



300627
4
203

UNIVERSIDAD LA SALLE

**ESCUELA DE QUIMICA
INCORPORADA A LA U.N.A.M.**

**"VIABILIDAD Y CAPACIDAD PRODUCTORA
DE ENTEROTOXINA A DE S. aureus
FRI-100 CON Y SIN DAÑO SUBLETAL EN LA
ELABORACION DE YOGURT"**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE :

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

PRESENTA:

SEMIRAMIS CASAS VELAZQUEZ

DIRECTOR DE TESIS:

M. en C. CONSUELO S. O. LOBATO CALLEROS

MEXICO, D.F.

1993.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



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 está 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.

I N D I C E

	Página
I. INTRODUCCION	1
1.1 <u>S. aureus</u>	1
1.1.1 Pruebas bioquímicas características	3
1.1.2 Factores que influyen en su crecimiento y desarrollo	7
1.1.2.1 pH y acidez del medio	8
1.1.2.2 Temperatura	8
1.1.2.3 Composición del medio	9
1.1.2.4 Actividad de agua	10
1.1.2.5 Competitividad con otros microorganismos por el medio	10
1.1.3 Comportamiento ante tratamientos térmicos	11
1.1.4 Métodos de recuento y aislamiento de <u>S. aureus</u> en alimentos	17
1.2 Enterotoxinas Estafilocócicas	19
1.2.1 Producción y estabilidad	21
1.2.2 Factores que influyen en su producción y estabilidad	22
1.2.2.1 Temperatura	22
1.2.2.2 Composición del medio	23
1.2.2.3 pH	26
1.2.2.4 Actividad de agua	27
1.2.2.5 Atmósfera	27
1.2.3 Métodos de detección de enterotoxinas	28
1.3 Intoxicaciones Estafilocócicas	34
1.3.1 Incidencia en México	35
1.3.2 Alimentos involucrados	36
1.3.3 Medidas de control	37
1.4 Leche	37
1.4.1 Definición	37
1.4.2 Principales características fisicoquímicas	37
1.4.3 Composición	40
1.4.3.1 Grasa	40
1.4.3.2 Sustancias nitrogenadas	40

1.4.3.3 Lactosa	41
1.4.3.4 Cenizas	41
1.4.4 Funcionalidad como medio de cultivo	44
1.4.4.1 Flora microbiana	45
1.4.5 Alteraciones, defectos y contaminaciones	45
1.4.6 Situación actual de la industria lechera en México	47
1.5 Yogurt	52
1.5.1 Historia de su elaboración	52
1.5.2 Definición	53
1.5.3 Fundamentos de su elaboración	53
1.5.3.1 La leche como materia prima	54
1.5.3.2 Estandarización de grasa y extracto seco magro	55
1.5.3.3 Homogenización	56
1.5.3.4 Tratamiento térmico	60
1.5.3.5 Proceso de fermentación	63
1.5.3.5.1 Importancia de cultivos lácticos: <i>Streptococcus thermophilus</i> y <i>Lactobacillus bulgaricus</i>	63
1.5.3.5.2 Modificaciones en la leche durante la fermentación	67
1.5.3.5.3 Recuento, aislamiento e identificación de los cultivos lácticos	68
1.5.3.6 Enfriamiento	71
1.5.3.7 Envasado	71
1.5.3.8 Almacenamiento	72
1.5.4 Contaminaciones del producto	72
1.5.5 Norma microbiológica	73
1.6 Justificación	78
II. OBJETIVO	79
III. MATERIALES Y METODOS	80
3.1 Caracterización de la Cepa de <i>S. aureus</i>	80
3.1.1 Observación microscópica	80
3.1.2 Morfología colonial	80
3.1.3 Prueba de termonucleasa	80
3.1.4 Prueba de coagulasa	81
3.1.5 Prueba de catalasa	81
3.1.6 Fermentación de azúcares	81
3.1.7 Reacción de Voges-Proskauer	82
3.1.8 Motilidad	82
3.1.9 Producción de enterotoxina	82
3.2 Adaptación de <i>S. aureus</i> en Caldo Lactosado	84

3.3	Curva de Crecimiento	88
3.4	Estandarización del Inóculo	88
3.5	Análisis Microbiológico de la Leche	89
3.5.1	Mesófilos aerobios	89
3.5.2	Coliformes totales	89
3.5.3	Aislamiento e identificación de <u>Salmonella</u> spp ..	90
3.5.4	Aislamiento e identificación de <u>S. aureus</u>	90
3.6	Tratamiento Térmico de <u>S. aureus</u>	91
3.7	Selección de Medios de Cultivo para Recuento y Aislamiento de los Cultivos Lácticos	96
3.8	Elaboración de Yogurt con y sin Inóculo de <u>S. aureus</u> Dañado y sin Lesión Subletal	97
3.9	Análisis Durante el Proceso	102
3.10	Semicuantificación de Enterotoxina	102
IV.	RESULTADOS Y DISCUSION	105
4.1	Caracterización de la Cepa de <u>S. aureus</u>	105
4.1.1	Morfología microscópica	105
4.1.2	Morfología colonial	106
4.1.3	Pruebas bioquímicas	106
4.1.4	Producción y detección de enterotoxina A	111
4.2	Curva de Crecimiento	113
4.3	Estandarización del Inóculo	117
4.4	Análisis Microbiológico de la Leche en Polvo	117
4.5	Tratamiento Térmico de <u>S. aureus</u>	118
4.6	Selección de Medios de Cultivo para Recuento y Aislamiento de los Cultivos Lácticos	124
4.7	Análisis Durante el Proceso	126
4.8	Semicuantificación de Enterotoxina A	128
V.	CONCLUSIONES	135
VI.	BIBLIOGRAFIA	136

INDICE DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Características diferenciales de las especies de <i>Staphylococcus</i>	5
Cuadro 2. Características bioquímicas de <i>S. aureus</i>	6
Cuadro 3. Características físicas y químicas de las enterotoxinas estafilocócicas	24
Cuadro 4. Factores que intervienen en la producción de enterotoxinas estafilocócicas	25
Cuadro 5. Características fisicoquímicas de la leche	39
Cuadro 6. Composición general de la leche	42
Cuadro 7. Esquema comparativo de la composición de la leche	43
Cuadro 8. Principales grupos microbianos en la leche cruda	48
Cuadro 9. Importaciones de leche en polvo	49
Cuadro 10. Producción Nacional de leche de vaca	50
Cuadro 11. Necesidades estimadas de leche fluida	51
Cuadro 12. Métodos de fortificación/normalización de la leche	58
Cuadro 13. Modificaciones fisicoquímicas debidas a la homogenización	59
Cuadro 14. Características morfológicas de cultivos lácticos	70
Cuadro 15. Especificaciones físicas y químicas para el yogurt tipo I y II	75

Cuadro 16. Especificaciones físicas y químicas para el yogurt tipo II	76
Cuadro 17. Especificaciones microbiológicas para el yogurt	77
Cuadro 18. Morfología colonial de <i>S. aureus</i> FRI-100	109
Cuadro 19. Características bioquímicas de <i>S. aureus</i>	110
Cuadro 20. Resultados obtenidos del tratamiento térmico de <i>S. aureus</i> a 72°C	121
Cuadro 21. Cinética de microorganismos en yogurt	129
Cuadro 22. Porcentaje de destrucción de <i>S. aureus</i> durante la elaboración de yogurt	133
Cuadro 23. Detección de enterotoxina A en yogurt por RPLA ..	134

INDICE DE FIGURAS

	<i>Página</i>
<i>Figura 1. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)</i>	<i>31</i>
<i>Figura 2. Técnica de celofán para producción de enterotoxina</i>	<i>85</i>
<i>Figura 3. Reversed Passive Latex Agglutination (RPLA)</i>	<i>86</i>
<i>Figura 4. Grados de Aglutinación (RPLA)</i>	<i>87</i>
<i>Figura 5. Método de Baird-Parker para recuento de S. aureus</i>	<i>93</i>
<i>Figura 6. Método de Van Doorne para aislamiento de S. aureus</i>	<i>94</i>
<i>Figura 7. Método de tubo capilar</i>	<i>95</i>
<i>Figura 8. Diagrama de flujo para la elaboración de yogurt</i>	<i>99</i>
<i>Figura 9. Elaboración de yogurt con inóculo de S. aureus sin daño subletal</i>	<i>100</i>
<i>Figura 10. Elaboración de yogurt con inóculo de S. aureus con daño subletal</i>	<i>101</i>
<i>Figura 11. Proceso de extracción simple de enterotoxina estafilocócica</i>	<i>104</i>
<i>Figura 12. Curva de crecimiento de S. aureus FRI-100</i>	<i>116</i>
<i>Figura 13. Porcentaje de destrucción de S. aureus FRI-100 ..</i>	<i>122</i>
<i>Figura 14. Porcentaje de daño térmico causado a S. aureus FRI-100</i>	<i>123</i>
<i>Figura 15. Comportamiento de S. aureus FRI-100 sin daño subletal durante la elaboración de yogurt</i>	<i>130</i>

- Figura 16. Comportamiento de *S. aureus* FRI-100 dañado
subletalmente durante la elaboración de yogurt .. 131
- Figura 17. Comportamiento de cultivos lácticos en la
elaboración de yogurt 132

C A P I T U L O I

CAPITULO I

INTRODUCCION

1.1 S. aureus.

El género Staphylococcus está clasificado taxonómicamente dentro de la familia Micrococcaceae. Actualmente se sabe de la existencia de varias especies de este género, pero son únicamente cuatro las que representan un factor de riesgo para la salud: S. aureus, S. epidermis, S. haemolyticus y S. hominis, cuyo comportamiento ante reacciones bioquímicas específicas es distinto (cuadro 1) (47).

S. aureus se define como cocos gram positivos, de 0.5-1.5 micras de diámetro, no móviles, no formadores de esporas, capaces de dividirse en más de un plano y encontrarse en forma de racimos irregulares. Se desarrolla mejor en condiciones aerobias pero es anaerobio facultativo (45). La mayoría de las cepas son capaces de crecer en presencia de cloruro de sodio (NaCl) al 15% (1)(12).

En agar nutritivo S. aureus forma colonias redondas, convexas, de 1-4 mm de diámetro, suaves, butirosas y húmedas, las cuales en condiciones anaerobias de crecimiento o en cultivo líquido producen un pigmento de color dorado debido a la

presencia de carotenos, sin embargo en ocasiones éste puede variar de blanco a anaranjado fuerte de una cepa a otra e incluso entre las mismas colonias. Dicha característica le permite poder ser diferenciado de otras variedades (39)(143). La mayoría de las cepas crecen en medios de cultivo definidos, conteniendo glucosa, sales, aminoácidos, tiamina y ácido nicotínico principalmente (18). *S. aureus* fermenta la glucosa y el manitol en condiciones aerobias y es coagulasa positivo (67).

Se considera ubicuo por encontrarse ampliamente distribuido en la naturaleza, puede aislarse del agua, aire, suelo, ropa e insectos, siendo sus principales reservorios el hombre y los animales. Los hábitats más comunes de este organismo en el hombre son las mucosas de las membranas nasofaríngeas y la piel. Su incidencia es generalmente más elevada en individuos asociados con ambiente hospitalario, debido a que algunas infecciones con pústulas y calenturas y enfermedades como neumonías, endocarditis y quemaduras la piel, son producidas por estafilococos (19)(38).

De acuerdo con el manual Bergey, *S. aureus* es considerado la única especie enterotoxigénica de *Staphylococcus*. Sin embargo, en la actualidad es ampliamente conocido que además de todas las cepas clasificadas como *S. aureus*, existen varias cepas pertenecientes a otras especies que son potencialmente patógenas (54). Estos organismos producen varias sustancias, algunas de las cuales son tóxicas al hombre y animales. Entre estas se encuentran las hemolisinas alfa, beta y gama, fibrinolisinias, penicilinasas, lipasas, proteasas y por último, no menos

importantes las enterotoxinas. De estas últimas se sabe más debido a la asociación que presentan con las intoxicaciones alimentarias. Sin embargo, existe cierta evidencia de que únicamente estafilococos coagulasa-termonucleasa positivos son capaces de sintetizar dichos metabolitos (22)(37).

Debido a la gran variedad de enterotoxinas producidas por el microorganismo, estas han sido designadas como A (SEA), B (SEB), C₁ (SEC₁), C₂ (SEC₂), C₃ (SEC₃), D (SED) y E (SEE). Estas son identificadas por sus reacciones con anticuerpos específicos, con excepción de las SEC, ya que todas estas reaccionan con el mismo anticuerpo mayor pero se distinguen con el anticuerpo menor (19).

1.1.1 Pruebas bioquímicas características. Con la finalidad de distinguir unos microorganismos de otros, incluso aquellos pertenecientes a la misma especie, se han desarrollado a lo largo de los años pruebas bioquímicas características para cada uno de ellos. En el caso del género Staphylococcus existen algunas reacciones para diferenciar a la especie aurus del resto de las especies, siendo las mencionadas a continuación las más significativas (cuadro 2).

Fermentación de hidratos de carbono. Esta prueba determina la capacidad que tiene un organismo para fermentar o degradar un carbohidrato específico incorporado a un medio, produciendo ácido o ácido con gas visible.

Generalmente para su realización se utiliza un medio de base rojo de fenol como indicador a pH 7.4 más el azúcar a fermentar

en una concentración de 1%. Por lo regular se emplean de 8 a 10 azúcares siendo los más frecuentes: glucosa, lactosa, sacarosa, manitol, dulcitol, adonitol, inositol, sorbitol y arabinosa (81).
Catalasa. Consiste en detectar la presencia de la enzima catalasa la cual se encuentra presente en la mayoría de las bacterias aerobias y anaerobias facultativas que contienen citocromo, confiriéndoles la capacidad de descomponer el peróxido de hidrógeno. La excepción es el Streptococcus (81).

Coagulasa. Comprueba la facultad de un organismo para coagular el plasma por acción de la enzima coagulasa. Esta prueba se utiliza específicamente en la diferenciación de especies pertenecientes al género Staphylococcus: S. aureus da reacción positiva comúnmente y S. epidermis la presenta negativa. Frecuentemente es utilizada como índice de virulencia o patogenicidad (14)(81).

Por lo general, el criterio más ampliamente utilizado para verificar la toxigenicidad y patogenicidad de cepas de S. aureus de otros microorganismos saprófitos es la prueba de coagulasa, debido a que la enzima producida es relativamente termoestable, pudiendo soportar temperaturas de 60°C por 30 min. (148).

Motilidad. Determina si un organismo es móvil o inmóvil por medio de sus flagelos (81).

Fosfatasa. Por medio de ésta se determina la capacidad que tiene un organismo para producir la enzima fosfatasa en cantidad suficiente como para desdoblar el difosfato de fenoftaleína. Es importante en la determinación de cepas patógenas de las especies Staphylococcus (81).

Cuadro 1. CARACTERISTICAS DIFERENCIALES DE LAS ESPECIES
DE *Staphylococcus*.

MEDIO DE PRUEBA	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermis</i>	<i>S. hyicus</i>	<i>S. intermedius</i>
Coagulasa	+	-	V	-
DNasa	+	V ₂	V	+
Manitol	Acido	V	-	-
Fosfatasa	V ₁	V		
Pigmentación	Dorada	Blanca	Blanca	Blanca
Hemólisis	+	V ₃	-	+

V₁ Variable, en su mayoría positiva

V₂ Variable, en su mayoría negativa

V₃ Variable

Fuente: Bergdoll, M.S. (1972).

Cuadro 2. CARACTERISTICAS BIOQUIMICAS DE *S. aureus*.

PRUEBA	RESPUESTA
Catalasa	+
Coagulasa	+
Termonucleasa	+
Fermentación de manitol	+
Fermentación de lactosa	+
Fermentación de sacarosa	+
Fermentación de glucosa	+
Motilidad	-
Licuefacción de gelatina	+
Reacción de Voges-Proskauer	+
Reducción de nitrato	+

+ Prueba positiva

- Prueba negativa

Fuente: Mac Faddin, J. F. (1990)

Reacción de Voges-Proskauer. Se utiliza para evidenciar a aquellos que forman acetilmetilcarbinol (acetoína), como producto final neutro de la fermentación de la glucosa (81).

Termonucleasa. La producción de endonucleasa termoestable es una propiedad característica de casi todas las cepas de S. aureus; esta enzima se detecta utilizando el agar ADN-azul de toluidina (14)(37).

En alimentos, principalmente en leche y productos lácteos, existe una estrecha relación entre el crecimiento de S. aureus y la producción de DNasa termoestable (termonucleasa) y entre esta última y la síntesis de enterotoxina (108). Cords y Tatini, Park et al y Batish et al (13)(34)(99), han recomendado la prueba de termonucleasa como un método rápido y confiable para la detección de cepas enterotoxigénicas en productos lácteos.

Reducción de nitratos. Determina la capacidad de un organismo para reducir el nitrato en nitritos o en nitrógeno libre (81).

Dicha reducción de nitrato (NO_3^-) en nitrito (NO_2^-) y en gas nitrógeno (N_2) se lleva a cabo generalmente en condiciones anaeróbicas, en donde el organismo obtiene el oxígeno del nitrato.

Licuefacción de gelatina. Permite la identificación de organismos que producen enzimas de tipo proteolítico (gelatinasas) que se encargan de licuar la gelatina.

1.1.2 Factores que influyen en su crecimiento y desarrollo.

Aún cuando S. aureus es un organismo que se caracteriza por una

resistencia relativamente elevada a diferentes agentes físicos, como son cambios bruscos de temperatura y de pH, existen condiciones que pueden influir negativamente en su crecimiento y desarrollo.

1.1.2.1 pH y acidez del medio. La mayoría de las cepas del género Staphylococcus se desarrollan a valores de pH entre 4.5 y 9.3, siendo el rango óptimo de 7.0 a 7.5; aunque éste depende del tipo de medio, de la concentración de cloruro de sodio existente, la atmósfera y la cantidad de inóculo (18).

Minor y Marth (88), han encontrado que el ácido acético ejerce un efecto inhibitorio sobre S. aureus mayor que el provocado por el ácido láctico, y éste a su vez causa una inhibición mayor que el hidrociorhídrico. Sin embargo, se ha demostrado que a temperaturas de 10 a 37°C, el daño por acidez no provoca la inactivación de S. aureus, pero a 45°C hay una pérdida de la viabilidad del microorganismo.

Se ha observado que el daño causado por acidez no provoca ninguna lesión en la membrana celular del microorganismo, pero sí ejerce una inhibición en la síntesis de su RNA (72).

1.1.2.2 Temperatura. S. aureus es un mesófilo típico, crece a temperaturas entre 6.5 y 46°C, siendo la óptima entre 30 y 37°C, no obstante es capaz de adaptarse y desarrollarse a temperaturas de 10 a 45°C, incluso algunas cepas tienen la habilidad de crecer por arriba o abajo de dichos valores cuando

el medio contiene sustancias termoprotectoras como NaCl o aminoácidos (glutamato monosódico) (8)(45)(61).

