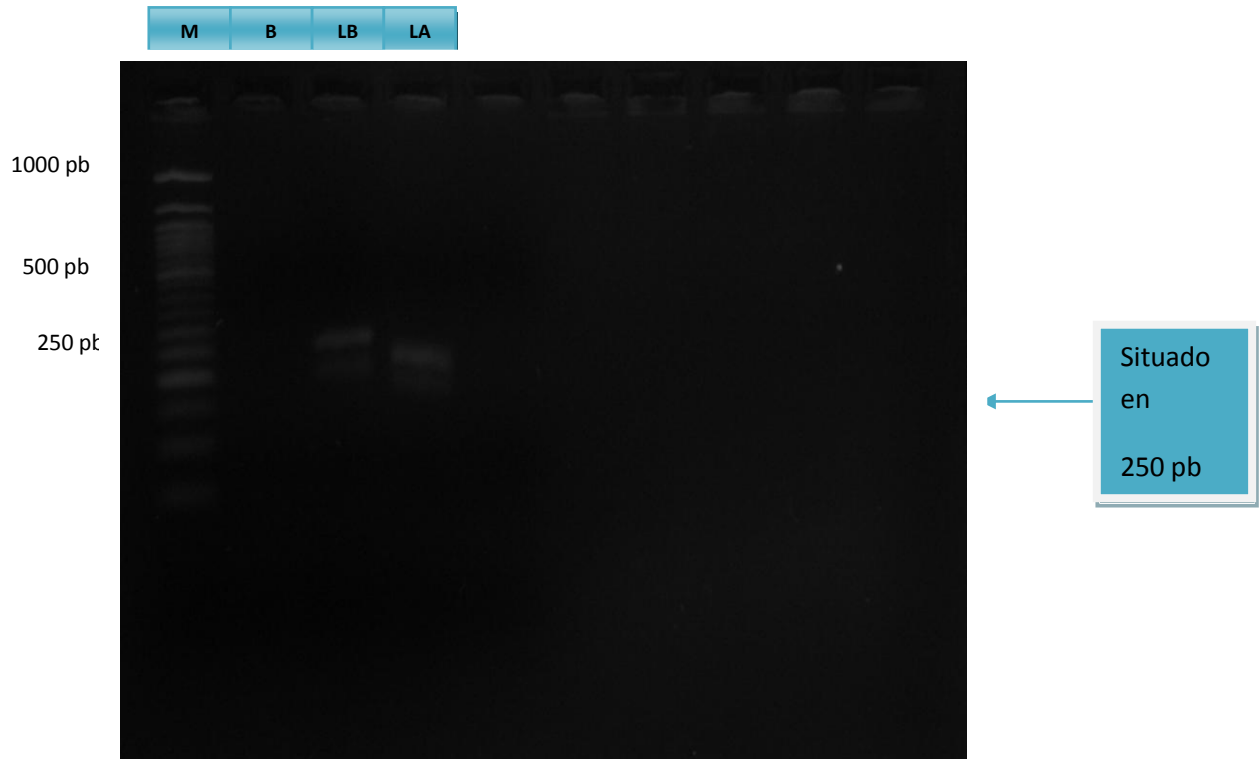


Fig 18. Detección de controles positivos a partir de primers seleccionados a partir de un programa bioinformático B (blanco), LB (*Lactobacillus delbrukii subsp bulgaricus*) y LA (*Lactobacillus acidophilus*), en un gel de agarosa al 2%. (M) marcador de peso molecular 50 bp DNA ladder.

sin embargo en cada uno de los geles realizados se obtuvieron resultados negativos, ya que no había una amplificación. Posteriormente se realizó PCR por el método directo el cual como se puede observar en la Figura 18, el gel no presenta contaminación por que el carril del blanco (segundo carril) no tiene ninguna banda visible, sin embargo en los carriles 3 y 4 se observa un amplificado de nuestros controles positivos a la altura esperada de 250 pb, se puede observar ligeramente dos bandas de 300 pb debido a que los controles positivos pueden amplificar en dos regiones rRNA-16s-23. Se pudo comprobar que efectivamente los primers reportados en publicaciones de otros países también tienen aplicabilidad para las especies de nuestro país, además nos permitió seguir trabajando la experimentación bajo las condiciones sin extracción previa del DNA.



Se evaluaron 10 muestras que reportaban contener *Lactobacillus spp.*, a estas muestras se les realizó PCR directo. A continuación se muestran los resultados obtenidos en la Fig. 19:

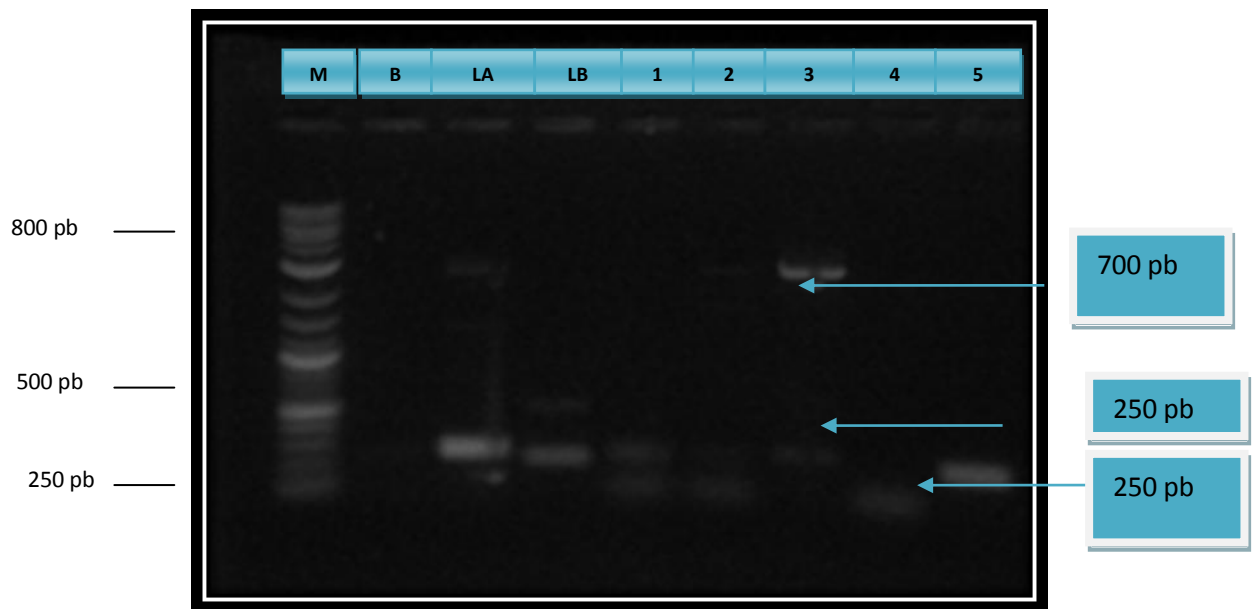


Fig 19. Identificación de 5 variedades de yogur comerciales a partir de los primers seleccionados, B (blanco), LA (*Lactobacillus acidophilus*), LB (*Lactobacillus delbrukii subsp bulgaricus*), 1 (vitalina), 2 (Gerber con manzana con yogur), 3 (activia), 4 (alpura purificante), 5 (probiseis) en un gel de agarosa al 2%. (M) marcador de peso molecular 100 pb DNA ladder