1.1.2.3 Composición del medio. Existen varias sustancias incluidas en los alimentos que pueden influir en el crecimiento de *S. aureus*. El cloruro de sodio contenido en el medio puede afectar el desarrollo del microorganismo debido a que la sensibilidad que presenta ante este compuesto varía de acuerdo a la edad fisiológica del cultivo (56). La concentración salina necesaria para inhibir el crecimiento del microorganismo depende del tipo de éste, pH, actividad de agua, temperatura y composición química del sustrato (41).

Otra sustancia que provoca inhibición sobre *S. aureus* es el nitrito de sodio (NaNO_2), siendo suficiente pequeñas cantidades. Fang et al (42) observaron que este efecto está en relación al pH del medio de cultivo en el que se encuentre el microorganismo.

El efecto protector que ejercen sales de metales monovalentes sobre *S. aureus*, parece ser debido principalmente al anión cloro Cl^- , ya que en estudios realizados por Hurst et al (60), se ha observado que otros aniones además del cloro no tuvieron efecto protector alguno. Sin embargo, también se observó que el catión no carecía completamente de efecto, porque NH_4Cl resultó ser menos efectivo que el NaCl o KCl y el LiCl no sirvió del todo como agente protector.

La tasa de crecimiento de *S. aureus* en condiciones anaeróbicas es más baja que en presencia de oxígeno (32).

1.1.2.4 Actividad de agua. Existe un valor de actividad de agua (Aa) óptimo que permite un crecimiento máximo del microorganismo, el cual decrece cuando la Aa se reduce y llega a cesar cuando ésta disminuye drásticamente. S. aureus cultivado anaeróbicamente, es inhibido a niveles de Aa de 0.90, mientras que en condiciones aeróbicas la Aa mínima es de 0.86. En general, bajo condiciones desfavorables como presencia de agentes conservadores, pH bajos o temperaturas de crecimiento subóptimas, la capacidad del microorganismo para proliferar a valores de Aa más bajos disminuye (45)(92).

1.1.2.5 Competitividad con otros microorganismos por el medio. Generalmente, niveles bajos de S. aureus no son buenos competidores en alimentos crudos además, a temperaturas que favorezcan el crecimiento de éste, la flora saprófita normal de los alimentos es antagónica, actuando competitivamente frente a los elementos nutritivos y modificando las condiciones ambientales hasta hacerlas desfavorables para el crecimiento de estafilococo (67).

Así mismo, S. aureus es un competidor relativamente débil y en ocasiones varias bacterias pueden inhibir su crecimiento o proliferar más que él. Por lo general no logra desarrollarse bien ante la presencia de otros organismos a menos que su inóculo sea mucho mayor que el del competidor, por ejemplo en una proporción de 100:1 los coliformes, algunas especies de Proteus y bacterias ácido lácticas, inhiben el crecimiento de S. aureus, siendo mayor

el efecto a temperaturas de 15°C que a 30°C. Otro ejemplo es el comportamiento que Staphylococcus tiene ante la presencia de estreptococo; se ha demostrado que cuando Streptococcus lactis creció en un caldo nutritivo junto a S. aureus, éste fue capaz de incrementar su población en una dilución, sin embargo no produjo enterotoxina. Es por esto que la relación inhibitoria de otras bacterias con estafilococo puede ser de ayuda para prevenir la producción de toxinas en alimentos (12)(22)(129).

La inhibición microbiana de S. aureus es debida principalmente a los productos ácidos, bajo pH, producción de peróxido de hidrógeno u otras sustancias inhibitorias como antibióticos, compuestos volátiles, sustancias bacteriostáticas o competencia por nutrimentos esenciales.

La mayoría de las bacterias que se encuentran en los alimentos suprimen el crecimiento de S. aureus, aunque existen algunos que pueden ejercer un efecto estimulante. La inhibición originada por la flora microbiana de los alimentos sobre S. aureus, depende de ciertos factores que incluyen la proporción del microorganismo con los competidores, la temperatura y atmósfera de almacenamiento, las características intrínsecas del alimento tales como pH y actividad de agua y la capacidad de la flora para producir compuestos inhibitorios o estimulantes (37).

1.1.3 Comportamiento ante tratamientos térmicos. La aplicación de calor constituye la forma más común para destruir microorganismos tanto en la industria de alimentos como en muchas

otras. Cuando el tratamiento térmico empleado no es el suficiente para causar la destrucción del organismo, éste sólo sufre lo que se conoce como daño subletal: fenómeno que provoca un estado de desequilibrio metabólico. Dicho daño está relacionado directamente con la termorresistencia del microorganismo presente (41)(72).

El calentamiento subletal de la bacteria causa varias lesiones reparables: daño en la integridad de la membrana citoplasmática que ocasiona pérdida de material celular, aminoácidos, lípidos o iones, principalmente calcio y magnesio, hacia el medio de cultivo. Esta pérdida provoca una disminución en la halotolerancia del microorganismo, haciéndolo incapaz de formar colonias en medios conteniendo niveles elevados de NaCl (56)(72); la capacidad metabólica de las células se ve alterada, ya que existe una inactivación selectiva de las enzimas celulares y una desnaturalización parcial de la proteína celular. La mayor lesión es la degradación que sufre el RNA-ribosomal (53). Además, las células dañadas térmicamente al presentar una actividad metabólica mínima son incapaces de sintetizar enterotoxina (24).

Son dos las condiciones principales que pueden alterar la resistencia de *S. aureus* al calor:

Edad de las células calentadas. Ha sido demostrado que las células bacterianas en fase logarítmica de crecimiento son menos resistentes al calor que las tratadas durante la fase estacionaria (18).

Varios investigadores han mostrado que las células jóvenes

son menos resistentes a condiciones no favorables para su crecimiento que las maduras (149).

Composición del medio de cultivo. Existen ciertos componentes de los alimentos que pueden ejercer un efecto termoprotector sobre las células de S. aureus alterando su sensibilidad al calor. Entre éstos se encuentra la sacarosa, que provoca un incremento en la termorresistencia del microorganismo, mientras que la glucosa la disminuye (18)(128).

Se ha observado que el NaCl ejerce un efecto de protección, en lugar de inhibición sobre las células de S. aureus: les permite crecer a temperaturas mayores a las de su límite máximo, incrementa el valor de la constante de destrucción térmica, disminuye el daño causado por aplicación de procesos térmicos y favorece su desarrollo bajo condiciones desfavorables. Se ha comprobado además, que la morfología celular de S. aureus incubado a 45°C en presencia de cloruro de sodio (5.8%), es apreciablemente diferente de la presentada por aquellas células incubadas a 37°C en ausencia de este agente protector (58)(60).

Otras muchas sustancias juegan un papel importante en la resistencia que S. aureus presenta al calor, entre otros se encuentran el peróxido de hidrógeno, alginato de sodio, conservadores y algunos aditivos permitidos en la industria de alimentos (30).

Las células suspendidas en grasas, aceites o medios con alto contenido de ácidos grasos, son difícilmente destruidas a diferencia de las que se encuentran en medio acuoso, debido a la

escasa conductividad térmica de los lípidos (12)(67)(130).

Ha sido demostrado que la aparente sobrevivencia de las bacterias tratadas térmicamente, puede variar de acuerdo al uso de diferentes medios así como de la temperatura de incubación y el pH del medio (136).

En forma general, se sabe que *S. aureus* puede resistir mejor el calor en un pH próximo a 7.0 y que conforme el valor de este parámetro se aleja, ocurre un aumento en la sensibilidad térmica de las células, debido principalmente a que se presenta una pérdida de estabilidad tanto en las proteínas como en el mismo microorganismo. Es por esto que en alimentos muy ácidos es necesario aplicar un período menos prolongado de tratamiento térmico o una temperatura menor, para lograr una disminución en el número de microorganismos (67).

Conforme existe una disminución en el contenido de humedad del medio de suspensión, la resistencia que los organismos presentan al calor aumenta. La desnaturalización de las proteínas, mecanismo que provoca muerte térmica, se ve favorecido cuando se emplea calor húmedo. La forma exacta en que este calor facilita la desnaturalización de proteínas no ha sido definida, pero se piensa que es determinante en la formación de grupos -SH libres, lo que aumenta la capacidad de las proteínas para captar agua. La presencia de esta última permite la ruptura de enlaces peptídicos por calor, proceso que en su ausencia requiere de más energía (67).

En general, puede decirse que cuanto más rico en nutrimentos

sea el medio de cultivo mayor será la termoprotección sobre las células del organismo (19).

Se conoce que el daño térmico subletal en *S. aureus* es reversible, por lo que las condiciones de crecimiento a las que se somete el microorganismo después del tratamiento térmico son extremadamente importantes para la total recuperación de las células. El microorganismo debe ser transferido a un medio conteniendo una fuente de aminoácidos, fosfato, glucosa y magnesio principalmente; los valores de temperatura y pH óptimos para tal fin son 32°C y 6.0 respectivamente (55)(62). Cabe mencionar que las células dañadas térmicamente presentan un periodo lag mucho más largo que las que no lo están, pasando por lo que puede denominarse un "periodo de recuperación" cuyo mecanismo es complejo (18)(59)(62).

Allwood y Russell (4), por su parte han informado que bacterias que sobreviven a tratamientos térmicos aplicados (47°C y más), muestran un aumento en el periodo de latencia cuando el cultivo es transferido a un medio de recuperación, además la fase lag depende entonces de la temperatura a la cual se han mantenido las células durante el calentamiento. Así mismo, se ha encontrado que esta fase lag se incrementa conforme la exposición del organismo a temperaturas letales aumenta.

De acuerdo a lo observado por Jackson y Woodbine (66), un cultivo de *S. aureus* tratado térmicamente requiere de mayor tiempo para multiplicarse y alcanzar su número máximo de células en caldo nutritivo incubado a 37°C, que aquel cultivo que no ha

sido sometido a tratamiento con calor. Puede decirse que la aparente sobrevivencia de las bacterias tratadas térmicamente pueden llegar a variar por el uso de diferentes medios de cultivo, así como el tiempo de incubación y el pH del medio utilizado (136).

El almacenamiento de S. aureus a temperaturas de refrigeración (4-5°C), puede ocasionar igualmente un daño subletal. Jackson (65) ha observado que el mantener al microorganismo a una temperatura de 5°C durante 21 días, provoca un daño en su metabolismo ya que se ve incapacitado para crecer en medios en los que comúnmente se desarrolla, específicamente en agar manitol sal (MSA). Sin embargo, demostró que su recuperación es posible ya que su metabolismo no se ve detenido por completo; ciertas funciones como la multiplicación y la división celular no se llevan a cabo a esta temperatura, pero otras pueden continuar por lo que su metabolismo sólo se ve desbalanceado. Además la lesión provocada está en relación con el incremento en su sensibilidad al cloruro de sodio y a un incremento en los requerimientos nutricionales de S. aureus dañado.

Durante el período de reparación, el microorganismo es capaz de recuperar ciertas funciones que los tratamientos térmicos aplicados habían suspendido. El regreso de su halotolerancia es independiente de la recuperación de la actividad enzimática, de la síntesis de lípidos, del balance sodio/potasio y del transporte de sustancias. Sin embargo, de todas estas funciones la única necesaria para el crecimiento y multiplicación de S.

aureus es la reparación del RNA ribosomal durante el período de recuperación (59)(131).

Existen otros factores que pueden ayudar a una pronta recuperación de *S. aureus* cuando éste ha sido sometido a tratamientos térmicos. Se ha visto que la presencia de glucosa o extracto de levadura, por ejemplo, estimula su crecimiento al ocasionar que la longitud de la fase lag disminuya (4).

Smith y colaboradores (129), sugieren que del mismo modo que *S. aureus* es capaz de recuperarse de un daño térmico puede hacerlo de cualquier otro tipo de daño causado mediante algún proceso empleado en la industria de alimentos o incluso iniciar la síntesis de enterotoxina, sobre todo bajo temperaturas de almacenamiento elevadas.

1.1.4 Métodos de recuento y aislamiento de *S. aureus* en alimentos. Debido a la importancia que para la industria de alimentos y salud pública tiene *S. aureus*, se han desarrollado diversos medios de cultivo que permitan su crecimiento e identificación, haciéndose cada vez más selectivos para evitar el desarrollo de otros microorganismos ajenos, principalmente de especies *Bacillus*, pero al mismo tiempo no deben inhibir la proliferación de células de *S. aureus* estresadas (37)(63).

A pesar de los intentos realizados, no se ha logrado encontrar una combinación de sustancias adecuada que lleve al aislamiento óptimo y exclusivo del microorganismo en cuestión.

Para facilitar el aislamiento del organismo se han empleado

medios con diferentes agentes selectivos basándose principalmente en la tolerancia al cloruro de sodio de S. aureus, su habilidad para reducir los teluritos y fermentar el manitol y su reacción con lipovitelina (proteína del huevo), entre otros (93).

Existen en la actualidad diversos medios para el recuento y aislamiento del estafilococo como lo son:

- * Agar Manitol-Sal (MSA)
- * Agar Telurito-Glicina (TGA)
- * Agar Vogel-Johnson (VJA)
- * Agar Azida-Base sangre (ABA)
- * Agar Colbeck con Yema de huevo (CEY)
- * Agar Azida-Yema de huevo (EYAA)
- * Agar Fenoftaleína-Difosfato (PPAP)
- * Agar Telurito-Polimixin-Yema de huevo (TPEY)
- * Agar Tiocianato de potasio-Actidiona-Azida de sodio-Yema de huevo-Piruvato (KRANEP)
- * Agar Baird-Parker (BP) (35)(135).

El medio de cultivo de mayor uso actualmente es el agar Baird-Parker debido a su efectividad; existen informes en los que se mencionan que permite el crecimiento tanto de células dañadas como sin daño. Su selectividad se basa en 2 propiedades importantes que presenta el microorganismo durante su desarrollo:

- S. aureus utiliza la lipoproteína de la yema de huevo, la cual desarrolla un precipitado blanco alrededor de la colonia por la formación de sales de calcio y magnesio de ácidos grasos.
- S. aureus reduce el telurito formando colonias negruzcas. Esta

sustancia inhibe a varios microorganismos.

Una variedad de este agar se efectúa adicionándole piruvato y glicina, los cuales actúan como estimulantes selectivos del crecimiento, sin provocar toxicidad en el medio para las poblaciones estresadas (35).

Los métodos utilizados para su recuperación de una gran variedad de alimentos son selectivos o conllevan técnicas de enriquecimiento, impidiendo en la mayoría de los casos el desarrollo de otro tipo de microorganismo.

El método más usado y recomendado por la FDA (1976) es el de Baird-Parker (BP), el cual puede ser utilizado también para la recuperación de microorganismos dañados. Una modificación líquida de éste puede ser empleada para la identificación de *S. aureus* con lesión subletal, método conocido como Van-Doorne (145).

Las colonias desarrolladas en BP, después de un período de incubación del microorganismo no mayor a 48 horas a 37°C, son típicas de *S. aureus*: circulares, lisas, convexas, húmedas, de color gris a negro azabache, de 2 a 3 mm de diámetro, a menudo con una aureola externa blanca por la reducción del telurito y un halo opaco o claro por la acción que tiene sobre la yema de huevo. Generalmente las colonias con estas características se seleccionan y se someten a pruebas de coagulasa y termonucleasa con objeto de verificar (9)(10)(122).

1.2 Enterotoxinas Estafilocócicas.

Las enterotoxinas estafilocócicas son proteínas

extracelulares, de pesos moleculares relativamente bajos, termorresistentes y fácilmente solubles en agua y soluciones salinas. Estas son producidas en principio por *S. aureus*, sin embargo otras especies como el *S. intermedius* y *S. hvicus* han sido identificadas como enterotoxigénicas (21)(35).

Se encuentran clasificadas en 7 grupos: A, B, C₁, C₂, C₃, D y E; todas con estructuras biológicas similares. Su diferenciación se ha realizado mediante anticuerpos específicos (69)(113). De las toxinas producidas por alguna especie de estafilococo, la más toxigénica es la toxina A (17).

Cuando se encuentran puras, son de color blanco, son higroscópicas, solubles en agua y soluciones salinas. La secuencia de sus aminoácidos y puntos isoeléctricos se han podido determinar (18)(88). En el cuadro 3 se ilustran algunas de sus propiedades físicas y químicas.

Las enterotoxinas en estado activo, pueden resistir la acción de enzimas proteolíticas tales como tripsina, quimotripsina, renina y papaína, además estas toxinas son de las pocas de origen bacteriano de naturaleza proteínica resistentes al calor (18)(67).

Se ha observado que las enterotoxinas en alimentos no quedan completamente inactivadas por tratamientos térmicos comunes como la pasteurización. Tatini (142), afirma que el tratamiento térmico no garantiza la inactivación de dichas toxinas. Por otra parte, las toxinas que han pasado por un tratamiento térmico presentan mayor actividad biológica que las no tratadas. Read y

colaboradores (111), demostraron que los preparados brutos de toxina son más termoestables que las toxinas puras.

Químicamente las enterotoxinas son cadenas simples de polipéptidos que contienen cantidades relativamente grandes de lisina, aspartato, glutamato y tirosina. Aunque existen diferencias en la composición de las mismas, estas no revisten mayor importancia, excepto por el efecto que pueden ejercer sobre su punto isoelectrico (18).

1.2.1 Producción y estabilidad. Debido a que la enterotoxina estafilocócica A es una proteína típica, se presume que su biosíntesis es mediante reacciones típicas para la síntesis de proteínas; sin embargo, no es tan simple como la formación de proteína celular, ya que es posible obtener un buen crecimiento de *S. aureus* enterotoxigénico sin presentarse producción de enterotoxina (17).

Se ha señalado que las toxinas estafilocócicas pueden aparecer en los cultivos a la 4-6 horas y aumentar proporcionalmente a lo largo de la fase estacionaria y en la fase de transición (79).

Existen numerosos métodos para la producción de enterotoxinas en el laboratorio, pero su empleo depende principalmente de la extensión y propósito del estudio (18)(138).

El medio recomendado para la obtención de pequeñas cantidades de toxina, es Infusión Cerebro Corazón (BHI) con 1% de extracto de levadura, incubando a 37°C. Se usa la técnica de

celofán sobre agar cuando se trata de medio sólido; cuando el medio es líquido, se aplica el método de cultivo en saco (37).

Para la producción de grandes volúmenes de enterotoxina, se utiliza la caseína hidrolizada pancreática y sus variantes, debido a las ventajas que presentan al contener compuestos de bajo peso molecular de fácil eliminación durante su purificación (70).

1.2.2 Factores que influyen en su producción y estabilidad.

En general, la producción de enterotoxina está favorecida cuando las condiciones para el crecimiento son óptimas, sin embargo puede verse alterada por un número de factores diversos incluyendo la cepa del microorganismo, el medio de cultivo y las condiciones de éste (31).

En el cuadro 4 se muestran algunos factores que afectan la producción de enterotoxinas estafilocócicas (58).

1.2.2.1 Temperatura. Se ha observado que la disminución de la temperatura de incubación tiene el efecto de prolongar la aparición de toxinas, habiéndose señalado 72-96 horas como necesarias para descubrir la enterotoxina A en leche.

A pesar de que las enterotoxinas estafilocócicas son de las pocas toxinas bacterianas de naturaleza proteínica que son termorresistentes, ha quedado comprobado que cuando se aplica calor sufren varios cambios en sus propiedades, siendo la más susceptible la A y la B la más resistente.