Anteriormente se llevó a cabo pruebas mediante PCR por el método tradicional, sin embargo en cada uno de los geles realizados se obtuvieron resultados negativos, ya que no había una amplificación debido al alto contenido de trazas en cada uno de las muestras biológicas, Sin embargo con PCR directa se obtuvieron que las 5 muestras se sometieron al mismo programa de identificación de *Lactobacillus spp.*, al ponerlos al termociclador se trabajó con 1.0µl de DNA para cada muestra. Teniendo como controles positivos los carriles LA y LB, se observa que las otras 5 muestras también amplifican en la misma posición de 250 pb, para las cinco muestras las bandas de amplificación se observan claramente por tal motivo aunque la intensidad de la banda varía un poco entre ellas, queda comprobada la veracidad de los primers diseñados, ya que la banda de



amplificación es la esperada con respecto al fragmento de amplificación del DNA de los *Lactobacillos ssp.* Cabe mencionar que el carril numero 2,3 se puede notar una doble banda, esto significa la presencia de *Lactobacillus casei* (Sul, su-yeon, Hyun), sin embargo no podemos deducir que tipo de *Lactobacillus* es por la falta de controles positivos.

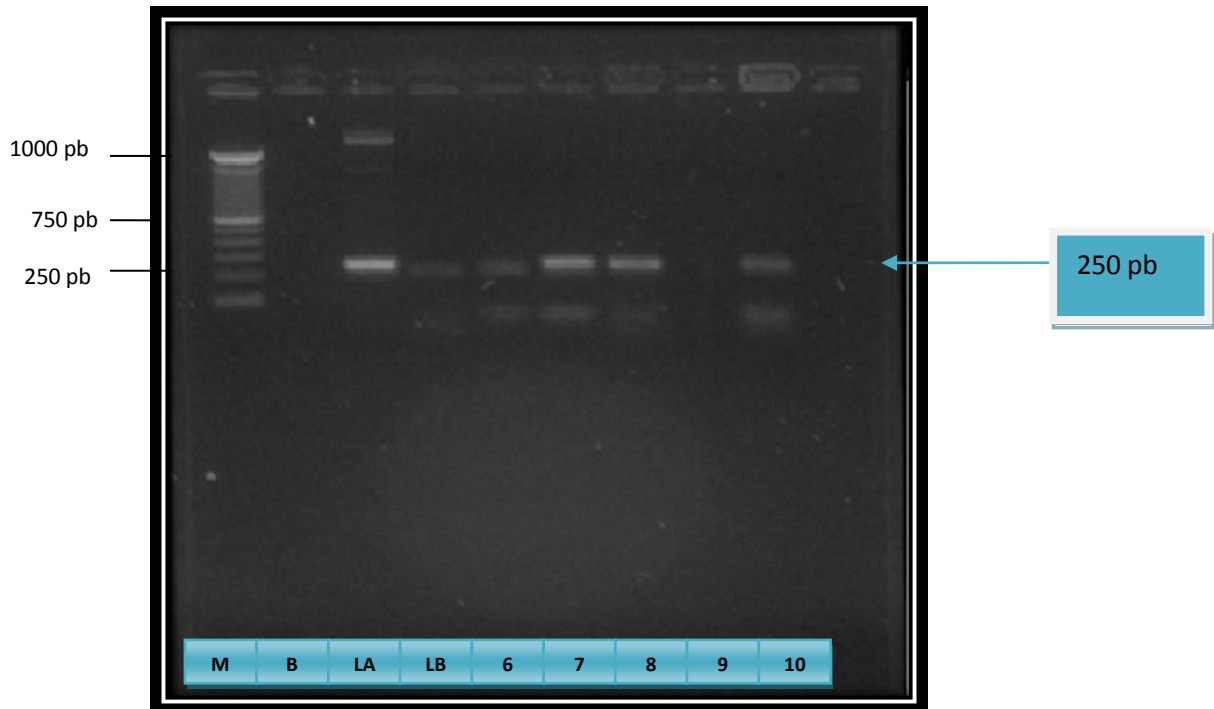


Fig 20. Identificación de otras variedades de yogur comerciales a partir de los primers seleccionados, B (blanco), LA (*Lactobacillus acidophilus*), LB (*Lactobacillus delbrukii subsp bulgaricus*, 6 (Gerber Yogur frutas mixtas), 7 (sventy gastro protect), 8 (danone natural), 9 (lala natural) y 10 (yoplait natural) en un gel de agarosa al 2%. (M) marcador de peso molecular 100 pb DNA ladder

Las 5 muestras (6 a 10) se sometieron al mismo programa de identificación de *Lactobacillus spp.*, al ponerlos al termociclador se trabajo con 1.0µl de DNA para cada muestra. Teniendo como controles positivos los carriles LA y LB, se observa que las otras 5 muestras también amplifican en la misma posición de 250 pb, para las cinco muestras las bandas de amplificación se observan claramente por tal motivo aunque la intensidad de la banda varia un poco entre ellas, queda comprobada la veracidad de los primers diseñados, ya que la banda de





amplificación es la esperada con respecto al fragmento de amplificación del DNA de los *Lactobacillos ssp.* Cabe mencionar que el carril número 9 no tuvo un amplificado, sin embargo, no se puede asegurar que este producto lácteo no contenga nada de *Lactobacillos* en su composición ya que hay diversos factores que pueden inhibir la PCR, existen diversos factores por los cuales no hubo un amplificado tales como medios de cultivo bacterianos, detergentes, antibióticos, buffers, enzimas, polisacáridos,  $Ca^{2+}$ , grasas y proteínas. Al ser este producto un yogur pudo verse inhibida ya que específicamente las proteínas lácticas (caseínas) han sido reportadas como inhibidores de reacción. Es por ello que no se puede tener un resultado certero y concluyente para la muestra (Fig. 20)



## CONCLUSIONES:

El avance tecnológico en la industria alimentaria requiere de técnicas que permitan la identificación en forma rápida y confiable de los componentes de un alimento, si bien las técnicas tradicionales (análisis microbiológico) no logran identificar con total certeza los microorganismos probióticos que los fabricantes dicen adicionar al alimento para transformarlo en “funcional” y justificar así el valor agregado que se le da a dicho alimento, así mismo resulta poco aceptable la información que aparece en las etiquetas ya que general únicamente se menciona que los productos “yogurt funcional” Por lo tanto es de interés poder determinar si realmente cuenta con este microorganismo en su formulación o que es realmente lo que haría a este producto ser catalogado como “alimento funcional”, esto por citar un solo ejemplo pero como este existen en el mercado innumerables productos con estas características.