Cuando la enterotoxina A es calentada a 60°C por 20 min, existe un decremento del 50% en la reacción de ésta con su anticuerpo específico; después de someterla a una temperatura de 80°C por 3 min o a 100°C por 1 min ya no se presenta reacción (16). Lilly y colaboradores (79), han observado que los cambios en temperatura afectan en mayor grado la síntesis de enterotoxina, en comparación con el crecimiento del microorganismo. La reducción en la producción de enterotoxina a bajas temperaturas se debe a un efecto directo en la biosíntesis de toxina, o bien, como resultado de algún cambio en el estado fisiológico o nutricional del microorganismo (104)(129).

En general, la susceptibilidad del microorganismo y toxinas al calor se ve afectada por la composición total del medio en que están suspendidos. Por ejemplo, se ha demostrado que las células estafilocócicas son bastante sensibles al calor en solución de Ringers a pH 7.2 y mucho más resistentes en leche a pH 6.9 (67).

1.2.2.2 Composición del medio. Existen ciertos compuestos que pueden interferir en el desarrollo de *S. aureus* y por tanto en la producción de enterotoxina. Tal es el caso de minerales como sodio y cloro, que el microorganismo requiere para su crecimiento (104).

**Cuadro 3. CARACTERISTICAS FISICAS Y QUIMICAS DE LAS
ENTEROTOXINAS ESTAFILOCOCCICAS.**

PROPIEDAD	A	B	C ₁	C ₂	D	E
Peso molecular	27,800	28,366	34,100	34,000	27,000	29,600
Dosis emética (ED ₅₀ µg/mono)	5	5	5	5-10	20	10-20
Contenido de Nitrógeno (%)	16.2	16.1	16.2	16.0	--	--
Punto Isoeléctrico	6.9	8.6	8.6	7.0	7.4	7.0
Absorción Máxima (nm)	277	277	277	277	378	377
Viscosidad Reducida (ml/g)	4.07	3.81	3.40	3.70	--	--

Fuente: Bryan, F.L. (1979)

**Cuadro 4. FACTORES QUE INTERVIENEN EN LA PRODUCCION DE
ENTEROTOXINAS ESTAFILOCOCCICAS.**

FACTOR	MINIMOS	VALORES OPTIMOS	MAXIMOS
<i>Aa</i>	0.9	0.99	1.0
<i>pH</i>	5.15	7.0	9.0
<i>Temperatura (°C)</i>	10.0	30-38	45.0
<i>NaCl (%)</i>	0	0	10
<i>Atmósfera (% Oz)</i>	-	10	-

- no ha sido reportado

Fuente: Minor y Marth (1971)

Lilly y colaboradores (79) han observado que la producción de enterotoxina se realiza con 0% de NaCl, aunque puede llegar a sintetizarse en un rango de 0 a 10%. Por otro lado, Morita y colaboradores (90) demostraron que el adicionar magnesio al medio de cultivo, estimula la producción de enterotoxina por *S. aureus*.

El añadir una fuente de carbono de fácil metabolización, como glucosa o piruvato, a un medio de caseína hidrolizada reprime la síntesis de enterotoxina E. Similarmente, la adición de glucosa o glicerol a un medio químicamente definido, origina un marcado decremento en la síntesis de enterotoxina A (SEA), B (SEB) y C (SEC) (129).

Asimismo, se ha observado que la existencia de hidrolizados de proteína estimulan la producción de enterotoxina A (83).

Las toxinas estafilocócicas como muchas otras toxinas, tienden a perder su toxicidad cuando las cepas de donde proceden son sometidas a resiembras sucesivas (17).

1.2.2.3 pH. La producción de enterotoxinas se limita a un rango de pH comprendido entre 5.15 a 9.0, observándose que a un valor de 7.0, la síntesis se incrementa en forma directa a la concentración de cloruro de sodio (49)(124).

El pH óptimo para la síntesis de enterotoxina A (SEA) aún cuando no hubiera duplicación de *S. aureus*, tanto en presencia como en ausencia de una fuente de nitrógeno, es 6.6 a 7.0 (129).

Ha quedado demostrado que los alimentos en cuyo proceso esté implicada una fermentación o acidificación, en caso de haber sido

elaborados en forma apropiada, no deben presentar suficiente crecimiento de S. aureus como para que la biosíntesis de enterotoxina se lleve a cabo, aún cuando exista un abuso en la temperatura de almacenamiento (88)(95).

1.2.2.4 Actividad de agua. El valor de actividad de agua en que S. aureus puede producir enterotoxina varía con el medio de suspensión en el que se encuentre, sin embargo se ha recomendado que esté dentro del rango de 0.9 a 0.97 (144).

Ha sido demostrado que la actividad de agua existente en el medio de suspensión puede causar una mayor inhibición en la producción de este metabolito, comparada con la supresión que ocasiona sobre el crecimiento del microorganismo (117).

Se ha comprobado que la producción de enterotoxina A puede ocurrir bajo condiciones de Aa que no favorecen la formación de la toxina B (67).

1.2.2.5 Atmósfera. La síntesis de toxina se lleva a cabo tanto en condiciones anaeróbicas como aeróbicas, no existiendo una dependencia directa en esta condición, sin embargo Smith et al. (129) observaron que la presencia de un 10% de oxígeno disuelto en el medio incrementa la producción del metabolito. S. aureus está clasificado metabólicamente como un anaerobio facultativo por lo que crece más rápidamente bajo condiciones aerobias, por tanto la aereación es un efecto positivo para su crecimiento y subsecuente formación de enterotoxina.

El crecimiento de *S. aureus* y la producción de enterotoxina bajo condiciones anaeróbicas depende de otros factores como pH, temperatura y actividad de agua. En general, la producción de enterotoxina en un determinado alimento está relacionada con la composición de éste, su naturaleza física, pH, contenido de humedad del alimento y las condiciones de almacenamiento bajo las cuales se encuentra, así como la temperatura, tiempo y atmósfera (19).

1.2.3 Métodos de detección de enterotoxina. La detección de enterotoxina en los alimentos se puede lograr por el empleo de métodos biológicos, usando animales o procedimientos in vitro y métodos serológicos para identificar las cinco diferentes enterotoxinas estafilocócicas (67). Sin embargo, la determinación de toxinas en productos alimentarios requiere métodos que sean mucho más sensibles que aquellos utilizados para la detección de la enterotoxigenicidad de cepas (20).

Los métodos más comúnmente empleados in vitro son reacciones antígeno-anticuerpo con algunas modificaciones, en éstos se aprovecha la propiedad que tienen las enterotoxinas para producir anticuerpos en animales de laboratorio (18).

Esencialmente todos los anticuerpos en uso han sido preparados en conejos, usando las enterotoxinas individuales purificadas (21).

La precipitación del complejo enterotoxina-anticuerpo en el método serológico más frecuentemente empleado, así como la

técnica de doble difusión en gel de Crowle, por ser los más específicos se basan en una comparación directa entre una enterotoxina de referencia y una muestra desconocida (35).

Los principales sistemas utilizados para la detección cualitativa, cuantitativa y semicuantitativa de enterotoxinas se mencionan a continuación:

Método de Oudin o prueba en tubo de difusión en gel. Esta prueba tiene una sensibilidad de 5-200 $\mu\text{g/ml}$ de enterotoxina. Consiste en utilizar un tubo con antitoxina incorporado previamente en agar. La muestra presuntiva es agregada y se observa la precipitación en la zona de equivalencia. El agar desciende en relación a la concentración de toxina y de anticuerpo (15).

Prueba de doble difusión en gel. Se emplea una placa con perforaciones en donde se coloca la solución con el antígeno y anticuerpo en pozos adyacentes. Al difundirse, se forma una banda de precipitación en el punto en que ambos compuestos interaccionan. Su sensibilidad es de 5 a 10 μg de enterotoxina/ml. Se usa principalmente para detectar la presencia de toxina en extractos obtenidos de alimentos (15).

Prueba de precipitación en tubo. La prueba es cuantitativa. La toxina es puesta en contacto con su antitoxina correspondiente, en forma semejante al método de Oudin. Para realizar la cuantificación, el nitrógeno total en la zona de precipitación se analiza por la técnica de micro-Kjeldahl (151).

Prueba de hemoaglutinación. Una solución en la cual los anticuerpos se encuentran unidos a eritrocitos, se pone en

contacto con la enterotoxina. Cuando existe suficiente concentración de antígeno, ocurre una reacción de aglutinación. Su sensibilidad es de $0.0015 \mu\text{g}$ de enterotoxina/ml (151).

Prueba de radioinmunoensayo (RIA). Se utiliza una placa sensible para antígenos sobre la cual la enterotoxina se adsorbe. Se agrega la toxina marcada con iodo radioactivo, se deja actuar por un tiempo determinado, la enterotoxina excedente se remueve y la radioactividad emitida se mide en un contador gama, así la cantidad de enterotoxina presente en la muestra a analizar se relaciona indirectamente con la cantidad de enterotoxina radioactiva presente. A menor radioactividad, mayor concentración de toxina en la muestra. Su sensibilidad es de 0.0015 a $0.010 \mu\text{g}$ de enterotoxina/ml (20).

Prueba de difusión radial simple. La prueba presenta una sensibilidad de $1.0 \mu\text{g}$ de enterotoxina/ml. El antisuero se agrega al agar, se mezcla y se vierte en placas que se dejan enfriar. Para colocar diferentes concentraciones de enterotoxina, se hacen perforaciones en las que se adicionan. La placa se deja en incubación por un periodo de 24 horas en un ambiente húmedo. Cuando la toxina se difunde, un anillo de precipitación se forma alrededor de los pozos, este halo se revela con una solución de ácido acético-etanol, se mide y se elabora una curva estándar (22).

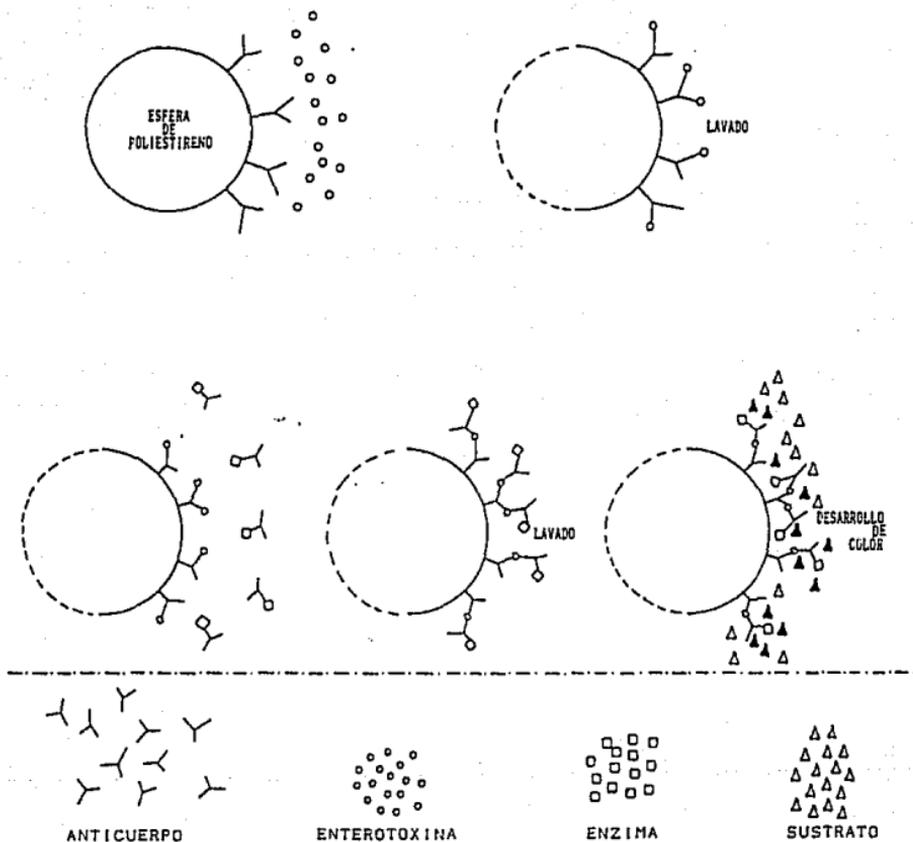


Figura 1. ENZYME LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY (ELISA).

RPLA (*Reversed Passive Latex Agglutination*). Este método consiste en partículas de látex cubiertas con anticuerpos específicos, seguido de la adición del extracto de alimento. Si cualquier enterotoxina está presente en dicho extracto, las partículas de látex se aglutinarán. Este procedimiento se lleva a cabo en placas de microtitulación de poliestireno con fondo en "V". La reacción de aglutinación se detecta visualmente (22).

Su sensibilidad es similar a la obtenida en la utilización de las pruebas de ELISA y RIA (21).

En ocasiones pueden llegar a presentarse reacciones de aglutinación no específicas, así que para la utilización de este método debe demostrarse que no existan este tipo de reacciones mediante controles positivos (22). En un estudio realizado por Park y Szabo (100), se evaluó el método y determinaron que no existieron reacciones no específicas en los extractos obtenidos de varios alimentos; se utilizó el SET-RPLA comercial y determinó una sensibilidad de 0.25 ng/ml de alimento para las enterotoxinas A, B, C y D.

Rose, Bankes y Stringer (118), determinaron que las reacciones no específicas, es decir obtener resultados falso-positivos en los controles, se pueden eliminar mediante la adición de hexametáfosfato sódico 10mM.

Para emplear el método de RPLA en la detección de enterotoxina en alimentos, es necesario llevar a cabo la técnica de extracción simple. En general es un método rápido ya que se obtienen resultados en menos de 24 horas; es semicuantitativo y

no requiere de ningún equipo de precisión para la lectura de resultados (100).

Actualmente existen "kits" comerciales para la detección de enterotoxina por el método de RPLA que tienen sensibilidad adecuada para la determinación de toxina en soluciones de alimentos. Sin embargo, el método de extracción sugerido en estos equipos (9 ml de solución buffer/g de alimento), no se recomienda para la cuantificación de pequeñas cantidades del metabolito (21).

ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*). Es una técnica desarrollada para la detección de enterotoxinas en alimentos, que incluye varios procedimientos de las pruebas anteriores (46). Además, es uno de los métodos más rápidos y específicos. El principio para esta prueba es el mismo que el de RIA. Incluye el uso de una enzima unida, ya sea a la enterotoxina o al anticuerpo específico y depende del desarrollo de un color por la reacción de la enzima con el sustrato correspondiente (37). Así, el desarrollo de dicho color será directamente proporcional a la cantidad de enterotoxina en la muestra.

El método es como sigue: (1) las superficies de los pozos de la placa de microtitulación o de las esferas de poliestireno se cubren con el anticuerpo específico; (2) el extracto del alimento es colocado sobre los pozos cubiertos de la placa; si se usa el método de esfera, estas son colocadas en el extracto del alimento dentro de un tubo de ensaye; (3) después de un tiempo de reacción adecuado, el extracto se retira de los pozos y el conjugado

toxina-anticuerpo específico es puesto en los pozos; en el método de esferas, estas son tratadas con el conjugado después de ser retiradas del extracto y lavadas; (4) posterior a un tiempo de reacción, el conjugado se quita de los pozos y el sustrato se adiciona; en el otro método, las esferas se tratan con el sustrato después de que estas son removidas del conjugado y lavadas; (5) después de un tiempo de reacción determinado, los colores desarrollados en los pozos de la placa de microtitulación son leídos en un lector apropiado; el color desarrollado en el método de esfera es leído en un colorímetro; y (6) la cantidad de enterotoxina en el extracto es calculada a partir de una curva estándar elaborada con cantidades conocidas de enterotoxina (figura 1) (23)(43)(75).

1.3 Intoxicaciones Estafilocócicas.

La toxiinfección estafilocócica alimentaria es producida por determinadas cepas de *S. aureus*, que generalmente además de enterotoxina producen coagulasa. Sin embargo, cabe mencionar que no todas las cepas coagulasa positiva son capaces de originar intoxicaciones estafilocócicas (67).

Se ha comprobado que para que los alimentos causen intoxicación es necesario que exista en ellos una gran cantidad de *Staphylococcus aureus*, (50×10^6 - 200×10^6 por gramo de alimento), siendo necesaria una producción aproximada de 1 a 4 microgramos de toxina A por gramo de alimento, o 0.015 a 0.357 μg por peso corporal (19)(92).

Los síntomas más usuales de una intoxicación estafilocócica desarrollados durante las primeras 1 a 6 horas son: náusea, vómito, dolor estomacal y diarrea. En casos más severos puede presentarse dolor de cabeza, dolor muscular y fatiga, anorexia, sudor y deshidratación (22).

En la mayoría de los casos la recuperación del individuo es rápida, de 1 a 3 días, por lo que en raras ocasiones se suministra medicamento. La mortalidad es extremadamente baja y por lo general este tipo de toxiinfección se presenta en personas físicamente débiles o en lactantes (37).

El modo de acción de las enterotoxinas no se encuentra aún totalmente comprendido, pero los principales síntomas suponen una acción sobre las vísceras abdominales. Estos metabolitos muestran una gran afinidad por las paredes del estómago e intestinos produciendo enterocolitis (80).

A pesar de que la susceptibilidad a las intoxicaciones estafilocócicas varía de un individuo a otro, ésta también depende de diversos factores como: la cantidad de enterotoxina consumida, la distribución de la misma dentro del alimento y exposiciones anteriores a este metabolito (15)(17).

1.3.1 Incidencia en México. En México, el Laboratorio Nacional de Salud Pública realizó un estudio de brotes de intoxicación alimentaria de origen microbiano y parasitario en el período comprendido entre 1980-1989, con la finalidad de conocer los agentes etiológicos más frecuentemente involucrados.

En dicho estudio se confirmó un 73% de brotes de intoxicación, los cuales se presentaron con mayor frecuencia en: reuniones (24.1%), escuelas y guarderías (10.3%), restaurantes (8.6%), hospitales (8.6%). Se encontró que el microorganismo que estuvo implicado de manera importante fue *S. aureus*, siendo responsable del 48.2% de los brotes. Como principales alimentos involucrados en las intoxicaciones se encontraron: quesos (29.3%), pasteles (15.5%), carne (15.1%), leche (13.8%) y pescados y mariscos (7.0%) (37).

1.3.2 Alimentos involucrados. Generalmente las intoxicaciones estafilocócicas, se producen por malas prácticas higiénicas en el manejo del alimento. Estas últimas, representan un excelente medio de cultivo para el crecimiento de *S. aureus*: uno de los principales alimentos involucrados en contaminaciones de este tipo es, la leche y sus derivados. Algunas toxiinfecciones por consumo de leche son causadas principalmente por microorganismos que proceden de la vaca, como es el caso de aquellas que sufren mastitis (115).

Existen otros alimentos además de la leche susceptibles a contaminación por *S. aureus*: la carne de cerdo y res, productos de panificación, frutas y verduras, ensaladas y productos cárnicos procesados, representan los principales.

Los rellenos utilizados en las pastelerías constituyen un medio de cultivo propicio en donde el microorganismo puede desarrollarse perfectamente a temperatura ambiente (12).

1.3.3 *Medidas de control.* La higiene personal de los manipuladores de alimentos a lo largo de todas las operaciones industriales es extremadamente importante para la prevención de las intoxicaciones estafilocócicas, ya que el hombre constituye la principal fuente de contaminación. A pesar de que el potencial para controlar y aún eliminar el peligro de este tipo de contaminación ha ido mejorando, todavía se considera a *S. aureus* como la causa más común de intoxicaciones alimentarias (92).

La aplicación de procesos industriales apropiados tales como un enfriamiento adecuado de la leche cruda, entre otros, debe prevenir la producción de enterotoxina termorresistente y cualquier microorganismo viable debe ser destruido mediante la pasteurización del producto, por ejemplo (136).

1.4 Leche.

1.4.1 *Definición.* La leche es un líquido blanco, opaco, más viscoso que el agua, de sabor ligeramente azucarado y olor acentuado. Es el producto íntegro del ordeño completo e ininterrumpido de una hembra lechera sana, bien alimentada y no fatigada (147).

1.4.2 *Principales características fisicoquímicas.* Desde el punto de vista fisicoquímico, la leche es un producto muy complejo; el conocimiento de su estructura permite comprender las transformaciones que se producen en ella y en los productos

lácteos durante los tratamientos industriales diversos (150).

Las principales características fisicoquímicas de la leche, que han de tomarse en cuenta en la determinación de su pureza y aptitud para la elaboración de derivados lácteos se indican a continuación:

- Densidad.- Depende del contenido de extracto seco magro (ESM) en la leche, éste generalmente se aproxima a 90 g/l.

- Punto de congelación.- Generalmente disminuye con la presencia de componentes en disolución, principalmente lactosa y sales. Debido a que es la característica física más constante de la leche es usado por lo general como un método de detección en la adulteración de la misma por adición de agua.

- Calor específico.- Puede ser utilizado para calcular el costo de calentamiento o enfriamiento de la leche (112).

- pH.- Indica su acidez activa. El calostro es más ácido que la leche normal, mientras que la leche del final de la lactación y de las vacas enfermas tienen generalmente un pH más elevado, próximos al de la sangre (6).

- Acidez.- Es la determinación analítica más frecuente en tecnología lechera. Es un parámetro constante en la leche y su aumento indica anormalidad. Todos los componentes capaces de combinarse con iones básicos contribuyen a la acidez de la leche (6)(112) (cuadro 5).

Cuadro 5. CARACTERISTICAS FISICOQUIMICAS DE LA LECHE.

Densidad a 15°C -----	1,030 a 1,034
Calor específico (cal) -----	0,93
Punto de congelación (°C) -----	- 0,55
pH -----	6.5 a 6.6
Acidez expresada en grados Dornic (decigramos de ácido láctico/l) -----	16 a 18
Indice de refrigeración a 20°C -----	1,35

Fuente: Veisseyre, R. (1988).

1.4.3 *Composición.* De manera esquemática, la leche puede considerarse como un sistema coloidal constituido por una solución acuosa de lactosa (5%), sales (0.7%) y muchos otros elementos en estado de disolución, en donde se encuentran las proteínas (3.2%) en estado de suspensión y la materia grasa en estado de emulsión (6). Algunos de los componentes del alimento se encuentran en cantidades muy pequeñas y por ello su determinación es más difícil que la de aquellos que están presentes en cantidades mayores (cuadro 6).

La composición de la leche varía ampliamente dependiendo directamente de características del animal como especie, raza, estado de lactación, edad, enfermedades y nutrición (cuadro 7) (115).

1.4.3.1 *Grasa.* La materia grasa está presente en la leche en forma de glóbulos muy pequeños dispersos en el plasma, rodeados cada uno de ellos por una membrana consistente en una capa delgada de proteínas y fosfolípidos principalmente. En la leche de vaca, la fracción lipídica mayoritaria está constituida por triglicéridos que representan 97-98% del total de lípidos y el resto está dado por pequeñas cantidades de mono y diglicéridos, colesterol y colesterol esterificado, ácidos grasos libres y fosfolípidos (6).

1.4.3.2 *Sustancias nitrogenadas.* Desde el punto de vista nutricional, las proteínas constituyen la parte más importante de

la leche por ser vitales para la vida; desde el aspecto tecnológico, la proteína juega un papel muy importante en la elaboración de derivados lácteos como el queso y yogurt (112).

En la leche existen dos grupos diferentes de proteínas: el complejo de caseínas (presentes en la leche como suspensión coloidal en un 80%) y las proteínas del suero (presentes como una solución) (145). Estas constituyen alrededor del 95% del nitrógeno presente, el restante es nitrógeno no proteínico.

1.4.3.3 Lactosa. Los glúcidos de la leche están compuestos principalmente por lactosa (5%) y algunos otros azúcares en pequeñas cantidades como glucosa (0.1%) y galactosa. La lactosa es el componente cuantitativamente más importante de los sólidos no grasos, encontrándose disuelta en el 87% del agua que contiene la leche (50 g por litro de leche). Además, la lactosa es el compuesto que principalmente contribuye a que este alimento sea isotónico con el plasma sanguíneo y a sus propiedades coligativas (presión osmótica, descenso del punto de congelación, elevación del punto de ebullición). Su descomposición en la leche es el resultado de acción microbiana (6)(62).

1.4.3.4 Cenizas. Algunos de los minerales encontrados en la leche son derivados de las sales disueltas en ella, pero otros provienen de componentes insolubles, principalmente del complejo de caseína. Los cationes principales son calcio, magnesio, sodio y potasio y los aniones mayoritarios fosfato, cloruro y citrato.

Cuadro 6. COMPOSICION GENERAL DE LA LECHE.

Componentes mayoritarios

I Agua	86,9%
II Materias grasas	3,9%
III Proteínas y sustancias nitrogenadas no proteicas	3,2%
IV Carbohidratos	5,1%
V Sales	0,9%

Componentes minoritarios

VI Enzimas	
VII Vitaminas	
VIII Pigmentos (carotenos, xantofilas, rivo flavina)	
IX Células diversas (epiteliales, leuco- citos, bacterias, levaduras, mohos)	
X Otros elementos (dióxido de carbono, oxígeno, nitrógeno y otros gases)	
XI Sustancias extrañas	

Fuente: Amiot, J. (1991).

**Cuadro 7. ESQUEMA COMPARATIVO DE LA COMPOSICION DE LA LECHE
(g/100g) DE LAS DIFERENTES ESPECIES ANIMALES.**

<i>Especie</i>	<i>Grasa</i>	<i>Caseína</i>	<i>Proteínas del suero</i>	<i>Lactosa</i>	<i>Cenizas</i>
<i>Humana</i>	4.6	0.8	0.7	6.8	0.2
<i>Vaca</i>					
<i>Bos taurus</i>	4.2	2.6	0.6	4.6	0.7
<i>Bos indicus</i>	4.7	2.6	0.6	4.7	0.7
<i>Búfalo</i>	7.8	3.2	0.6	4.9	0.8
<i>Cabra</i>	4.5	2.6	0.6	4.4	0.8
<i>Borrego</i>	7.6	3.9	0.7	4.8	0.9
<i>Caballo</i>	1.6	1.3	1.2	6.2	0.4
<i>Burro</i>	1.5	1.0	1.0	7.4	0.5
<i>Camello</i>	4.0	2.7	0.9	5.4	0.7

Fuente: Van Der Berg, J.C.T. (1988)

1.4.4 *Funcionalidad como medio de cultivo.* Debido a su composición, la leche es un excelente medio de cultivo para ciertos organismos. Su elevado contenido de agua, su pH casi neutro y su riqueza en alimentos energéticos en forma de azúcar (lactosa), grasa y citrato, así como compuestos nitrogenados, la hacen un medio adecuado y propicio para el crecimiento y desarrollo de varios microorganismos (45). A pesar de las mencionadas características, el crecimiento de los organismos no es siempre constante debido a las variaciones de composición que se producen en ella por factores ya sea estacionales o por los diversos tratamientos a los que se somete.

La leche no puede considerarse un medio de cultivo universal, porque algunas de sus características la convierten en un medio selectivo. El desarrollo de organismos de interés lactológico se ve desplazado en ocasiones dado que éstos no encuentran condiciones óptimas en la leche. Algunas cepas de estreptococos lácticos requieren de la degradación de la proteína de la leche para satisfacer sus necesidades de nitrógeno, los compuestos al sufrir dicho proceso, dan origen a otros productos que sirven como nutrimentos o inhibidores a otros organismos. La leche es en general una buena fuente de minerales sin embargo, algunos como el cobre, zinc, magnesio y hierro sólo se encuentran en cantidades pequeñas; su adición al alimento favorece el desarrollo de muchas bacterias, entre ellas las de los fermentos lácticos, inhibiendo algunas especies de *Pseudomonas* al unirse a la lactoferrina. Existen, por ejemplo otras bacterias lácticas

que encuentran en la leche la mayor parte de las vitaminas B que necesitan para su desarrollo (6)(105)(147).

La leche posee propiedades inhibitorias naturales, como resultado de la presencia de compuestos bacteriostáticos que permanecen aún después de dos o tres horas posteriores al ordeño. Estos son más activos en leche a temperatura ambiente que en leche refrigerada. Estas sustancias son termolábiles siendo las principales las lacteninas (aglutininas y lactoperoxidasas) (145).

1.4.4.1 Flora microbiana. La flora propia de la leche consiste principalmente en micrococcos no patógenos de lenta reproducción, sin embargo antes de ser pasteurizada puede contener organismos que provoquen su descomposición, la mayoría de los cuales son de naturaleza psicrófila. En el cuadro 8 se muestran los principales grupos microbianos en leche fresca (115)(120).

1.4.5 Alteraciones, defectos y contaminaciones. La leche es un alimento muy perecedero y de fácil contaminación. La inadecuada pasteurización, la deficiente higiene de la planta industrial o el mantenimiento de altas temperaturas después de la pasteurización, pueden facilitar la presencia de elevados recuentos de microorganismos en leche pasteurizada. Además, puede contaminarse principalmente con microorganismos procedentes de: piel del animal, manipulación del personal, el aire y utensilios empleados en su manejo.

Se ha observado que el contenido de bacterias de la leche

cruda puede ser mayor cuando los animales productores se encuentran afectados de mastitis; tal es el caso de la presencia de Staphylococcus aureus en leche cruda. Esta puede estar contaminada también con diversos microorganismos patógenos para el hombre como micobacterias tuberculosas de tipo bovino, salmonellas, brucellas y estreptococos procedentes de animales enfermos (106). Debe tenerse en cuenta que el alimento es susceptible a contaminaciones posteriores a su obtención, durante su procesado e industrialización. Debido a la diversidad de fuentes de contaminación, una higiene y buenas prácticas de manejo son esenciales para evitar pérdidas considerables en la industria lechera (112)(145).

En la leche recién ordeñada existen algunas sustancias inhibitorias como las aglutininas y lactoperoxidasas, sin embargo en ocasiones no son suficientes para detener el crecimiento y desarrollo de los microorganismos (45)(115).

Contaminaciones de este tipo no son las únicas alteraciones y defectos que puede presentar la leche, existen otras como:

1) Acidificación y cuajado por acción de bacterias lácticas, que se ve favorecida cuando la leche cruda permanece largo tiempo a temperatura ambiente antes de ser tratada térmicamente.

2) Olor desagradable provocado por la producción de gas formado por algunas bacterias principalmente del género Clostridium y Bacillus. Puede ser causada también por oxidación de ácidos grasos no saturados e hidrólisis de glicerina.

3) Sabor amargo debido a la hidrólisis de las proteínas lácticas

por acción microbiana, esta proteólisis se ve favorecida por el almacenamiento a temperaturas bajas, destrucción de gérmenes lácticos por calor y neutralización de los ácidos por los metabolitos de otros microorganismos (92).

1.4.6 Situación actual en la industria lechera en México. En México el problema de la leche como alimento básico está centrado en la insuficiencia de su producción para abastecer las necesidades, hecho que ha colocado al país como el primer importador de leche en el mundo.

Cabe señalar que a pesar de que la producción de la leche ha aumentado e incluso existen ciertos estados de la República Mexicana que son autosuficientes rebasando en ocasiones los requerimientos de autoconsumo, el crecimiento demográfico ha sido bastante alto (cuadro 9), por lo que balancear la disponibilidad de leche para cubrir dicho incremento no ha sido posible (25)(64).

Durante 1986, existieron excedentes de cerca de 1384 millones de litros de los cuales algunos fueron canalizados a regiones deficitarias, que en ese mismo año presentaron un déficit de 2154 millones de litros.

La producción lechera durante 1986 fue de 7400 millones de litros aproximadamente, necesitándose 9500 millones de litros para satisfacer las necesidades de la población. En los cuadros 10 y 11 se observa la producción nacional de leche de 1970 a 1990 y la demanda desde 1991 a 1995 (1)(64).

Cuadro 8. PRINCIPALES GRUPOS MICROBIANOS EN LECHE CRUDA.

Grupo	Incidencia (% del total de microorganismo)
<i>Micrococcos</i>	30 - 99
<i>Estreptococos</i>	0 - 50
<i>Bacilos Gram (+) no esporulados</i>	< 10
<i>Bacilos Gram (-) (incluidos coliformes)</i>	< 10
<i>Esporas de Bacillus</i>	< 10
<i>Misceláneos (incluidos estreptomicetos)</i>	< 10

Fuente: Robinson, R. K. (1987)

Cuadro 9. IMPORTACIONES DE LECHE EN POLVO.

ANO	VOLUMEN (tonelada)	PRECIO POR TONELADA (dólares)
1981	133,200	1,225
1982	97,400	1,180
1983	97,500	850
1984	104,000	815
1985	134,000	744
1986	130,000	800
1987	156,500	1,770
1988	211,000	2,190
1989	252,000	1,990
1990	287,000	2,000

Fuente: Inst. Nal. de la Leche (1991).

Cuadro 10. PRODUCCION NACIONAL DE LECHE DE VACA.

ANO	PRODUCCION DE LECHE (millones de litros)	INCREMENTO EN RELACION AL AÑO ANTERIOR (%)
1970	4483.0	
1971	4694.1	4.70
1972	4914.2	4.68
1973	5225.3	6.33
1974	5500.0	5.25
1975	5808.8	5.61
1976	5907.3	1.69
1977	6180.9	4.63
1978	6509.4	5.31
1979	6641.9	2.03
1980	6741.9	1.49
1981	6856.4	1.70
1982	6923.6	0.98
1983	6768.4	- 2.24
1984	6860.3	1.35
1985	7172.9	4.55
1986	6373.4	- 9.14
1987	6200.9	- 2.70
1988	7696.4	10.9
1989	8160.2	7.5
1990	8480.0	3.12

Fuente: Inst. Nal. de la Leche (1991)

Cuadro 11. NECESIDADES ESTIMADAS DE LECHE FLUIDA
(millones de litros).

ANO	MINIMA	MAXIMA
1986	8662.3	9569.3
1987	9088.5	9973.1
1988	9551.0	10395.0
1989	10138.4	10209.2
1990	10316.3	10420.0
1991	10478.7	10638.8
1992	10646.3	10862.3
1993	10816.7	10990.36
1994	10989.7	11323.3
1995	11165.5	11561.0

Fuente: Aguirre, E. M. (1989)

1.5 Yogurt.

La palabra yogurt proviene del vocablo turco "Jugurt". El producto original se elabora con leche de vaca concentrada por calentamiento largo a fuego directo hasta 2/3 partes de su volumen, se enfría y se añade una porción del yogurt del día anterior como inóculo, dejando incubar a temperatura ambiente hasta la obtención de un coágulo firme (125).

1.5.1 Historia de su elaboración. El proceso de elaboración del yogurt es un arte muy antiguo que data de hace miles de años, probablemente anterior a la domesticación de vacas, cabras y ovejas; sin embargo, no fue sino hasta el siglo XIX que se comenzó a estudiar y comprender las diferentes fases de su producción (145).

Ha sido considerado como un alimento sumamente benéfico para la salud y nutrición humana desde tiempos remotos. El mayor valor nutritivo que presenta el yogurt sobre las otras leches fermentadas se debe principalmente al elevado contenido de sólidos lácteos que contiene. Es probable que sea originario del Medio Oriente, aunque en la actualidad es producido en todo el mundo, tanto de forma casera como industrial (126).

En los países del suroeste de Asia y ciudades de Europa del Sur, es un alimento o bebida tradicional que puede ser preparada con leche de búfala, burra, vaca, oveja o cabra (71). Es conocido con diversos nombres según el país (140).

1.5.2 *Definición.* El yogurt se define como una leche fermentada, acidificada, con consistencia de gel como consecuencia de la acción que sobre las proteínas de la leche ejercen las bacterias lácticas, provocando su precipitación y posterior coagulación (82)(150).

1.5.3 *Fundamentos de su elaboración.* En la manufactura del yogurt se añade a la leche pasteurizada un fermento que contiene los microorganismos necesarios para transformarla mediante la fermentación de la lactosa, y se incuba hasta alcanzar el grado de acidez deseado. Las proteínas de la leche se coagulan y precipitan debido a la acidificación que provocan las bacterias lácticas, siendo el producto fundamental el ácido láctico.

La industria reconoce por lo general dos tipos principales de yogurt: estático y batido, clasificación que se basa en el método de elaboración y en la estructura física del coágulo (115).

Pueden presentarse problemas en el proceso de elaboración del producto por lo que es preciso llevar un control de varios parámetros:

Microflora: es necesario eliminar la posibilidad de contaminación por microorganismos extraños a lo largo de la fermentación utilizando leche de idónea calidad bacteriológica y convenientemente pasteurizada.

El cultivo iniciador debe tener equilibrados sus componentes, ya que en el fermento tras una larga serie de

resiembras llega a predominar una especie desapareciendo progresivamente la otra.

Temperatura: debe ser constante durante la fermentación. El almacenamiento debe ser en condiciones de refrigeración a temperatura bastante baja (4-5°C).

Acidez: una acidez elevada provoca una cuajada de mejor consistencia y más estable que la formada a bajos valores de acidez.

1.5.3.1 La leche como materia prima. En general se puede partir de leche entera, descremada o parcialmente descremada; debe de estar libre de cualquier clase de antibióticos o cualquier sustancia inhibitoria de bacterias lácticas con objeto de que los cultivos empleados puedan desarrollarse sin problema. Además debe tenerse cuidado de que la materia prima se encuentre libre de material contaminante como células epiteliales o leucocitos procedentes de la glándula mamaria del animal que puedan afectar la producción del yogurt (45).

La calidad del yogurt depende principalmente de la leche a utilizar, así como de los aditivos, cultivos iniciadores y subsecuente manejo del producto. Debido a que para la elaboración de yogurt se ha utilizado leche de distintas especies animales, pueden presentarse variaciones en la calidad de éste. Para evitar los efectos de dichas variaciones intrínsecas a la composición de la leche en uso, es preciso recurrir a la estandarización, normalización y/o enriquecimiento de la misma.