En el desarrollo de este trabajo se evaluaron 10 muestras de yogur de marcas comerciales, estas fueron evaluadas por cebadores específicos para la identificación de la especie de *Lactobacillus*, los cuales fueron diseñados a partir de 16S rRNA, 16S-23S rRNA región espaciadora intergenica, y 23S secuencia de RNA para *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus Bulgaricus*. La especificidad de las 2 especies de lactobacilos fueron evaluadas por PCR directo con el ADN genómico purificado a partir de los pares de cebadores de referencia, todos los pares de cebadores específicos de la especie producen un solo producto de PCR con un tamaño esperado del producto. Por lo tanto, estos cebadores parecían ser apropiados para la identificación de laboratorio en productos probióticos usando la técnica de PCR directo. Los resultados obtenidos muestran que en los 10 productos evaluados se detecta la presencia del genero *Lactobacillus* en especial de *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus Bulgaricus* que amplifican en un gel de agarosa al 2% en 250 pb, lo que significa que durante el proceso de elaboración de yogur se le adicionan las cantidades adecuadas de las cepas probioticas lo cual representa un beneficio en la salud en el mercado que consume estos productos, sin embargo en la muestra número 3 amplifica una doble banda lo que es posible la presencia de un *lactobacillus* distinto a los que se amplificaron



en el gel de agarosa. Actualmente se cuenta con una técnica que permite identificar la cepa, la familia, el género del microorganismo adicionado a los yogurts (no solo para estos productos), la cual se basa en la secuenciación de un fragmento previamente seleccionado (para el caso en estudio 16S y 23S) del DNA del microorganismo en estudio, se le conoce como Reacción en Cadena de la Polimerasa, método ampliamente utilizado no solo en el área de alimentos sino que inicialmente se empleo en medicina expandiendo su aplicaciones al aspecto forense, farmacéutico, etc. Está técnica no solo permite identificar sino también autenticar especies de interés comercial, para el caso en estudio del presente trabajo, lo que se desea es corroborar que estos productos cumplen con lo que anuncian y prometen para poder establecer una metodología que permita la implementación de esta técnica como auxiliar o bien que sea reconocida como técnica oficial para la identificación, corroboración de la calidad de un producto hablando del contenido expresado de forma incompleta en las etiquetas y en su caso implementación a nivel gubernamental para mejorar la norma oficial ya existente.



## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, MR. y Marteau, P. *On the safety of lactic acid bacteria*. 4<sup>a</sup> ed, Int J Food Micro, 1995. 264 p.

BARRERA, Saldaña HA. Información genética: Estructura, función y manipulación. Conacyt, colección ciencia básica. 18 (2):1-250, 1992.

BAUMFORTH KR, Nelson PN., DIGBY JE, O'Neil Jd., MURRAY PG, Demystilfiel. The polymerase chain reaction. *Mol Pathol*. 52 (1):1-10,1999.

BEISHIR, L. *Microbiology in practice. A self-instructional laboratory course*. (5<sup>a</sup> Ed. Harper Collins) Pub. Inc., 1991.

BERGEY'S, P. *Manual of Determinative Bacteriology*. 5<sup>a</sup> ed, Mc Graw Hill, 1992. 367p

Bounhnik, Y., FLOURIE, B., ANDRIEUX, C., BISETTI, N., BRIET, F., RAMBAUD, J.C. Effects of bifidobacterium sp fermented milk ingested with or without inulin on colonic bifido-bacteria and enzymatic activities in healthy humans. *Eur J clin Nutr*, 1996. 273 p.

BOURLIOUS, P., KOLETZKO, B., GUARNER, F., BRAESCO, V. The intestine and its microflora are partners for the protection of the host: report on the Danone Symposium "The intelligent intestine", (held in Paris, June 14, 2002). *Am J Clin Nutr*, 2003. 683 p.

BROOK, I. y Gøber A, E. Bacterial interference in the nasopharynx and nasal cavity of sinusitis prone and non-sinusitis prone children. *Acta Otolaryngologica* (Stockholm), 1999. 832p.

BRUCE, A.w. y Reid, G. *Probiotic and the urologist*. 4<sup>a</sup> ed, Can J urol, 2003. 1789p.

CALLEJA Macias, IE., MARTINEZ Garza, SG., GALLEGOS Rivas, MC., ORTIZ Lopez, R., GOMEZ Guerra, L., BARRERA Saldana, HA., GUTIERREZ Gutierrez, AM., Y chromosome micro-deletion identification in infertile males. 3<sup>a</sup> ed, *Ginecol Obstet Mex*, 2003. 31 p.

CARIELLO, NF., SWENBERG JA, Skopek R. Fidelity of *Thermococcus litoralis* DNA polymerase (Vent) in PCR determined by denaturing gradient gel electrophoresis. *Nucleic Acids*. 5<sup>a</sup> ed, Res, 1991. 4193 p.



CHAUVIÉRE, G., COCONNIER, M.H., KERNEIS, S., DRFEUILLE-MICHAUD, A., Joly, B., SERVIN, A.L. Competitive exclusion of diarrheagenic *Escherichia coli* (ETECT) from human enterocyte-like caco-2 cells by heat killed lactobacillus. 3<sup>a</sup> ed FEMS Microbiol let, 1992. 217p.

CRUZ, Martín María., BINETTI G, Ana., DEL RÍO Beatriz., MAGAGAN H, Alfonso., LADERO, Victor., LINARES, M. Daniel., ALVAREZ A. Miguel., "Aplicaciones de la biología Molecular en la Tecnología de alimentos", Journal 2005.

CZEURECKA, D., DAHAN, S., MOGRABI B., ROSSI, B., RAMPAL, P. *Saccharomyces boulardii* preserves the barrier function and modulates the signal transduction pathway induced in enteropathogenic *Escherichia coli*-infect T84 cells. Infect immun. 5<sup>a</sup> ed, 2000. 6004 p.

CHANDAN, R.C. Enhancing market value of milk by adding cultures J dairy Science. 5<sup>a</sup> ed, 1999. 2256 p.

CONWAY, PL., Gorbach, SL., Goldin, BR., (1987): *Survival of lactic acid bacteria in the human stomach and adhesion to intestinal cells*. 2<sup>a</sup> ed, J Dairy Sci, 2000. 12 p.