Para controlar el proceso de fermentación la leche debe ser tratada térmicamente con cuidado antes de ser inoculada, con objeto de:

- destruir el mayor número posible de microorganismos.
- convertir la leche en un nutrimento más adecuado para la bacteria responsable del proceso de fermentación deseado.
- conferir al producto final ciertas propiedades específicas, ej. la viscosidad deseada (145). En ocasiones la leche se mantiene en ebullición por períodos de tiempo prolongados con la finalidad de evaporar agua y provocar la desestabilización de las proteínas en cierto grado, contribuyendo así a incrementar la viscosidad.

1.5.3.2 Estandarización de *grasa* y *extracto seco magro*. La preparación de la mezcla básica implica la fortificación y normalización de la leche, esta operación involucra el aumento en la concentración del extracto seco de la mezcla para conseguir las propiedades reológicas deseadas en el producto elaborado (115). El extracto seco se ajusta generalmente entre 12 y 15% de acuerdo a la textura deseada, a menos que existan normas legales que exijan concentraciones determinadas.

En el cuadro 12 se resumen los distintos métodos empleados de fortificación/normalización de la mezcla básica, haciéndose mención de las posibilidades que existen para aumentar o disminuir los distintos componentes de la leche.

El método tradicional de concentración de la leche ha sido el calentamiento de la misma. Este consiste en mantener la leche

en ebullición hasta reducir su volumen a $2/3$ del valor inicial, provocando además otras muchas modificaciones fisicoquímicas (140). Aunque el método más corriente es la adición de leche en polvo a la leche líquida, el empleo de la ultrafiltración para concentrar el extracto seco, actualmente constituye una posibilidad.

En ocasiones pueden adicionarse sustancias como las mencionadas en el cuadro u otras como estabilizantes y/o emulsionantes permitidas por las legislaciones alimentarias (gomas naturales, modificadas o sintéticas); azúcares y/o agentes edulcorantes; y conservadores, que además contribuyen con otras características en el producto. Cada uno de los ingredientes añadidos a la leche proporciona una propiedad funcional diferente al yogurt, algunas favorables y otras en cambio indeseables. Por ejemplo, la adición de algunos hidrocoloides como carboximetil celulosa sódica, goma guar o goma de algarrobo, a concentraciones bajas del orden de 0.05%, puede implicar una desestabilización de las micelas de caseína y aunque estas acaban finalmente coagulando, la matriz que forman tiene una capacidad de retención de agua bastante limitada por lo que se presenta una sinéresis evidente (109).

1.5.3.3 Homogenización. Literalmente la homogenización consiste en la formación de una emulsión homogénea de dos líquidos inmiscibles. En el caso del yogurt, la emulsión es una típica de la categoría aceite en agua, por lo que la grasa

presenta una clara tendencia a separarse formando una capa superficial (especialmente durante el período de incubación). Con objeto de evitar este fenómeno, la mezcla se somete a un proceso de mezclado a alta velocidad, esto es la leche es forzada a pasar a través de un pequeño orificio a elevada presión (115). Generalmente la homogenización se lleva a cabo a 55°C y a una presión de 200 atm, aunque existen ocasiones en que se utilizan temperaturas más elevadas y presiones menores (65°C, 150 a 200 atm) (145).

La importancia del proceso de homogenización se puede observar en el cuadro 13, en donde se muestran los principales cambios fisicoquímicos que sufre la leche destinada a la fabricación de yogurt (139).

Cuadro 12. ALGUNOS METODOS DE FORTIFICACION/NORMALIZACION DE LA LECHE.

MATERIAS PRIMAS	PROCESO/ADICION	EFECTO PRINCIPAL EN LA LECHE
<i>Leche entera líquida o Leche descremada líquida</i>	<i>Evaporación</i>	<i>Aumenta todos los componentes</i>
	<i>Leche en polvo</i>	<i>Aumenta todos los componentes sólidos</i>
	<i>Leche descremada en polvo</i>	<i>Aumenta el extracto seco</i>
	<i>Mazada en polvo</i>	<i>Aumenta el extracto seco y fosfolípidos</i>
	<i>Caseinato</i>	<i>Aumenta el extracto seco, la caseína</i>
	<i>Suero de queso en polvo (desechado por nebulización)</i>	<i>Aumenta el extracto seco, las proteínas del suero, la lactosa y los minerales</i>
	<i>Leche entera evaporada</i>	<i>Aumenta todos los componentes</i>
	<i>Leche descremada evaporada</i>	<i>Aumenta el extracto seco</i>
	<i>Leches concentradas (ósmosis inversa)</i>	<i>Aumenta todos los componentes sólidos</i>
	<i>Leche en polvo</i>	<i>Las leches entera y descremada en polvo pueden reconstituirse hasta un extracto seco predeterminado o bien hasta, los correspondientes a las leches líquidas, fortificándolas o procesándolas como antes.</i>

Fuente: Robinson, R. K. (1987)

Cuadro 13. MODIFICACIONES DEBIDAS A LA HOMOGENIZACION DE LA LECHE DESTINADA A LA FABRICACION DE YOGURT.

EFECTO DE LA HOMOGENIZACION	MODIFICACIONES OBSERVADAS EN EL YOGURT
Aumento de viscosidad	<i>Reducción del tamaño de los glóbulos grasos y aumento de la adsorción sobre las micelas de caseína, lo que determina un aumento del volumen total efectivo de sustancias en "suspensión".</i>
Actividad xantín-oxidasa	<i>Debido a la desorganización de la membrana del glóbulo graso que contiene aproximadamente la mitad de la actividad enzimática presente en la leche.</i>
Color (más blanco)	<i>El aumento del número de glóbulos grasos aumenta la reflexión y dispersión de la luz.</i>
Lipólisis	<i>Se observa un aumento de la superficie total de grasa expuesta a la acción de las lipasas. La destrucción de la membrana del glóbulo graso puede aumentar el grado de lipólisis debido a los cultivos starter.</i>
Mezcla correcta	<i>Especialmente si la leche es enriquecida con leche en polvo.</i>
Contenido en fosfolípidos	<i>Debido al efecto físico se aprecia un mayor grado de transferencia de material de membrana a la leche desnatada.</i>
Formación de espuma	<i>Debido a la mayor concentración de fosfolípidos en la fase no grasa de la leche el bombeo de la rizada puede dar lugar a la formación de espuma en los tanques de incubación.</i>
Disminución de tamaño de los glóbulos grasos	<i>Su disminución evita la formación de la línea de nata en el yogurt, especialmente durante la incubación.</i>
Sabor oxidado	<i>Debido a la migración de fosfolípidos a la fase no grasa de la leche y a la formación de compuestos con grupos sulfhidrilo que actúan como antioxidantes. Posiblemente es la desnaturalización de proteínas del lactosuero lo que permite la exposición de grupos SH antes ocultos.</i>
Estabilidad de las proteínas	<i>Se observan cambios en las interacciones proteína-proteína debidos en parte a cierto grado de desnaturalización y a modificaciones de equilibrio salino.</i>
Agglutinación y fuerza ascensional efectiva	<i>Disminuye la aglomeración de glóbulos grasos debido a la adsorción de las micelas y submicelas de caseína sobre los glóbulos grasos.</i>
Caseína presente en la fase no grasa	<i>Se observa una transferencia parcial desde la fase no grasa formando una nueva membrana alrededor de los pequeños glóbulos grasos aparecidos.</i>
Síntesis	<i>Aumenta la hidrofobicidad y capacidad de retención de agua debido a las caseínas que forman parte de la membrana del glóbulo graso y a otras interacciones.</i>

Fuente: Tamme y Deeth (1980)

1.5.3.4 *Tratamiento térmico.* De acuerdo con Stogards, las condiciones óptimas del tratamiento térmico previo al que se somete la leche para elaborar yogurt, son 80-85°C por un tiempo de 30 minutos, sin embargo éste puede variar alcanzando incluso temperaturas de esterilización, 120°C durante 5 minutos (137).

A pesar de que el impacto del tratamiento varía con las condiciones empleadas, los efectos de éste son fundamentalmente los mismos:

1. Reducción de carga microbiana inocua y patógena de la leche, encontrándose por tanto el cultivo iniciador con una competencia menor de microorganismos adventicios.

2. Producción de factores estimulantes o inhibidores de los cultivos iniciadores del yogurt:

(a) estimulación del cultivo iniciador en leche tratada a 62°C durante 30 minutos ó 72°C por 40 minutos.

(b) inhibición del cultivo láctico en la leche sometida a un calentamiento entre 72°C/45 minutos y 82°C/10-12 minutos o 90°C/1-45 minutos.

(c) estimulación de los cultivos iniciadores en leche calentada a 90°C durante 60-180 minutos y en la tratada en autoclave a 120°C por 15-30 minutos.

(d) inhibición del iniciador en leche sometida a tratamiento en autoclave a 120°C durante más de 30 minutos (51).

Este ciclo de estimulación - inhibición - estimulación - inhibición es debido a los cambios experimentados por las proteínas del lactosuero y puede ser reproducido mediante adición

de proteínas del lactosuero desnaturalizadas o de clorhidrato de cisteína. El paso de una fase del ciclo a otra, en respuesta a diferentes tratamientos térmicos, es consecuencia de la liberación de compuestos nitrogenados desnaturalizados. A concentraciones de cisteína añadida de 0.15-0.20 mg/ml o de 10-20 µg/ml aumenta el número de grupos SH que quedan libres tras el calentamiento. Esta sustancia actúa como factor estimulante en leche cruda y sometida a un calentamiento suave, pero cuando el tratamiento térmico es intenso estas mismas concentraciones actúan como inhibidoras. De manera general podría decirse que la adición de cisteína, glutato o tioglicolato y la eliminación del oxígeno determinan un efecto estimulante; la inhibición se debe a un exceso de concentración de cisteína en la leche, acompañado de un incremento de los compuestos sulfurados volátiles; el segundo ciclo de estimulación se debe a la disminución de la concentración de compuestos sulfurados tóxicos como resultado de un intenso calentamiento o quizás a la formación de ácido fórmico (51)(115)(140).

3. Cambios en las propiedades fisicoquímicas de los componentes de la leche:

(a) Existe una disminución en las propiedades hidrofílicas de los complejos caseína/ β -lactoglobulina, lo cual puede tener un efecto no deseable sobre la calidad del yogurt, aumentando posiblemente la tendencia a la sinéresis.

(b) Hay una desnaturalización de las proteínas del suero (albúminas y globulinas) y una agregación de las moléculas de

caseína que forman una red tridimensional. Dicha red retiene las proteínas del suero y subsecuentemente el coágulo del yogurt obtenido se hace más viscoso.

(c) Durante el tratamiento térmico las proteínas lácteas sufren cierto daño y sus productos de degradación estimulan la actividad del iniciador.

(d) El calentamiento de la leche puede afectar el estado de las sales en la leche, especialmente de calcio, fosfato, citrato y magnesio.

(e) Existe una pérdida de vitaminas termolábiles B₆, B₁₂ y C en los diferentes tratamientos térmicos a los que es sometida la leche, sobre todo cuando éste es intenso. La presencia de oxígeno disuelto aumenta notablemente la destrucción de estas vitaminas (52).

En general, se puede decir que el tratamiento térmico modifica las caseínas de forma que el gel que originan al precipitar a pH 4.6, es diferente al de la leche no tratada térmicamente. En la leche cruda, la caseína precipita formando agregaciones o racimos, en los cuales las proteínas están desigualmente repartidas, lo que dificulta la inmovilización del agua, el coágulo es mucho más flojo.

En la leche tratada con calor, las proteínas forman una red que es capaz de inmovilizar el agua en el interior de sus mallas. El coágulo resultante es firme y tiende poco a la sinéresis. En esta red mediante el microscopio electrónico, se ha observado que los microorganismos lácticos ocupan una especie de huecos o

espacios vacíos, de modo que las cepas productoras de yogurt y sobre todo las filantes se anclan en ellos por medio de cadenas de polisacáridos que se unen a las proteínas (116).

Además, el yogurt preparado con leche calentada presenta una fermentación mucho más corta, debido a los factores estimulantes como: la aparición de ácido fórmico, producto de la descomposición de la lactosa y la reducción en el nivel de oxígeno, N_2 , y CO_2 disueltos en la leche. La leche almacenada en frío suele estar saturada de oxígeno, un contenido superior a 4 mg/Kg produce un estancamiento en el desarrollo de las bacterias del yogurt después de un cierto tiempo, que depende de la temperatura de incubación y el contenido de este gas (11).

1.5.3.5 Proceso de fermentación. Las transformaciones que se producen en la leche o sus derivados por la acción de microorganismos son múltiples y complejas, además de que pueden ser clasificadas en varios grupos. En el caso del yogurt la fermentación que se lleva a cabo es de tipo láctico, en la cual el sustrato principal es la lactosa que se transforma en ácido láctico en un 20% solamente. La flora láctica se adiciona en forma de cultivos puros o mixtos obtenidos en un medio preparado con leche descremada.

1.5.3.5.1 Importancia de cultivos lácticos: Streptococcus thermophilus y Lactobacillus bulgaricus. Desde hace mucho tiempo, se han atribuido a los productos lácteos fermentados

especialmente al yogurt, algunas propiedades nutritivas, medicinales y terapéuticas, entre otras. Sin embargo, las características más apreciables e importantes de estos productos son sin duda alguna su sabor y textura (6).

El uso de bacterias lácticas en la producción de alimentos presenta un beneficio adicional, al inhibir o inactivar algunos microorganismos capaces de causar descomposición o intoxicación (120).

Las bacterias, Lactobacillus bulgaricus y Streptococcus thermophilus en relación sinérgica, se emplean en la manufactura del yogurt. Son capaces de inducir una fermentación láctica (140).

Lactobacillus bulgaricus es una bacteria láctica homofermentativa que se desarrolla óptimamente entre 45 y 50°C acidificando fuertemente el medio. Es capaz de formar hasta 2.7% de ácido láctico en leche. Streptococcus thermophilus se multiplica bien a temperaturas entre 37 y 40°C, pero también puede desarrollarse a 50°C. Es una especie homofermentativa termorresistente que sobrevive a calentamiento de 65°C durante 30 minutos (147).

Las cepas se seleccionan de acuerdo a 6 parámetros principales: temperatura de crecimiento, actividad, producción de sustancias aromáticas, variabilidad de las cepas, viscosidad de los cultivos y sensibilidad a los fagos (50).

El papel desarrollado por los cultivos lácticos en la elaboración de yogurt es:

1º Contribuyen en la producción de ácido láctico como resultado de la fermentación de lactosa; el ácido láctico imparte un sabor ácido, fresco y distintivo durante la manufactura de leches fermentadas.

2º Ayudan a la producción de compuestos volátiles (ej. diacetil y acetaldehído) los cuales contribuyen al sabor de los productos lácteos.

3º Tienen una actividad proteolítica o lipolítica.

4º Pueden producirse otros compuestos, por ejemplo alcohol.

5º La condición ácida en estos productos lácteos previene el crecimiento de microorganismos patógenos, así como de organismos de descomposición.

Estas bacterias lácticas solamente obtienen energía por medio de la fermentación de carbohidratos. La lactosa es el azúcar mayoritario de la leche, aunque también se puede encontrar glucosa y galactosa, que son el resultado de su hidrólisis.

Los microorganismos lácticos también son capaces de llevar a cabo cierta proteólisis. Tienen enzimas proteolíticas específicas en su acción (péptidohidrolasas), capaces de catalizar la ruptura de cadenas peptídicas que son muy numerosas (140).

Al comienzo de la elaboración del yogurt, el pH de la leche favorece la proliferación de estreptococos, que al predominar ponen en marcha la fermentación láctica. La acción caseolítica de lactobacilos estimula el desarrollo de éstos. Sin embargo al prolongar la acidificación, el pH de la leche se vuelve poco favorable para estreptococos y progresivamente van siendo

reemplazados por lactobacilos (115).

Por otro lado, la tesis general que sostiene que *L. bulgaricus* libera aminoácidos que estimulan el desarrollo activo de *S. thermophilus*, es universalmente aceptada. Existe asimismo una relación simbiótica inversa, ya que el crecimiento de *L. bulgaricus* bajo condiciones de anaerobiosis se ve estimulado por un factor originado por la actividad metabólica de *S. thermophilus*, que es similar o puede sustituirse por el ácido fórmico.

Otro factor importante para el buen desarrollo de las bacterias lácticas es la temperatura a la que se incuben los cultivos a ser utilizados en la elaboración de yogurt. Se recomienda usar de 40 a 42°C ya que representa una media entre los óptimos metabólicos de ambas especies, por lo que a esta temperatura se alcanzará una relación 1:1 entre la población de las dos bacterias lácticas. Mientras la temperatura de 45°C es la óptima para la producción de ácido láctico por la mayoría de las estirpes de *L. bulgaricus*, 39°C es la temperatura que prefiere *S. thermophilus* (115)(126)(140).

Es necesario asegurar un crecimiento equilibrado de ambas especies porque otros metabolitos distintos del ácido láctico que son importantes para el sabor y aroma del yogurt son producidos por estas dos cepas.

Existen algunos factores que pueden influir en la relación simbiótica de estas especies, como los sólidos totales y el tratamiento dado a la leche. El porcentaje de sólidos no grasos,

presencia o ausencia de grasa y la concentración de sales minerales pueden intervenir también en los niveles de producción de ácido por los microorganismos y en el sabor y aroma desarrollados (89).

En el cuadro 14 pueden observarse las características morfológicas de *S. thermophilus* y *L. bulgaricus*.

1.5.3.5.2 Modificaciones en la leche durante la fermentación. La acidificación puede llegar a provocar la coagulación del producto si el pH desciende hasta el punto isoeléctrico de las caseínas. La actividad proteolítica de la flora y la producción de metabolitos secundarios, dan a los productos fermentados sus peculiares características organolépticas y texturales.

Durante la elaboración del yogurt, la leche una vez sometida al tratamiento térmico se enfría a la temperatura de incubación del cultivo láctico (*Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus*), teniendo lugar entonces la fermentación, por lo general a temperaturas entre 40 y 45°C, condiciones óptimas de crecimiento del cultivo mixto. Este proceso biológico debe llevarse a cabo bajo condiciones controladas en tanques incubadores y fermentadores especiales (140).

Independientemente del tipo de yogurt seleccionado (batido o tradicional), las reacciones bioquímicas responsables de la formación del gel/coágulo son exactamente las mismas.

A lo largo del proceso de fermentación existen ciertas

modificaciones físicas y químicas de la leche que contribuyen de manera directa a la formación del gel:

1. La producción gradual de ácido láctico por la fermentación de la lactosa comienza a desestabilizar los complejos de caseína-proteínas desnaturalizadas del lactosuero, por solubilización del fosfato de calcio y de los citratos.

2. Los agregados de micelas de caseína y/o las micelas aisladas se van asociando y coalescen parcialmente a medida que el pH se aproxima a su punto isoeléctrico, es decir 4.6 - 4.7.

3. Es probable que la interacción alfa-lactoalbúmina/beta-lactoglobulina con la kappa-caseína a través de los grupos SH con la formación de puentes disulfuro, proteja parcialmente a las micelas frente a una compleja desestabilización o ruptura, por lo que la red del gel o matriz queda formada por una estructura regular que atrapa en su interior al resto de los componentes de la mezcla base incluyendo la fase acuosa (115)(116)(140).

1.5.3.5.3 Recuento, aislamiento e identificación de los cultivos lácticos. Debido a la importancia de mantener un equilibrio entre bacilos y cocos, existe la necesidad de emplear técnicas que permitan determinar las proporciones relativas de ambos microorganismos (84).

Existe una gran variedad de caldos y medios de cultivo para la cuantificación y/o diferenciación de las bacterias ácido lácticas, lo cual indica las dificultades existentes para su aislamiento. Esto se debe principalmente a las complejas

exigencias en cuanto a los componentes nutricionales requeridos por estos microorganismos. Dichos compuestos van desde carbohidratos, factores presentes en hidrolizados diversos, hasta determinadas vitaminas, aminoácidos, bases púricas o pirimidinas, así como iones orgánicos (85).

Streptococcus thermophilus es un estreptococo muy difícil de cultivar ya que necesita de diversos factores estimulantes para su crecimiento, vitaminas como el ácido pantoténico, riboflavina y biotina. Además, requiere de pequeñas concentraciones de calcio y disacáridos como la sacarosa y la lactosa (2)(84).

Lactobacillus bulgaricus es un microorganismo muy inestable, el principal factor estimulante para su crecimiento es la riboflavina (127).

Otro factor importante para el aislamiento de estas bacterias son las condiciones de incubación y el pH del medio. Por ser anaerobios facultativos y no poseer sistema de citocromo, su desarrollo es mejor en atmósferas reducidas de CO_2 , que pueden ser suministradas por $N_2 + CO_2$ o por $H_2 + CO_2$ en ausencia de O_2 . La mayoría de las cepas son acidúricas y el pH óptimo para su desarrollo se encuentra entre 5.4 y 6.8 (123).

Cuadro 14. CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS DE CULTIVOS LACTICOS.

CARACTERISTICAS	<i>S. thermophilus</i> (Agar de Lee)	<i>L. bulgaricus</i> (Agar MRS)
Color	Amarillo	Beige
Tamaño	4 mm	5 mm
Forma	Redonda	Redonda
Bordes	Irregulares	Irregulares
Elevación	Cóncava	Plano-cóncava
Aspecto	Húmedo	Húmedo
Consistencia	Butirosa	Butirosa
Luz transmitida	Opaca	Opaca
Luz reflejada	Brillante	Brillante
Gram	Cocos gram (+)	Bacilos gram (+)

Fuente: Buchanan y Gibbons (1975)

1.5.3.6 *Enfriamiento.* Proceso decisivo en la producción de yogurt ya que permite controlar el nivel de ácido láctico producido al reducir la actividad metabólica del cultivo iniciador. El enfriamiento comienza inmediatamente después de alcanzar la acidez óptima en el producto, es decir a un valor de pH aproximado de 4.6 o una concentración de ácido láctico de 0.9% (116)(140).

Puede llevarse a cabo en una o dos fases. En el primer caso, el coágulo se enfría directamente desde la temperatura de incubación hasta temperaturas inferiores a 10°C antes de efectuar la adición de los agentes aromatizantes y al envasado del producto. En el enfriamiento en dos fases, durante la primera parte del proceso se reduce la temperatura del coágulo de 30-45°C a 15-20°C, antes de añadir los aromatizantes y de envasar el producto; la segunda fase se realiza en cámaras de refrigeración, en donde el yogurt se enfría hasta temperaturas inferiores a 10°C (140)(145).

Cabe señalar que el enfriamiento del yogurt comienza a valores de pH relativamente altos y que por tanto la velocidad de éste, lenta o rápida, condiciona la acidez final del producto.

1.5.3.7 *Envasado.* Faine (97), definió el objetivo del envasado de la siguiente manera: "El envasado es una forma de asegurar la distribución del producto hasta el consumidor final en adecuadas condiciones y con un mínimo costo".

En general, los materiales que están en contacto directo con

los alimentos deben ser atóxicos y químicamente inertes. Por ello, los plásticos son ampliamente usados en la industria láctea y debido a la naturaleza ácida del producto, el material más adecuado para las tapas son las láminas de aluminio o los materiales plásticos para sistemas de fácil apertura (36).

1.5.3.8 Almacenamiento. Un almacenamiento adecuado debe retardar las reacciones bioquímicas y biológicas que se llevan a cabo en el producto. Lo anterior permite conservar la calidad del producto hasta varias semanas después de su fabricación (140).

Durante las primeras 24-48 horas se observa una mejora en las características del coágulo como consecuencia principalmente de la hidratación y/o estabilización de las micelas de caseína (116).

1.5.4 Contaminaciones del producto. La calidad de un producto puede definirse en función de un gran número de criterios, incluyendo por ejemplo características físicas, químicas, microbiológicas, nutricionales o sencillamente su aceptación por los consumidores. Así, la microflora del yogurt por definición, se limita a las especies bacterianas inoculadas durante su fabricación considerando como "contaminación" el resto (40).

Debido a que la leche es la materia prima fundamental para la elaboración del yogurt, las características organolépticas y calidad microbiológica del producto final dependerá en gran parte

de la composición y condiciones sanitarias de ésta (116).

La calidad higiénica de este alimento debe estar constantemente controlada por lo cual es necesario verificar cada una de las materias primas a utilizar, así como tener control de los procesos durante la elaboración del yogurt (45).

Los microorganismos que con mayor frecuencia llegan a encontrarse en este alimento son mohos, levaduras y bacterias coliformes. Su presencia afecta de forma sustancial las características organolépticas y la higiene del producto (121). Algunas bacterias proteolíticas pueden desarrollarse cuando los fermentos lácticos están inactivos, dando lugar a la formación de un coágulo deficiente o a la aparición de sabores y aromas extraños.

Por otra parte es conocido el hecho de que la naturaleza ácida del yogurt y las condiciones de conservación en las que tienen lugar su comercialización reducen en forma significativa el grado de desarrollo de algunos microorganismos contaminantes. Sin embargo, estudios realizados por García y colaboradores (48), señalan que microorganismos potencialmente patógenos como *S. aureus* y *E. coli* fueron encontrados en yogures comerciales.

1.5.5 Norma microbiológica. El producto objeto de esta norma se clasifica en tres tipos y cada uno comprende tres subtipos de acuerdo a su composición y un sólo grado de calidad (94).

Tipo I. Yogurt o Leche búlgara natural.

Tipo II. Yogurt o Leche búlgara con fruta y aromatizado.

Tipo III. Yogurt o Leche búlgara aromatizado.

Subtipo A: De leche entera.

Subtipo B: De leche parcialmente descremada.

Subtipo C: De leche descremada.

El yogurt o leche búlgara en sus tres tipos, tres subtipos y único grado de calidad debe cumplir con las siguientes especificaciones sensoriales:

- Color: Uniforme y característico del producto.*
- Olor: Debe ser agradable y característico del producto.*
- Sabor: Acido, agradable y característico del producto.*
- Consistencia: Debe ser firme o batido y con la viscosidad característica del producto.*

El producto objeto de esta norma no debe contener microorganismos patógenos, toxinas microbianas e inhibidores microbianos, ni otras sustancias tóxicas que puedan afectar la salud del consumidor o provocar deterioro del producto.

Las especificaciones químicas, físicas y microbiológicas requeridas por la Norma Oficial Mexicana para el yogurt, se encuentran resumidas en los cuadros 15, 16 y 17.

Cuadro 15. **ESPECIFICACIONES FISICAS Y QUIMICAS PARA EL YOGURT.**
TIPOS I Y III.

ESPECIFICACIONES	SUBTIPO a Leche entera		SUBTIPO b Leche parcial- mente descremada		SUBTIPO c Leche descre- mada	
	Min.	Máx.	Min.	Máx.	Min.	Máx.
Grasa (%)	2.5	-	1.0	-	-	0.5
Sólidos no grasos de leche (%)	10.5	-	12.0	-	12.5	-
Acidez en ácido láctico (%)	0.8	1.8	0.8	1.8	0.8	1.8
Proteína (%)	3.2	-	3.4	-	3.6	-
Humedad (%)	-	87	-	87	-	87
pH	< 4.5		< 4.5		< 4.5	

Fuente: Norma Oficial Mexicana (1983)

Cuadro 16. ESPECIFICACIONES FISICAS Y QUIMICAS PARA EL YOGURT.

TIPO II.

ESPECIFICACIONES	SUBTIPO a Leche entera		SUBTIPO b Leche parcial- mente descremada		SUBTIPO c Leche descre- mada	
	Mín.	Máx.	Mín.	Máx.	Mín.	Máx.
Grasa (%)	2.0	-	0.8	-	-	0.4
Sólidos no grasos de leche (%)	8.4	-	9.6	-	10.0	-
Acidez en ácido láctico (%)	0.8	1.8	0.8	1.8	0.8	1.8
Proteína (%)	2.5	-	2.7	-	2.8	-
Humedad (%)	-	78	-	78	-	78
pH	< 4.5		< 4.5		< 4.5	

Fuente: Norma Oficial Mexicana (1983)

Cuadro 17. ESPECIFICACIONES MICROBIOLÓGICAS PARA EL YOGURT.

<i>Bacterias lácticas viables</i>	- mínimo	-----	2,000,000 UFC/g
<i>Organismos coliformes</i>	- máximo	-----	10 UFC/g
<i>Hongos</i>	- máximo	-----	10 UFC/g
<i>Levaduras</i>	- máximo	-----	10 UFC/g

Fuente: Norma Oficial Mexicana (1983)

1.6 JUSTIFICACION.

México es un país deficitario en producción de leche, en tal magnitud que se ha colocado como el primer importador del mundo; a pesar de que su producción ha aumentado, el crecimiento demográfico ha sido mayor, de manera que un equilibrio no ha sido posible.

Un contaminante microbiológico relevante en leche, es precisamente *S. aureus*, agente etiológico responsable del mayor número de los brotes de intoxicaciones alimentarias ocurridas en México durante los últimos años.

Existen informes que aseveran que *S. aureus* se destruye bajo las condiciones de pasteurización de la leche; sin embargo, estudios recientes han demostrado que aún después de someter la leche a procesos que provocan estrés en sus células, *S. aureus* es capaz de sobrevivir y reactivarse en la elaboración de derivados lácteos, ya que sólo ha sufrido un daño subletal. Este hecho se ha comprobado mediante la detección de este microorganismo en leches sometidas a deshidratación, tal ha sido el caso de algunas leches de importación.

Por lo anterior se propone un estudio de los efectos que sobre la viabilidad y capacidad enterotoxigénica de *S. aureus* ejercen las condiciones combinadas de temperatura-acidez involucradas en el proceso de elaboración de yogurt.

C A P I T U L O . I I

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

CAPITULO III.

OBJETIVO

- Comparar el desarrollo y capacidad productora de enterotoxina A, de Staphylococcus aureus con y sin daño subletal durante la elaboración del yogurt.

C A P I T U L O I I I

CAPITULO III

MATERIALES Y METODOS

3.1 Caracterización de la Cepa de *S. aureus*.

Este trabajo se realizó con una cepa de *S. aureus* FRI-100 productora de enterotoxina A, proporcionada por el Dr. Merlin S. Bergdoll del Food Research Institute, Universidad de Wisconsin-Madison, USA. La caracterización se llevó a cabo mediante las pruebas bioquímicas mencionadas a continuación.

3.1.1 Observación microscópica. La agrupación de cocos gram positivos en forma de racimos irregulares es típica de *S. aureus*, por lo que a una asada de un cultivo puro de 24 h de incubación en caldo lactosado se le aplicó la técnica de tinción de Gram y se realizó su observación al microscopio (26).

3.1.2 Morfología colonial. Un inóculo de *S. aureus* se sembró por estría cruzada en agar BHI y agar Baird-Parker, después de 24 h a 37°C, se leyó la morfología de las colonias aisladas.

3.1.3 Prueba de termonucleasa. Para realizarla, en una caja Petri se colocaron 6 ml de agar DNasa fundido; una vez

solidificado se hicieron perforaciones de 2 mm de diámetro. Un cultivo puro de *S. aureus* en caldo lactosado se calentó en baño maría a 90°C por 15 min, se tomaron porciones del mismo con una pipeta pasteur y colocaron en los pozos. Las cajas con el inóculo se incubaron durante 4 h a 37°C en cámara húmeda. Para revelar se utilizó una solución 1N de HCl de manera que cubriera la superficie de la caja. La aparición de un halo claro alrededor del pozo se consideró como prueba positiva (77)(81).

3.1.4 Prueba de coagulasa. En un tubo de ensayo se colocaron 0.5 ml de plasma humano o de conejo y se añadieron 0.5 ml de un cultivo puro de *S. aureus* en caldo lactosado de 18-24 h de incubación. El tubo se giró suavemente para lograr la suspensión y se sumergió posteriormente en baño maría a 37°C. La formación de un coágulo al cabo de 4 h de incubación se consideró como prueba positiva (37)(81)(107).

3.1.5 Prueba de catalasa. Sobre un porta objeto con una colonia de cultivo puro de 18-24 h de *S. aureus*, se adicionó una gota de peróxido de oxígeno al 3%. La formación casi inmediata de burbujas de oxígeno (liberación de gas), indica si la prueba es positiva (81)(107).

3.1.6 Fermentación de azúcares. Varios tubos conteniendo caldo base rojo fenol y cada uno de los siguientes azúcares: manitol, glucosa, lactosa y sacarosa, fueron inoculados con una

asada de un cultivo de 24 h en caldo lactosado de S. aureus. Se incubaron a 37°C durante 24 h. El vire del indicador rojo de fenol a amarillo representó la fermentación del azúcar correspondiente (81)(117).

3.1.7 Reacción de Voges-Proskauer. Prueba que permite observar la síntesis de acetilmetilcarbinol (acetoina) a partir de la fermentación de glucosa; el resultado se detecta mediante la variación del reactivo adicionado al medio de crecimiento (81).

3.1.8 Motilidad. En un medio semisólido específico, sulfhídrico indol movilidad (SIM), se sembró por picadura una asada de un cultivo de S. aureus. El crecimiento del microorganismo solamente sobre la línea de picadura indica la ausencia de movilidad (81).

3.1.9 Producción de enterotoxina. Se indujo la producción de enterotoxina tipo A para comprobar su síntesis por la cepa seleccionada para lo cual se empleó la técnica de celofán descrita a continuación (figura 2):

a. Se recortaron círculos de papel celofán para diálisis y papel filtro de un diámetro de 9 cm. Se humedecieron en agua destilada y colocaron alternativamente en una caja petri, las que se esterilizaron a 121°C durante 15 minutos.

b. Se tomaron 0.1 ml de un cultivo puro de S. aureus previamente

incubado en caldo lactosado a 37°C durante 24 h. Se sembró y distribuyó homogéneamente con una varilla de vidrio estéril sobre placas de agar EHI, sobre las cuales se había colocado con anterioridad una membrana de celofán. Las placas se incubaron durante 24 horas a 37°C.

c. El crecimiento se cosechó con 2.5 ml de una solución reguladora de fosfatos 0.01 M.

d. Se centrifugó a 3,500 rpm por 30 min. El sobrenadante se utilizó para la detección de enterotoxina (114).

La técnica inmunológica que se usó para detectar la presencia de la enterotoxina A, Reversed Passive Latex Agglutination (RPLA), tiene sensibilidad de 1.0 µg/ml de muestra. Para su realización se llevaron a cabo los siguientes pasos (figura 3):

a. El látex sensibilizado con la antitoxina se agita antes de su uso para asegurar una suspensión homogénea.

b. La preparación de la disolución control de la enterotoxina se realiza mediante la adición de 0.5 ml del diluyente al frasco que la contiene en forma liofilizada.

c. En una microplaca con pozos en forma de "V" se colocaron, con la ayuda de una micropipeta, 25 µl del diluyente a excepción del primero y último pozos en los cuales se adicionó 25 µl de la muestra sin diluir.

d. Se hicieron 10 diluciones consecutivas adicionando 25 µl al segundo pozo y homogenizando se tomaron 25 µl de este pozo y se pasaron al tercero, posteriormente del tercero al cuarto y así

sucesivamente.

e. En cada uno de los pozos se añadieron 25 μ l de látex sensibilizado con antitoxina A, a excepción del último pozo en el que se agregaron 25 μ l del látex control sin sensibilizar con antitoxina estafilocócica A que funcionó como control negativo.

f. Para mezclar los componentes de cada pozo y lograr una suspensión homogénea se rotó la placa en un microagitador o se efectuó manualmente.

g. La microplaca se incubó a temperatura ambiente, de 20 a 24 horas en cámara húmeda sobre una superficie libre de vibraciones.

h. Al cabo de este tiempo, se examinó cada pozo contra una superficie o fondo negro. La sedimentación del látex se considera como resultado negativo; por el contrario su aglutinación en el pozo indica la presencia de toxina (figura 4) (100)(118).

3.2 Adaptación de *S. aureus* en Caldo Lactosado.

Con el fin de adaptar las cepas a la utilización de la fuente energética de la leche, la lactosa, se hicieron resiembras consecutivas en caldo lactosado.

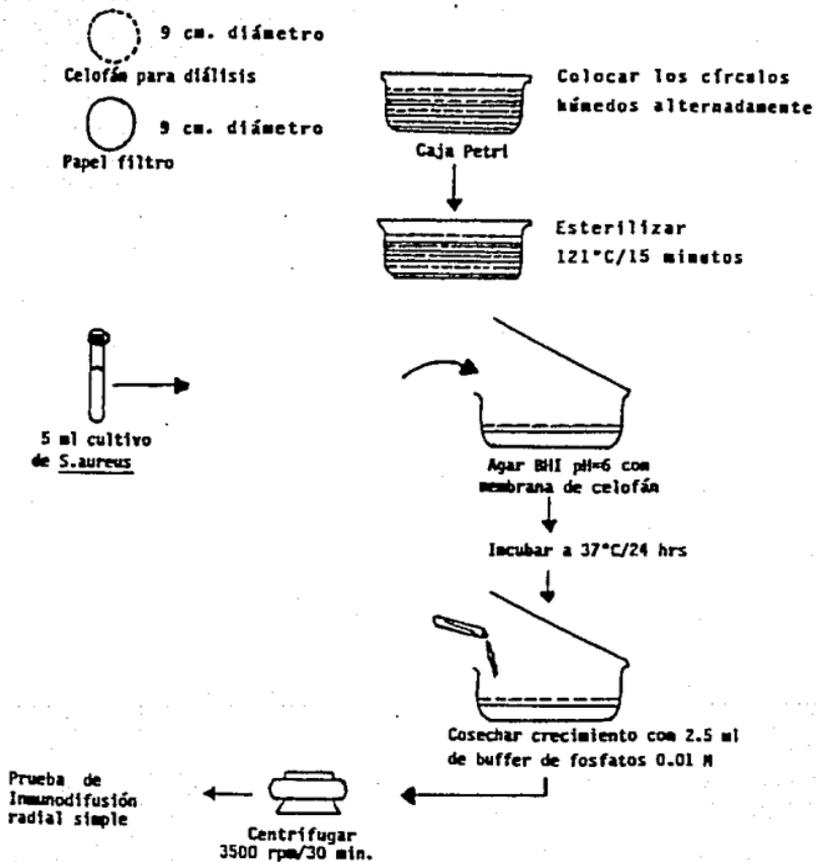
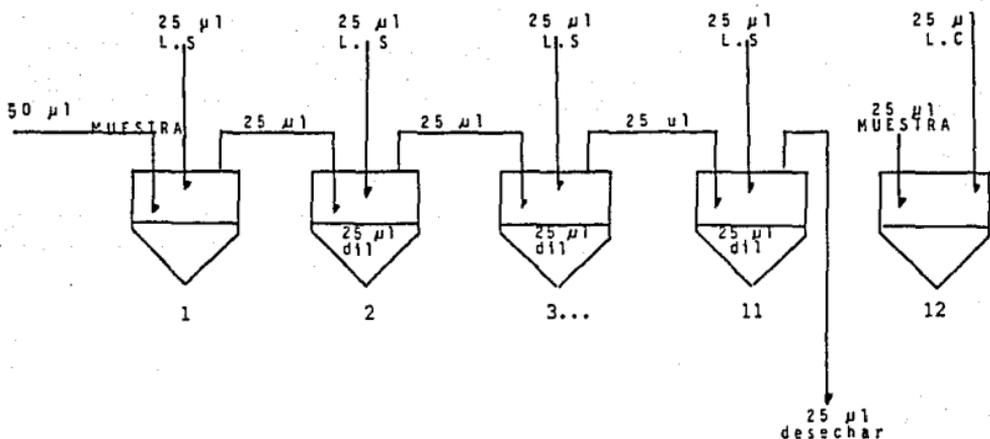


Figura 2. TECNICA DE CELOFAN PARA LA PRODUCCION DE ENTEROTOXINA.