DAEMEN y VAN der stegei, V. (1986). Genus *Bifidiobacterium*. In P. H. Sneath, N. S.Nair, M. E. Sharpe, a J. G. Holt, Bergey's manual of systematic bacteriology. 1(2):1418–1434. Baltimore: Williams and Wilkens, 1982.

DE VRESE, M., STEGELMANN, A., RICHTER, B., FENSELAU, S., LAUE, C., Shrezenmeir, J. Probiotics-compensation for lactase insufficiency. 1<sup>a</sup> ed, Am J clin Nutr, 2001.429 p.

DESMON et al., N., A JELEN, P. Survival of lactic acid bacteria and their lactases under acidic conditions. Journal of Food Science. 2001,509 p.

D' SOUZA, A.L., RAJKUMAR, C., COOKE, J., BULPIT, C.J. probiotics in prevention of antibiotics associated diarrhea: Meta-analysis. 4<sup>a</sup> ed, BMJ. 2002, 1364 p.

D'YACHENCO, P. In chemistry of milk, ministry of meal and milk industry. 4<sup>a</sup> ed, Tallinn, u.s.s.r, 1971. 320 p.

FANG, H., ELINA, T., HEIKKI, Aa., SEPPO, S. Modulation of humoral immune response through probiotic intake FEMS immunol Med Microbiol. 4<sup>a</sup> ed, 2000, 52 p.

FAMURALO, G., DE SIMONE, C., MATEEUZZI, d., PIROVANO, F. Traditional and high potency probiotic for oral bacteriotherapy. 3<sup>a</sup> ed, Bio-Drugs 1999, 470 p.



FARID E, Ahmed. Review "Genetically modified probiotics in foods", TRENDS in Biotechnology. 2003, 497 p.

FEMIA, A.P., LUCERI, C., DOLARA, P., GIANNINI, A., BIGGERI, A., SALVADORI, M., CLUNE, Y., COLLINS, K.j., PAGLIERANI, M., CDERNI, G. Antitumorigenic activity of the prebiotic inulin enriched with oligofructose in combination with the probiotics lactobacillus rhamnosus and bidifodabacterium latis on azoxymethane-induce colon carcinogenesis in rats, carcinogenesis. 3<sup>a</sup> ed, 2002.1960 p.

FONS, M., GÓMEZ, Karjalainen. Mechanisms of colonization and colonization resistance of the digestive tract. 3<sup>a</sup> ed, Microbiol Ecol Health dis. 2000, 246 p.

FULLER, R. Probiotics in man and animals. 2<sup>a</sup> ed, J. Appl. Bact. 1989, 378 p.

GARCÍA, Quintero, L. Biotecnología alimentaria. 3<sup>a</sup> ed, editorial alfa lavat, 2010. 430 p.

GARDINER et al., B. D., Brashears, M. M., a Gilliland, S. E. Viability of Lactobacillus acidophilus and Lactobacillus casei in fermented milk products during refrigerated storage. 1<sup>a</sup> ed, Journal of Dairy Science, 2000, 219 p.

GARVIE, E.I. Journal of Fermentation Technology, 1978, 515 p.

GUADALINI, S. Use of lactobacillus-GG in paediatric Crohn's disease, Dig Liver Dis, 2002, 65 p.

GILSBON, F., ROBERTFROID, M., dietary modulation of the human colonic microbiota: Introducing the concept of prebiotics. J. NUtr,1995,1412 p.

GOLDIN, B.R., GORBACH, S.L saxelin. M., BARAKAT, S., GUALTERI, L., SALMINEN, s, survival of lactobacillus species (strain GG) in human gastrointestinal tract, dig dis sci.1992, 128 p.

GUADALINI, S., PENSABENE, L., ZIKRI, M.A. Lactobacillus GG administered in oral rehydration solution to children with acute diarrhea: A multicenter European study, J pediatr gastroenterol. Nutr, 2000, 60 p.

GUÉRIN-DANAN, C., CHABANET, C., PEDONE, C., POPOT, F, Milk fermented with yogurt cultures and lactobacillus casei (DN 11400) compared to yogurt and gelled milk: Influence on intestinal microbiota in healthy infants. Am J clin Nutr, 1997, 10 p.

HALLER, D. Activation of human peripheral blood mononuclear cells by nonpathogenic bacteria in vitro evidence of Nk cells as primary targets. Infect Immun. 2000, 769 p.



HATAKKA, K., SAVILAHTI, E. ponka, A effect of long term consumption of probiotic milk on infections in children attending day care centres Double blind, randomized trial. Blind, randomized trial. BMJ, 2001,1327 p.

HAVENAAR, R., and Huis in 't Veld, J.H.J.: Probiotics: A general view. In: The Lactic Acid Bacteria in Health and Disease, Ed.: Wood, B.J.B. El sevier, London, 1992,170 p.

HE,F.,TOUMOLA, E., ARVILOMMI, H SALMINE, S Modulation of humoral immune response through probiotic intake. FEMS Immunol Med Microbiol 2000, 52 p.

HENNEQUIN, c., KAUFFMANN-LACROIX c., JOBERT, A., VIARD, JP., RICOUR, C., JACQUEMIN, JL., BERCHE, P. *Possible role of catheters in Saccharomyces boulardii fungemia*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2000, 20 p.

HERBUTERNE, X. Gut changes attributed to ageing: effects on intestinal microbiota. Curr opin Nutr metab care. 2003, 54 p.

HERNÁNDEZ, Alicia., Microbiología del yogur. 2005, 300 p.

HORIE, H., ZEISIG, M., HIRAYAMA, K., MIDTVEDT, T., MOLLERLR, L., RAFFTER, J. Probioiv mixture descreases DNA adduct formation in colonic epithelium induced by the food mutagen 2-amino-9H-pyrido (2,3-b) indole in a human-flora associated mouse model. Eur j CANCER,2003,107 p.

JAYAMANNE y M.R Adams, Determination of survival, identity and stress resistance of probiotic bifidobacteria in bio-yogurt. Lett. Applied Microbiology, 2006, 194 p.

JIN,c., LIU, h., YANG, S., ZHANG, S., Cloning and overexpression of tehmostable DNA polymerase gene in Escherichia coli. Chain J Biotechnol.1995, 185 p.

KANDLER, O. Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. Antonie van Leeuwenhoek . J. Microbiol. Serol. 1983, 224 p.

KIESSLING, G., SCNEIDER, J., JAHREIS, G. Long-term consumption of fermented dairy products over 6 onths increases HLD cholesterl. Eur J clin Nutr, 2002, 849 p.

KIRJAVAINEN, P., EL NEZAMI, H., SALMINEN, S., AHOKAS, J., WRIGHT, P. The effect of orally administrared viable proiotic and diary lactobacillilli on mouse proliferation. FEMS Immunol med microbial. 1999,135 p.