L.C.-- LATEX CONTROL.
L.S.-- LATEX SENSIBILIZADO.

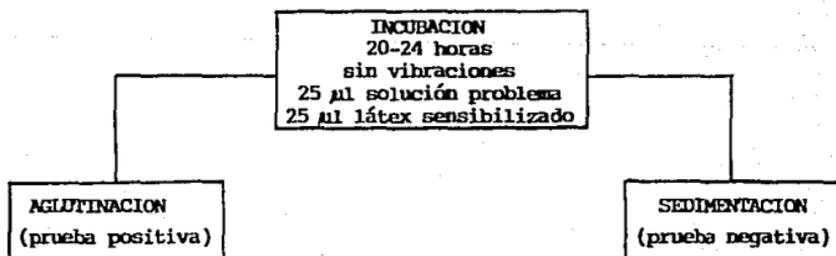


FIGURA 9. REVERSED PASSIVE LATEX AGGLUTINATION (RPLA).

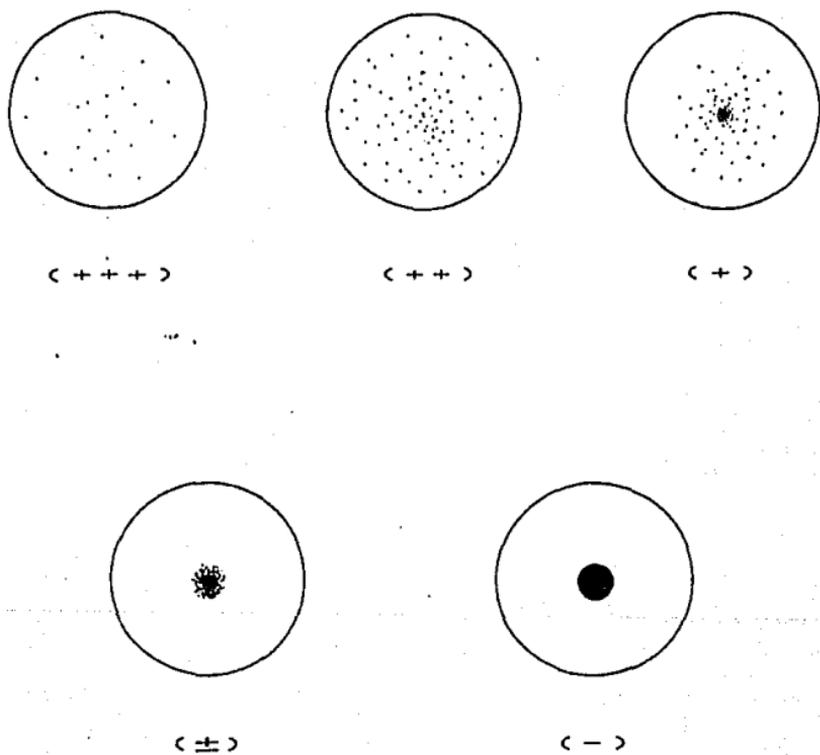


Figura 4. GRADOS DE AGLUTINACION DEL LATEX.

3.3 Curva de Crecimiento.

La fase logarítmica de crecimiento de *S. aureus* se determinó mediante los métodos de cuenta viable para bacterias y espectrofotometría.

Se prepararon cultivos puros de las cepas de *S. aureus* en caldo lactosado incubado a 37°C, durante 18-24 h. Con 3 ml de los cultivos de la cepa FRI-100 se inocularon 100 ml de caldo lactosado. La temperatura de éste se mantuvo a 37°C durante 12 h, período en el cual se realizaron muestreos cada hora tomando 1 ml para realizar la cuenta de microorganismos por el método de vaciado en placa.

En el método espectrofotométrico, se tomaron simultáneamente alícuotas de 5 ml de cultivo a las que se leyó su absorbancia en un espectrofotómetro Spectronic 20 a 600 nm. Estas mediciones se llevaron a cabo hasta la obtención de lecturas constantes (26).

3.4 Estandarización del Inóculo.

Para utilizarse el mismo número de células en los inóculos, se emplearon las técnicas de espectrofotometría y vaciado en placa.

a) En la curva de crecimiento de *S. aureus*, se determinó el tiempo de incubación necesario para que éste alcanzara la fase logarítmica.

b) Del período que comprende esta fase se seleccionó un tiempo constante en el cual se tomó una alícuota de 1 ml de cultivo para realizar la cuenta de células por el método de vaciado en placa.

(103).

c) Para la técnica espectrofotométrica se tomaron simultáneamente alícuotas de 5 ml de cultivo a diferentes tiempos de incubación y se leyó su absorbancia a 600 nm en un Spectronic 20.

d) Los resultados de absorbancia y número de microorganismos se relacionaron en el periodo establecido. El procedimiento se efectuó por triplicado.

3.5 Análisis Microbiológico de la Leche.

Con la finalidad de evaluar la calidad sanitaria de los tipos de leche en polvo, entera y descremada que se utilizaron en la elaboración de yogurt, fue necesario someterla a análisis microbiológico.

La preparación de la muestra se realizó pesando 10 g de la leche en polvo los cuales se homogenizaron con 90 ml de agua estéril; a partir de esta mezcla se hicieron diluciones decimales hasta 10^6 .

3.5.1 Mesófilos aerobios. Se determinaron por el método de placa vertida, utilizando el agar para cuenta estándar e incubando a 37°C por 48 h. Los resultados se expresaron en UFC/ml (33)(145).

3.5.2 Coliformes totales. Tiene como objetivo principal detectar la presencia de Escherichia coli, considerado como un

claro indicio de contaminación fecal. Para su determinación se utilizan medios diferenciales a base de lactosa (14).

Esta determinación se realizó por el método de placa vertida utilizando el agar rojo-bilis-violeta, incubando a 37°C por 24-48 h. Los resultados obtenidos se expresaron en UFC/ml (7).

3.5.3 Aislamiento e identificación de Salmonella spp. La comprobación de la presencia o ausencia de estos microorganismos conlleva varias etapas que comprenden un pre-enriquecimiento, enriquecimiento, aislamiento en medios selectivos e identificación presuntiva por medio de pruebas bioquímicas (14).

Se sembraron 2 g de muestra en tubos conteniendo caldo selenito y tetratianoato, se incubaron por un lapso de 18 a 24 horas a 37°C. Una asda de cada tubo se sembró por estría en agares de eosina-azul de metileno (EMB) y sulfito-bismuto. Las colonias que resultaron sospechosas se sometieron a pruebas bioquímicas para comprobar la presencia de Salmonella (7)(33).

3.5.4 Aislamiento e identificación de S. aureus. Se emplearon las técnicas de Baird-Farker y Van Doorne cuyos pasos se indican a continuación (14)(15):

Método de Baird-Parker. Consiste en sembrar 0.1 ml de las tres últimas diluciones de la muestra en placas solidificadas con agar Baird-Farker (BP) adicionado de emulsión de yema de huevo. La distribución del inóculo se realizó con una varilla de vidrio. Las cajas se incubaron a 37°C por 24-48 h. Posteriormente se

efectuó el recuento de colonias típicas (figura 5) (33).

Método de Van Doorne. Varía del de Baird-Parker en el enriquecimiento previo que se realiza en el alimento a analizar, con objeto de reactivar las células dañadas por tratamientos utilizados durante el procesado de los alimentos. La metodología es la siguiente (figura 6):

a) Se colocaron 50 g de alimento en un matraz conteniendo 100 ml de caldo Baird-Parker e incubaron a 37°C durante 24-48 h en una cámara microaerofílica. En caso de haber crecimiento se observa la formación de un precipitado negro.

b) Del matraz anterior, se tomó 0.1 ml y se sembró por el método de superficie en agar Baird-Parker. Se incubó a 43°C por 24 h. Si hay desarrollo de colonias negras con o sin halo de clarificación se identifican por el método de termonucléasa (37)(146).

3.6 Tratamiento Térmico de *S. aureus*.

Para ocasionar el daño térmico subletal en las células se empleó el método de tubo capilar (figura 7). El procedimiento que se siguió en este caso fue:

a. Se tomaron 3 ml de un cultivo puro de *S. aureus* en caldo lactosado de 18 a 24 h de incubación y se inocularon en 100 ml de leche entera en polvo reconstituida al 12% de sólidos totales. Se incubó a 37°C durante el tiempo en que el microorganismo alcanza su fase logarítmica de crecimiento, parámetro previamente determinado por la curva de crecimiento.

b. Se tomaron 10 ml de este cultivo y se centrifugaron a 4500

rpm durante 1.5 h, se eliminó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió en 10 ml de leche entera en polvo reconstituida estéril.

c. Con la ayuda de una microjeringa, se colocaron 0.05 ml del cultivo resuspendido en un tubo capilar de 1 mm de diámetro.

d. El capilar con el cultivo se sujetó a un termómetro dentro de un tubo de Thiele con agua aplicando la temperatura seleccionada durante diferentes tiempos, 72°C/30 s, que corresponde a la temperatura de pasteurización rápida de la leche.

e. Durante el tiempo total de exposición, 30 segundos, se muestreó cada 5 s iniciando en el tiempo cero.

f. Inmediatamente después de aplicado el tratamiento, cada tubo capilar incluyendo un blanco se introdujeron en un baño de agua helada y se colocaron en un tubo para dilución con 9.95 ml de agua salina estéril al 0.9%.

g. Se realizaron diluciones decimales que se sembraron por placa vertida en agar de soya-tripticaseína (AST), con cloruro de sodio y sin esta sal. La incubación fue a 37°C durante 24 a 48 h.

h. Las colonias de *S. aureus* se contabilizaron en ambos medios y expresaron como UFC/ml.

i. El porcentaje de células dañadas se calculó por la siguiente expresión (44)(57):

$$\% \text{ población dañada} = \frac{\text{cuenta en AST} - \text{cuenta en AST} + \text{NaCl}}{\text{cuenta en AST}} \times 100$$

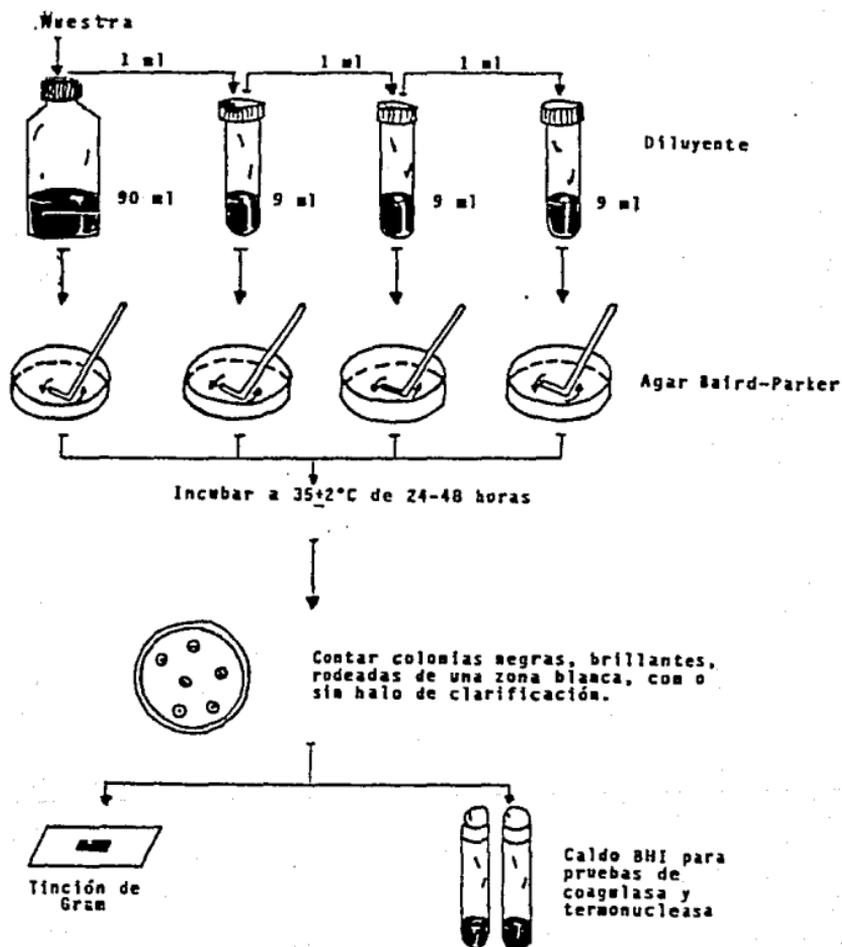


Figura 5. METODO DE BAIRD-PARKER PARA RECUESTO DE *S. aureus*.

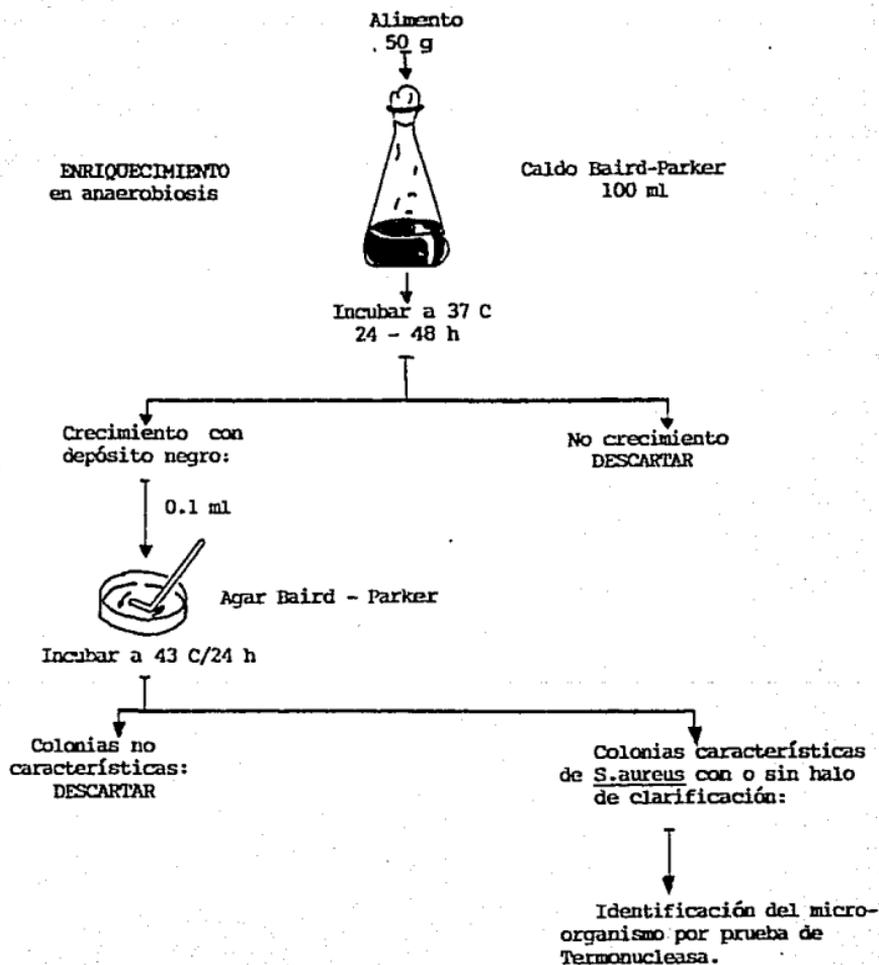


Figura 6. METODO DE VAN DOORNE.

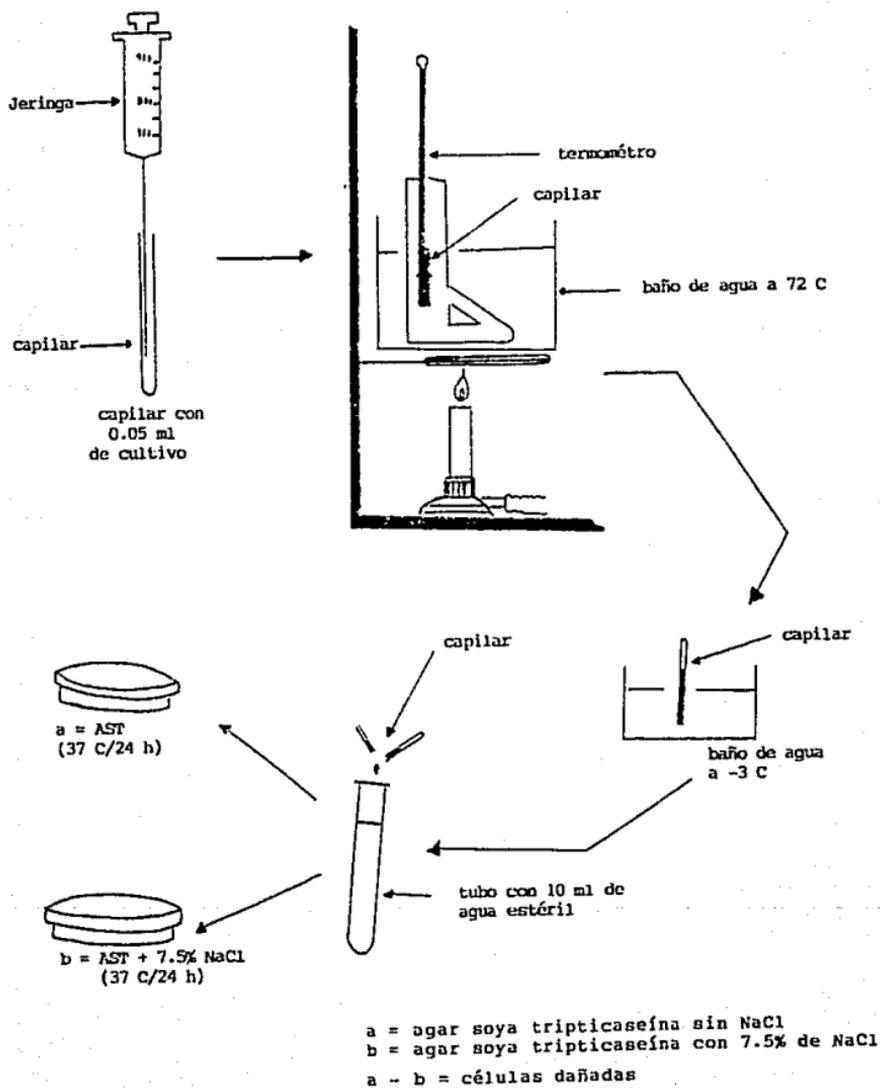


Figura 7. METODO DEL TUBO CAPILAR.