KUROSAWA, H.; ISHIKAWA, H.; TANAKA, A. A.L-lactic acid production from starch by coimmobilized mixed culture system of *Aspergillus awamori* and *Streptococcus lactis*. *Biotechnoogy Bioeng*. 1988,187p .



LANGHENDRIES, J.P., DETRY, J. Lamboray. J.M. Effect of a fermentes infant formula containing viable bifidobacteri on the fecal flora composition and ph of healthy full-term infants. J pediater gastroenterol Nutr. 1995,181 p.

LAWRENCE, R.C., THOMAS, T.d. and TERZAGHI, B.E. Journal od dairy research. 1976, 141 p.

LEES, S. Y., JAGO VEDAMUTHU, E. R., WASHAM, C. J., A REINBOLD, G. W. An agar medium for the differential enumeration of yoghurt starter bacteria. Journal of Milk Food Technology.1978. 276 p.

LIDBECK, A., NORD, C.E., GUSTASSON, J,A., RAFTER, J. Lactobacilli anticarcinogenic activities and huan intestitanl microbiota. Eur J cancer, 1992, 67 p.

LINKS-AMSTER, H., ROCHAT F SAUDAN, K., MIGNOT, O., AESCHLIMANN, J Modulation of a specific humoral immune response and changes in intstitianl flora mediated through fermeted milk intake. FEMS inmunol Med microbial. 1994, 64 p.

LÓPEZ Gómez, Antonio. y G.,Vicente. Manual de industrias lácteas tetra pack. Alfa laval editor. 2003, 600 p.

MADSEN, K Cornish A., SOPER, P., MC KAIGNEY, C., JIJON, H., YACHIMEC, C., DOYLE, J., JEWELL, L., DE SIMONE, C. Probiotic bacteria enhance murine and human intestinal epithelial barrier function gastroenterol. 2001,591 p.

MACKAY AD,Taylor., MB, Kibbler CC., HAMILTON-MILLER, jmt. *Lactobacillus endocarditis caused by a probiotic organism*. Clin Microbiol Infect.1999,292.

Marteau,P.*Safety aspects of probiotic products*. Scand J Nutr. 1997. 350 p.

MAJAMAA, h., ISOLAURI, e., SAXELIN, m., VESIKARA, t. Lactic acid Bacteria in the treatment of aute rotavirus gastroenteritis. J petriater gastroenterol.1995, 338 p.

MARTEAU, P., VAERMAN, J.p., DEHENNIN, J.P., BORD, S., BRASSART, D., POCHART, P., DESJEUX, J.F., RAMBAUD, J.C. Effects of intrajejunal perfusion and chronic ingestion of lactobacillus johnsonii strain Lal on serum concentrations and jejuna secretions of immunoglobulins and serum proteins in healthy humans. Gastroenterol Clin Biol 1997; 21: 293-298

METCHNIKOFF, Optimistic studies New York: Putman's Sons. 1907, 161-183 p.

MEYDANI, S., HA, w. Imnumologic effects of yougurt. Am J clin nutr. 2000, 872 p.

MEIER, r., BURRI, E., STEUERWALD, M., The role of nutrition in diarrhea syndrome. Curr Opin Clin Nutr Metab Care. 2003. 567 p.





MILLER Y, lander h. Prophylactic effect of a Lactobacillus casei preparation on the recurrence of superficial bladder cancer. Urol Int. 1967,129.

MOHANIA D, Nagpal R, Kumar M, Bhardwaj A, Yadav M, Jain S, Marotta F, Singh V, Parkash O, Yadav H. Molecular approaches for identification and characterization of lactic acid bacteria. J Dig Dis. 2008;198 p.

MULLIS, Kb. The unusual origin of the polymerase chain reaction. Sci Am. 2003 262 p.

MIKLOS et al. Comparative genomics of the eukaryotes. 2003, 250 p.

MULLIS, k., FALOONA, F., SCHARF, S., SAIKI, R., HORN, G., ERLICH, H., Specific Enzymati ampliacion od DNA in vitro: the polymerase chain rection. Cold spring harb symp qunt boil. 1986, 273.

MUÑOS, Moreno José., Lactologia Industrial. Editorial acribia, Zaragoza, 2007, 279 p.

MURCH, S.H. Toll of allergy reduced probiotics. Lncet 2001; 357:1057-1059.

Nagafuchi, S., Takahashi, T., Yahima, T., kuwata, T., Hirayama, K ithoh, k Strain dependency of the immunopotentiating activity of lactobacillus delbruekii subps bulgaricus. Biosci biotech biochem. 1999, 479 p.

OGGIONI, mr., POZZI, G., BALENSIN, pe., GALIENI, P., BIGAZZI, c. *Recurrent septicemia in an immunocompromised patient due to probiotic strains of Bacillus subtilis*. J Clin Microbiol, 2002, 326 p.

Okonko, P. and Kinsella, J.E. journal of diary science. 1969, 553 p.

Oksanen, P.J., Salminen, S., Sxelin, M., Hamalainen, P. Prevention of traveller's diarrhea by lactocbacillus GG. Ann Med. 1990, 56 p.

Ottogali et al Modification of gastro-intestinal function. In: Yakult Central Institute for Microbiological Research, ed. Lactobacillus casei strain Shirota. Tokyo: Yakult Honsha Ltd. 1974,128.

OUWEHAND, Ac., LAGSTROM, H., SUOMALAINEN, T., SALMINEN, s. Effect of probiotics on constipation, fecal azoreductase activity and fecal mucin content in the elderly. Ann Nutr Metab. 2002,162 p.



ÖZEN, S.; ÖZILGEN, M. Effects of substrate concentration on growth and lactic acid production by mixed cultures of *Lactobacillus bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus*. *Journal Chem. Tech Biotechnol.* 1992,61p.

PRAJAPATI et al., r, B., A KNEIFEL, W. Development of a culture medium for the detection and enumeration of bifidobacteria in fermented milk products. *International Dairy Journal.*1986. 64 p.

PERDIGÓN, G., ÁLVAREZ, S., RAHID, M., AGÜERO, G., GOBBATO, n. Immune system stimulation by probiotics symposium: Probiotic bacteria for humans: clinical systems for evaluation of effectiveness. *J dairy Sci.* 1995, 1606 p.

PESSI, T., SUTAS, Y., HURME, M., ISOLAURI, E. Interleukin-10 generation in atopic children following oral lactobacillus rhamnosus GG. *Clin Exp Allergy.* 2000, 1808 p.

POTHULAKIS, C., KELLY. C.P., JOSHI, M.A., GAO, N. *Saccharomyces boulardii* inhibits clostridium difficile toxin a binding and enterotoxicity in rat ileum. *Gastroenterology.* 1993, 1115.

PETTE, J W. and LOLKEMA, J. *Netherlands milk and dairy Journal.* 1950, 4,261 p.

Potter, N. Norman., Hotchkiss H. Joseph. *Ciencia de los alimentos*, 5 edición, editorial acribia. 2007, 667 p.

PUHAN, Banhegyi y Flüer, *Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects.* Third Edition.1973, 345 p.

QUINTERO, ramírez Rodolfo., GARCÍA Garibay Mariano,, López, Munguía Agustín.*Canales Biotecnología alimentaria.* Editorial Limusa.1993, 636 p.

RAO. D. R., and PULUSANI, S.R. *Journal of Food Science.* 1981.

RAUTIO, M., JOUSIMIES-SOMER, H., KAUMA, H., PIETARINEN, I., SAXELIN, M., TYNKKYNNEN, S., KOSKELA, M. *Liver abscess due to a Lactobacillus rhamnosus strain indistinguishable from L. rhamnosus strain GG.* *Clin Infect Dis.* 1999. 1160 p.

RAY y Bhunia. *Fundamentos de microbiología de los alimentos.* Cuarta edición. 2010, 320 p.

REDDY, B.S. Prevention of colon cancer by re-and proiotics: Evidence from laboratory studies. *Briet J nutrition.* 1998, 223 p.



REID, G., BURTON, J. Use Of Lactobacillus to prevent Infections by pathogenic bacteria. *Microbes Infect.* 2002, 324 p.

REID, G., BRUCE, A.W. Urogenital infections in women: can probiotics help *Postgrad Med J.* 2003, 432 p.

RICHARD, V., AUWERA, P., SNOECK, R., DANEAU, D., MEUNIER, F. *Nosocomial bacteremia caused by Bacillus species.* *Eur J Clin Microbiol Infect Dis: Report of the Scientific Committee on Animal Nutrition on the Safety of Use of Bacillus Species in Animal Nutrition.* (European Commission Health & Consumer Protection). 1988.

Roos. K., Grahn Hakansson, E., Holm, S. Effect of recolonisation with interfering streptococci on recurrences of acute and secretory otitis media in children: randomized placebo-controlled trial *BMJ* 2001:322 1-4.

SAARELA, M., MONGENSEN, G., FODÉN, R., MAITTO, J., MATTILA-SANDHOLM, T. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties, *J biotechnol.* 2000, 215 p.

SAMBROOK, Joseph., Russell David William *Molecular cloning* CSHL Press. 2001, 2344 p.

SANCHINANDAN D. et al., A., a Robinson, R. K. Effect of yogurt cultures on the survival of bifidobacteria in fermented milks. *Journal of the Society of Dairy Technology.* 2001, 60 p.

SAIKI, RK., GELFAND, DH., STOFFEL, S., SCHARF, S., HIGUCHI, R., HORN, GT., MULLIS, K., ERLICH, HA. Primer-Directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 1988, 491p.

SANDERS, ME. Considerations for use of probiotic bacteria to modulate human health. *J Nutr* 2000, 390 p.

SAAVEDRA, J.M., BAUMAN, N.A., DUNG, I., PERMAN, J.A., YOLKEN, R.H. To infants in hospital for prevention of diarrhoea and shedding of rotavirus. *Lancet* 1994, 1049 p.

SAKAMOTO I Igarashi, M., KIMURA, K., TAKAGI, A., MIWA, T., KOGA Y. Suppressive effect of lactobacillus gasseri OLL 2716 (LG21) on helicobacter pylori infection in humans. *J Antimicrob Chemother* 2001, 710 p.

SHANKAR, P. A., A DAVIES, F. L. A note on the suppression of Lactobacillus bulgaricus in media containing beta-glycerophosphate and application of such



media to selective isolation of *Streptococcus thermophilus* from yoghurt. *Journal of Society of Dairy Technology*. 1977, 30 p.

SCHEREZENMEIR, J., DE VRESE, M., Probiotics, prebiotics and synbiotics approaching a definition. *Am J clin Nutr*. 2001, 364 p.

SCHIFFRIN, E.J., BLUM, S. Food processing: Probiotic microorganisms for beneficial foods. *Curr Opin Biotechnol*. 2001, 502 p.

SCHIFFRIN, E.J., ROCHAT, F., LINKIN-AMSTER, H., AESCHIMANN, JM., DONNET-HUGHES, A. Immunomodulation of human blood cells following the ingestion of lactic acid bacteria. *J dairy Sci*. 1995, 497 p.

SIITONEN, S., VAPAATALO, H., SALMINEN, S., GORDIN, A., SAXELIN, M. Effect of lactobacillus GG yogurt in prevention of antibiotic associated diarrhoea. *Ann Med*. 1990, 59 p.

SURAWICZ, C.M. Probiotics, antibiotic-associated diarrhea and *clostridium difficile* diarrhea in human. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2003.783 p.

SULLIVAN, A nord., C.E. Probiotics in human infections. *J Antimicrob chemother*. 2002, 627 p.

SPANHAAK, S., HAVENAAR, R., SHAAFSMA, G. The effect of consumption of milk fermented by *lactobacillus casei* strain shirota on the intestinal microbiota and immune parameters in humans. *Eur J clin Nutr*. 1998, 907 p.

Taranto, M.P., MEDICI, M., PERDIGÓN, G., RUIZ Holgado, A, P., VALDEZ, G. F. Evidence for hypocholesterolemic mice. *J dairy Sci*. 1998, 2340 p.

TAKAHASHI et al. *BioScience-Biotechnology and Biochemistry*. 1993,1560 p.

Tejuda et al. Effects of *Lactobacillus* spp. On cytokinane production of RAW 264.7 macrophage and EI-4 thynoma cell lines. *Journal of Food Protection*. 1999,169 p.

TEMPLETON, NS., The Polymerase chain raction. History, methods, and applications. *Diagn Mol Payhon*. 1992, 72 p.

TISSIER et al. *Dairy Microbiology Handbook: The Microbiology of Milk and Milk Products*. 2005, 1945 p.

WALTER, J. and Newport, J. Initiation of eukaryotic DNA replication: origin unwinding and sequential chromatin-association of cdc45, RPA, and DNA polymerase a. *Molecular Cell*. 2006, 627 p.



VITINI, E., ÁLVAREZ, S., MEDIAN, M., MEDICI, M., BUDEGUER, M., PERDIGON, G. Gut mucosal immunostimulation by lactic acid bacteria Biocell. 2001,232 p.

**Sitios web consultados:**

<http://www.isapp.net/about.asp>. [consulta:18 marzo 2013].

Food and Drug Administration [en línea]<http://www.fda.gov/> [consulta:19 mayo 2013]

FAO/WHO, <http://www.fao.org/es/ESN/probio/probio.htm> (2001) [consulta:28 abril 2013].

Codex alimentarius [En línea] <http://www.codexalimentarius.org/> [consulta: 01 enero 2014]

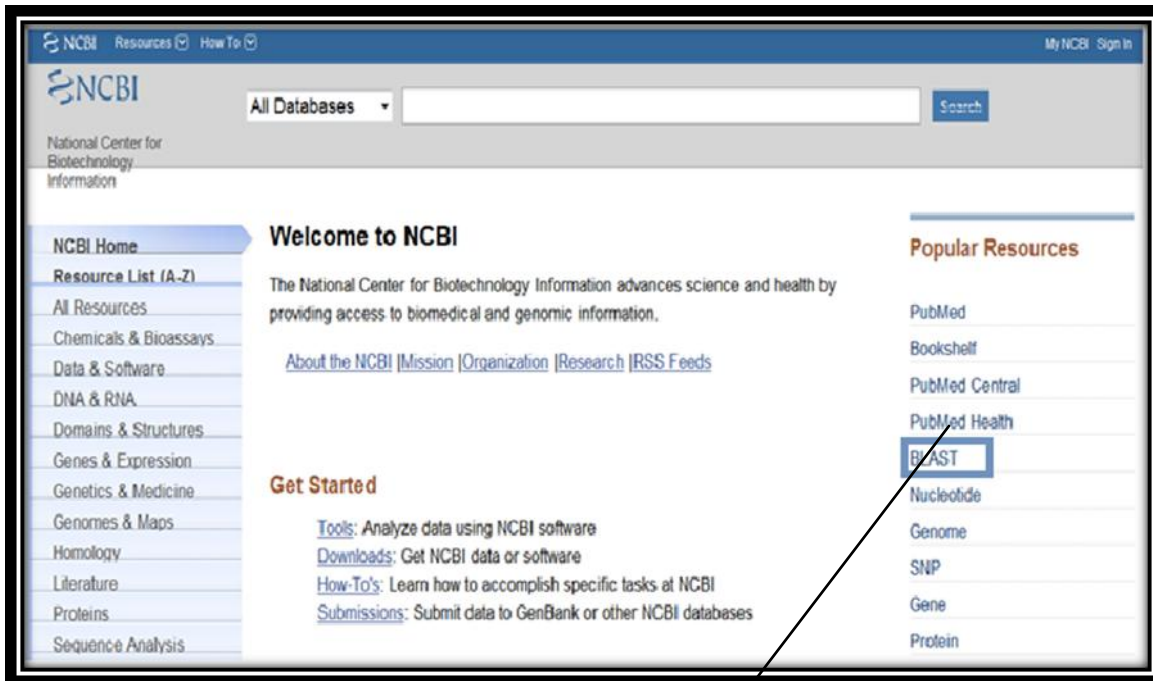
Fuente Pakes H. 2003 Food for thought [http://www.chemsoc.org/chembytes/ezine/1999/parkes\\_may99.htm](http://www.chemsoc.org/chembytes/ezine/1999/parkes_may99.htm). [consultado:13 febrero de 2014].



## ANEXO 1

## PARA ESPECIFICIDAD DE PRIMERS

**PASO 1.** Ir a la siguiente dirección electrónica (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) y dar clic en BLAST



DAR CLIK

**Paso 2:** Después de dar clic en BLAST manda a la siguiente página en la cual seleccionaremos la sección de specialized BLAST y escogeremos la opción de Make specific primers with PRIMERS BLAST dar click.





## Basic BLAST

Choose a BLAST program to run.

<a href="#">nucleotide blast</a>	Search a <b>nucleotide</b> database using a <b>nucleotide</b> query <i>Algorithms: blastn, megablast, discontinuous megablast</i>
<a href="#">protein blast</a>	Search <b>protein</b> database using a <b>protein</b> query <i>Algorithms: blastp, psi-blast, phi-blast, delta-blast</i>
<a href="#">blastx</a>	Search <b>protein</b> database using a <b>translated nucleotide</b> query
<a href="#">tblastn</a>	Search <b>translated nucleotide</b> database using a <b>protein</b> query
<a href="#">tblastx</a>	Search <b>translated nucleotide</b> database using a <b>translated nucleotide</b> query

## Specialized BLAST

Choose a type of specialized search (or database name in parentheses.)

- Make specific primers with **Primer-BLAST**
- Search [trace archives](#)
- Find [conserved domains](#) in your sequence (cds)
- Find sequences with similar [conserved domain architecture](#) (cdart)
- Search sequences that have [gene expression profiles](#) (GEO)
- Search [immunoglobulins](#) (IgBLAST)
- Search using [SNP flanks](#)
- Screen sequence for [vector contamination](#) (vecscreen)
- [Align](#) two (or more) sequences using BLAST (bl2seq)
- Search [protein](#) or [nucleotide](#) targets in PubChem BioAssay
- Search SRA [transcript and genomic libraries](#)
- Constraint Based Protein [Multiple Alignment Tool](#)
- Needleman-Wunsch [Global Sequence Alignment Tool](#)
- Search [RefSeqGene](#)
- Search [WGS sequences](#) grouped by organism

DAR CLIK



**PASO 3:** Al dar clic, nos manda a la siguiente liga, el cual nos pide colocar la secuencia de primers, como se muestra a continuación:

Primer-BLAST: A tool for finding specific primers

NCBI Primer-BLAST: Finding primers specific to your PCR template (using Primer3 and BLAST). [more...](#) [Tips for finding specific primers](#)

[Reset page](#) [Save search parameters](#) [Retrieve recent results](#)

**PCR Template**

Enter accession, gi, or FASTA sequence (A refseq record is preferred)  [Clear](#)

Range

From  To  [Clear](#)

Forward primer

Reverse primer

Or, upload FASTA file  [Examine...](#)

**Primer Parameters**

Use my own forward primer (5'->3' on plus strand)  [Clear](#)

Use my own reverse primer (5'->3' on minus strand)  [Clear](#)

**Colocar la secuencia de primers seleccionados**

PCR product size: Min 70, Max 1000

# of primers to return: 5

Primer melting temperatures (T<sub>m</sub>): Min 57.0, Opt 60.0, Max 63.0, Max T<sub>m</sub> difference 3

**Exon/intron selection**

A refseq mRNA sequence as PCR template input is required for options in the section

Exon junction span: No preference

Exon junction match: Exon at 5' side 7, Exon at 3' side 4

Minimal number of bases that must anneal to exons at the 5' or 3' side of the junction

Intron inclusion:  Primer pair must be separated by at least one intron on the corresponding genomic DNA

Intron length range: Min 1000, Max 1000000





Esta parte es muy importante ya que aquí se verifica la especificidad de los primers seleccionados

En la parte de database: colocar todas las especies y en la parte de organism quitar homopiens y dejarlo vacio.

**Paso 1: Dar clic**

**Paso 1: Dar clic a ambas selecciones**



**Paso 4:** Al dar clic nos manda a la siguiente liga [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/primertool.cgi?ctg\\_time=1335471256&job\\_key=JSID\\_01\\_53862\\_130.14.22.21\\_9002](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/primertool.cgi?ctg_time=1335471256&job_key=JSID_01_53862_130.14.22.21_9002) la cual arroja los siguientes resultados:

Primer-BLAST *Primer-Blast results*

► NCBI/Primer-BLAST: results: Job id=JSID\_01\_53862\_130.14.22.21\_9002 [more...](#)

Input PCR template none  
Specificity of primers Target templates were found in selected database: Reference chromosomes  
Other reports [► Search Summary](#)

▼ Detailed primer reports

**Primer pair 1**

	Sequence (5'→3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	CTCAAACTAAACAAAGTTTC	21	43.94	28.57	5.00	3.00
Reverse primer	GTACACACCGCCCGTCA	17	53.67	64.71	4.00	1.00

Products on target templates: En esta zona nos da para que especies amplifican los primers, el cual nos muestra que amplifican para todas las especies de *Lactobacillus*, los resultados se muestran en la parte de anexos.

**ANEXO 2****FORMULA EN GRAMOS POR LITRO DE AGUA DESTILADA**

- Se prepararon 600 ml para 30 cajas petri, siguiendo la siguiente formulación diseñada para la preparación de 1L de agar rogosa.

Tabla 18. Formulación del agar rogosa.

AGAR	Cantidad (g)	Cantidad (g)
Extracto de carne	5	3
Extracto de Levadura	2.5	1.5
Acido ascorbico	0.5	0.3
Peptona de soya	5	3
Polipeptona de casitona	5	3
Acetato de sodio trihidratado	3	1.8
dextrosa	5	3
Agar	10	9.6
Agua destilada	1 L	600 ml



## ANEXO 3

## HIDRATACIÓN DE PRIMERS.

- A continuación se describe el método para la hidratación de los primers, el cual parte de la siguiente fórmula:

$$U = \frac{\text{micromoles}}{250} = 10E - 6$$

- Para lactobacillus (Primer Reverso)

% Contenido GC nmoles 32.7

$$\frac{32.7 \text{ nmoles}}{1000} = \frac{0.0327 \mu\text{m}}{250} = \frac{0.0001308}{10^{-6}} = 130.8 \mu\text{l agua libre de nucleasas}$$

- Para lactobacillus (Primer Frontal)

% Contenido GC nmoles 42.4

$$\frac{32.7 \text{ nmoles}}{1000} = \frac{0.0327 \mu\text{m}}{250} = \frac{0.0001308}{10^{-6}} = 130.8 \mu\text{l agua libre de nucleasas}$$

Nota: 250 mμ de primers

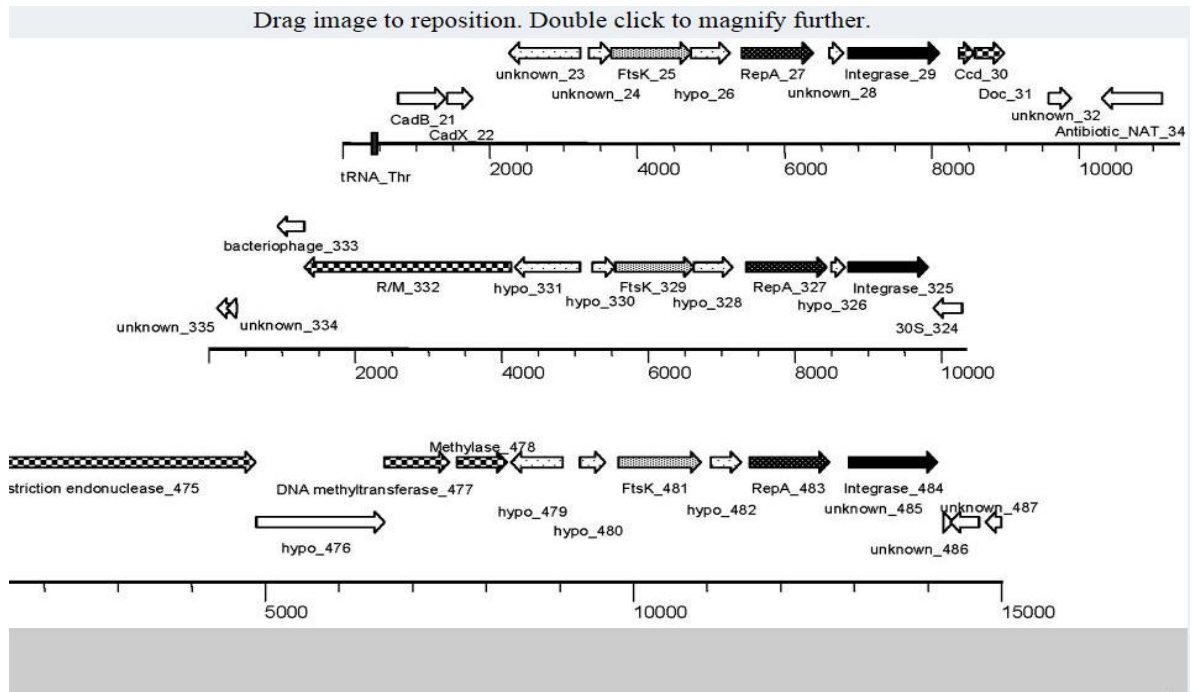




### Lactobacillus acidophilus 16S-23S rRNA spacer region

ORIGIN

1



ctaaggaagc gaaggatatg gagagtagaa atactaagag aagtatccag agcaagcgga  
 61 agcacactaa gaaactttgt ttagtttga gggtagtacc tcaaaagagt tagtacattg  
 121 aaaactgaat ataatccaag caaaaaaccg agacaatcaa agagaacaga ttgtagagcg  
 181 accgagaaga gaattcttgg gtaagg  
 //

### L.bulgaricus rrn operon, 16S-23S rRNA spacer (long), tRNA-Ile and tRNA-Ala genes

ORIGIN

1 ctaaggaaaa cagatggatg gagagcagaa atgctaagag aaatccatca gttacggaag

61 cacactgcaa aagaaacttt gttcagttt gagagtacca acaataagaa cttggcctg  
 121 tagctcagct ggtagagcg cagccttgat aagcgtgagg tcgatggtc aagtcacatc  
 181 aggccattg aatgcaaag aaaagtcttt agcattcag ccgatagga gtaacatctn  
 241 aaagtgata ttttacgggg gcatagctca gctgggagag cacctgcttt gcaagcagga  
 301 ggatcaggt tcgatcccg ttgcctccat tgccggaagg ccaagtttg acgttgaaaa  
 361 ctgaatatc taattccaag aaaaaaccga gaatcattga gatcaatgaa aacattgcaa  
 421 agcgaccgag agagttcgaa agaacaact tgcaa  
 //