3.7 Selección de Medios de Cultivo para Recuento y Aislamiento de los Cultivos Lácticos.

Para asegurar un aislamiento adecuado de cada uno de los microorganismos involucrados en la elaboración del yogurt, se procedió a seleccionar los medios de cultivo que mejor cumplieran con esta función.

Se utilizó una mezcla 1:1 de S. thermophilus y L. bulgaris cuya marca comercial es DRI-VAC 110, producida por Laboratorios Chrystian-Hansen. Su activación se realizó de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Las resiembras en las que la acidez alcanzó valores de 0.95-1.25 se usaron para la elaboración del yogurt.

Para el recuento y aislamiento de S. thermophilus y L. bulgaricus se emplearon los agares de Lee y Man Rogosa Sharp (MRS) respectivamente (14)(85)(115). La verificación de los métodos se hizo empleando cepas puras licofilizadas de estos microorganismos así como una mezcla de ambos. El procedimiento fue:

a. Se tomó una alícuota de 1 ml de: mezcla de cultivos lácticos, S. thermophilus y L. bulgaricus así como de los cultivos puros. Se hicieron 7 diluciones en solución buffer de fosfatos con pH de 7.2. La muestra no debe estar en contacto con el diluyente por más de 20 min porque después de este tiempo la cantidad de microorganismos comienza a disminuir (68).

b. Las diluciones se sembraron por superficie en los agares respectivos colocando 0.1 ml de inóculo y esparciéndolo con una

varilla estéril. A las cajas que se prepararon con anterioridad, se les probó esterilidad a 37°C por 24 h.

c. Las cajas inoculadas se incubaron en una atmósfera parcial de CO₂ a 37°C. Las que contenían agar Lee se dejaron 48 h en estas condiciones y las de agar MRS 72 h (14)(85).

d. Para comprobar en el caso correspondiente la pureza de las cepas, se realizó una observación microscópica por tinción de gram.

3.8 Elaboración de yogurt con y sin Inóculo de S. aureus Dañado y sin Lesión Subletal.

Inóculo de S. aureus sin daño subletal. Se partió de un cultivo de S. aureus en fase de crecimiento exponencial; se tomaron 11 ml de este cultivo y se centrifugaron a 4500 rpm durante 1.5 h. Se eliminó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió en 10 ml de leche en polvo reconstituida estéril, de éstos se tomó 1 ml para hacer la cuenta de S. aureus en Baird-Parker (BP) y los 9 ml restantes se inocularon en la leche destinada a la elaboración del yogurt.

Inóculo de S. aureus con daño subletal. Se siguió el mismo procedimiento utilizado para el tratamiento térmico siendo aplicada en este caso una temperatura de 72°C por 25 s. Después de ésto, los 20 tubos capilares utilizados en esta prueba fueron colocados en un matraz conteniendo 30 ml de agua estéril. Posteriormente, se tomó 1 ml del contenido y se sembró en AST y AST con 12.0% de NaCl, con objeto de verificar los porcentajes de

células destruidas y dañadas, así como el número de las inoculadas después del tratamiento térmico.

Proceso de elaboración de yogurt. Se fabricaron 500 ml de yogurt por el método tradicional, a partir de leche entera en polvo sometida previamente a análisis microbiológico. El procedimiento seguido se muestra en la figura 8.

a. Se reconstituyó la leche entera al 20% de sólidos totales, se homogenizó y se le dió un precalentamiento, 63°C por 30 min.

b. Al cabo de los 30 min. la leche se enfrió a 45°C y se le adicionó el inóculo de cultivos lácticos en una proporción del 3.5%.

c. La leche inoculada con las bacterias ácido lácticas se incubó a 45°C hasta alcanzar la acidez deseada, de 100 a 120°D.

d. Terminado el tiempo de incubación, el yogurt se enfría a una temperatura de 10 a 15°C para detener el proceso de fermentación.

e. El yogurt terminado se envasa y refrigera a 4°C.

La elaboración de yogurt a partir de leche inoculada con *S. aureus* se realizó siguiendo el mismo procedimiento. Se prepararon dos tipos de lotes, uno con leche adicionada de 3.5% de cultivos lácticos y 9 ml de un cultivo de *S. aureus* sin daño (10^6 UFC/ml); en el segundo caso también se utilizó 3.5% de cultivo láctico y 29 ml de una dilución 1:30 de un cultivo de *S. aureus* con daño subletal. La incubación también se realizó a 45°C por 5.5 h (figuras 9 y 10).

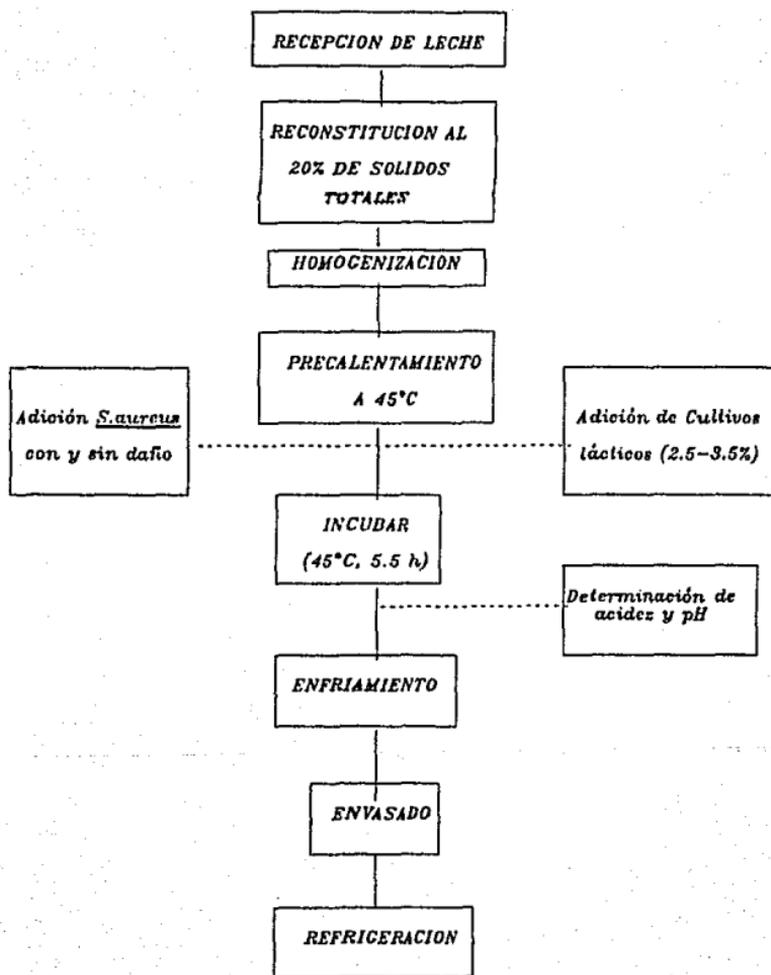


Figura 8. ELABORACION DE YOGURT.

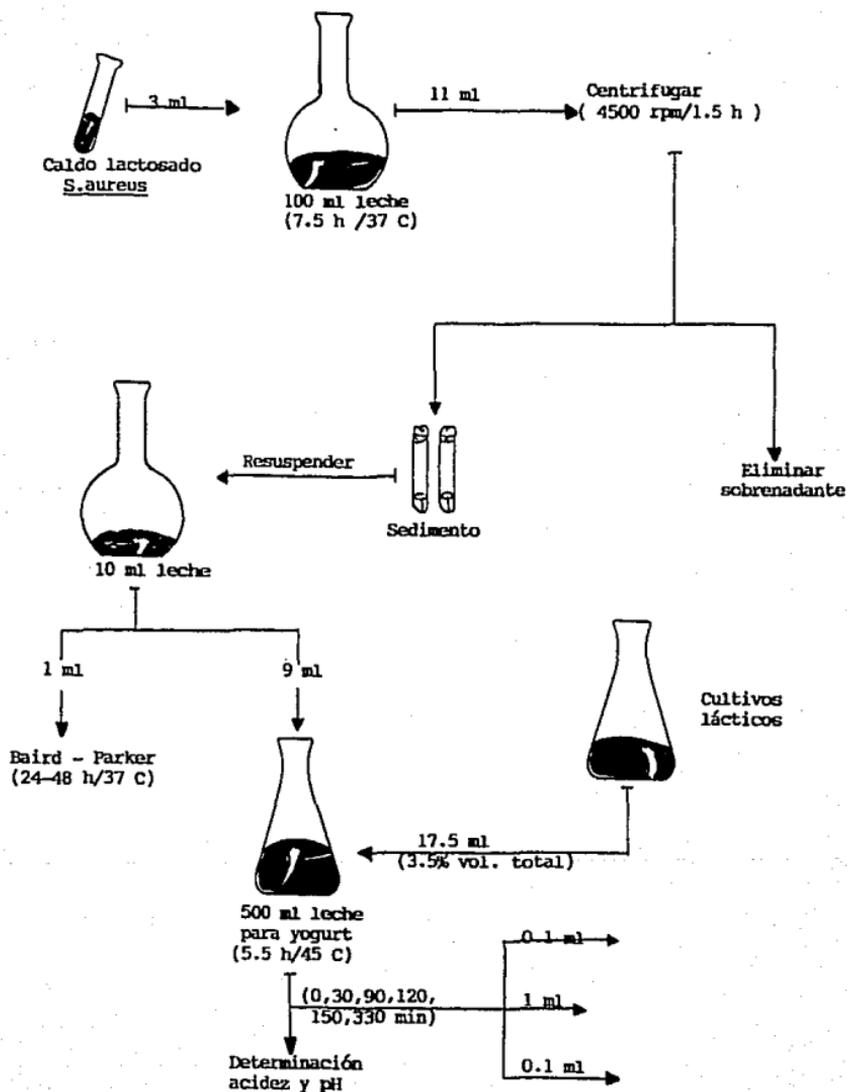
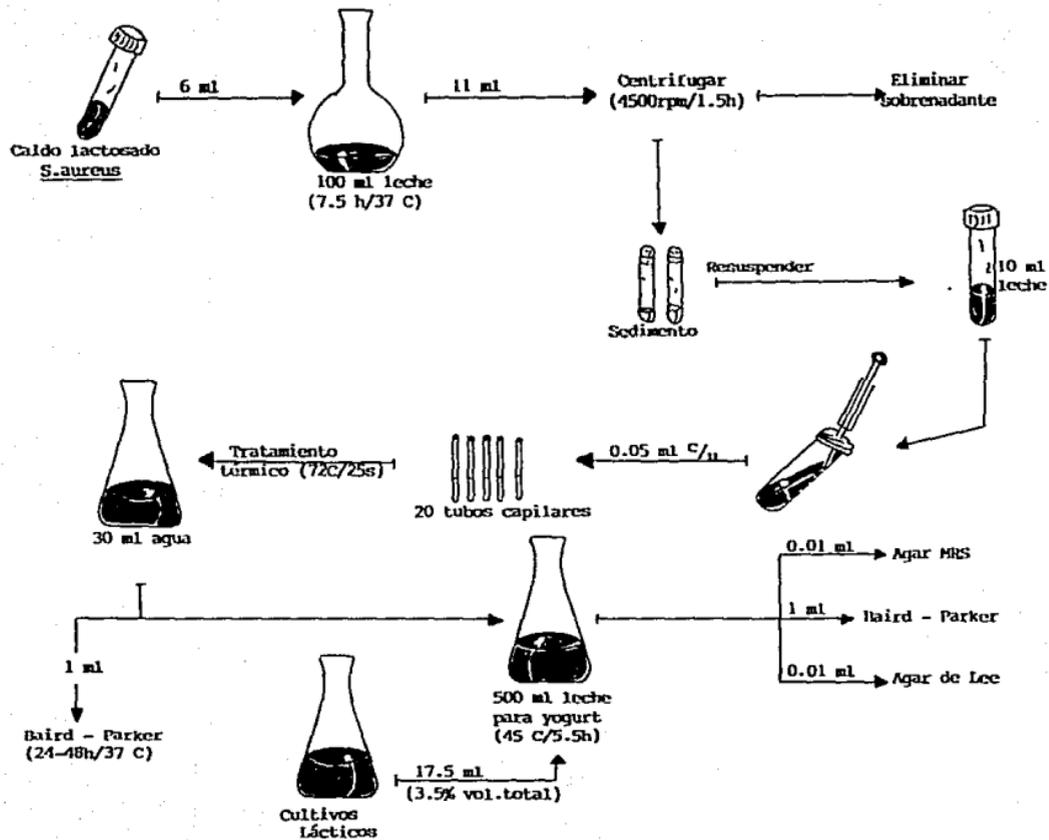


Figura 9. ELABORACION DE YOGURT CON INOCULO DE *S. aureus* SIN DAÑO SUBLETAL.

Figura 10. ELABORACION DE YOGURT CON INOCULO DE S. aureus CON DANO SUBLETAL.



3.9 Análisis Durante el Proceso.

Con la finalidad de seguir el desarrollo de los tres microorganismos involucrados durante la elaboración del yogurt se tomaron alicuotas a tiempos definidos de procesos (0, 30, 90, 150, 210 y 330 min.).

a. Para la cuantificación de *S. aureus*, *S. thermophilus* y *L. bulgaricus* se utilizaron los agares BP, Lee y MRS respectivamente.

b. Se tomó 1 ml de muestra para sembrar en cada uno de los agares y se hicieron diluciones hasta 10^8 .

c. Se empleó agua salina al 0.9% para realizar las diluciones que se sembraron en BP y solución buffer de fosfatos para las que se colocaron en los otros dos medios.

d. Las técnicas empleadas fueron las descritas con anterioridad para el recuento y aislamiento de cada una de las bacterias (9)(14)(33)(85).

e. Se hicieron mediciones de pH y acidez a los mismos tiempos de proceso definidos, tomando 5 g de muestra para cada prueba. La acidez se determinó por titulación con NaOH 1N utilizando como indicador fenoftaleína; la medición de pH se efectuó directamente de la muestra utilizando un potenciómetro previamente calibrado (26)(147).

3.10 Semicuantificación de Enterotoxina.

Para la detección de enterotoxina A del yogurt elaborado se utilizó el método de Reversed Passive Latex Agglutination (RPLA).

Con objeto de remover toda la materia grasa y sustancias que pudieran interferir en la detección del metabolito se procedió a una extracción previa (figura 11).

a. Se pesaron de 25 a 50 g de alimento y se les adicionó de 50 a 75 ml de agua destilada, la mezcla se homogenizó con la ayuda de una licuadora.

b. El pH de la solución se ajustó a 4.5 con una solución de HCl 6N.

c. Se centrifugó a 4500 rpm durante 40 min. Al término el sobrenadante se llevó a un pH de 4.5 con NaOH 2N.

d. Cuando no se encontró precipitado después del ajuste de pH, se utilizó el extracto. En caso contrario se volvió a centrifugar a la misma velocidad y tiempo.

e. En un embudo de separación, se elimina la grasa del sobrenadante usando 1 ml de cloroformo por cada 10 ml de extracto.

Una vez obtenido el extracto se procedió a utilizarlo en el método de RPLA empleando un "kit" específico para la determinación de enterotoxina A, tal como se detalló con anterioridad en el inciso 3.1.9 (figura 3).

En este caso, para conocer los rangos de concentración en los que se encuentra la toxina se elaboró una curva estándar con cantidades conocidas de enterotoxina pura y los resultados obtenidos se graficaron.

La determinación de toxina se efectuó en el yogurt recién elaborado y a los 7 días de almacenado en refrigeración (4°C).

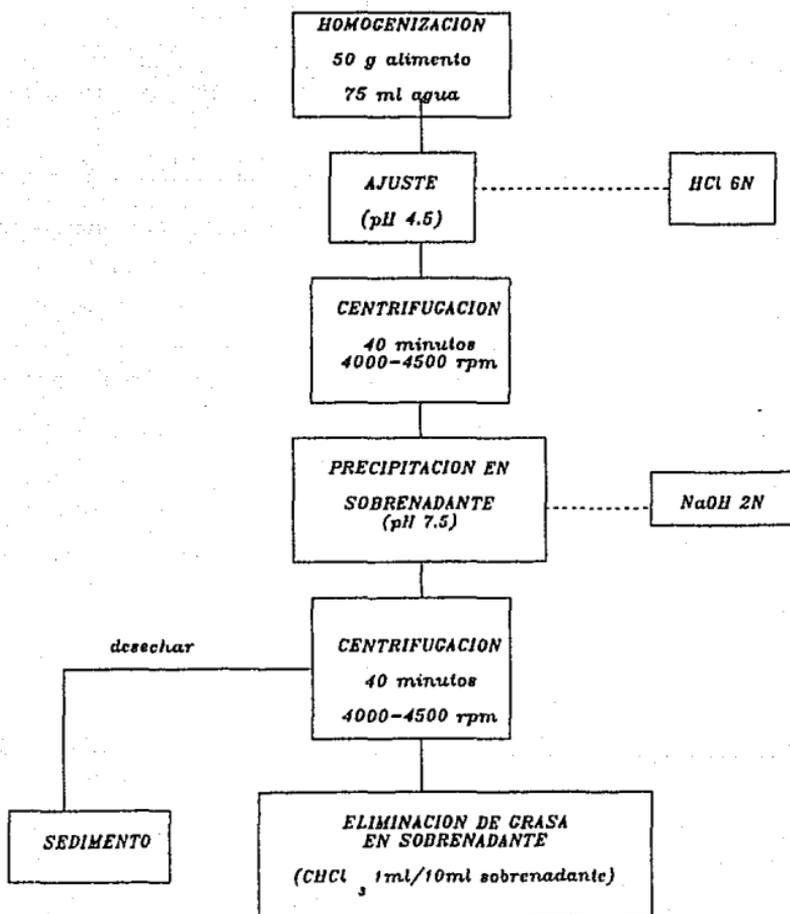


Figura 11. EXTRACCION SIMPLE DE ENTEROTOXINA.

C A P I T U L O I V

CAPITULO IV.

RESULTADOS Y DISCUSION

4.1 Caracterización de la Cepa de S. aureus.

4.1.1 Morfología microscópica. Al observar al microscopio el frotis del cultivo de S. aureus FRI-100 previamente teñido por la técnica de Gram, se pudieron identificar células esféricas (cocos) gram positivas, agrupadas en racimos irregulares.

La tinción de Gram está en relación directa con la composición química y la estructura física de la pared celular. El grosor de la pared de las bacterias gram positivas (20 a 80 nm) es mayor que el de las gram negativas. Está compuesta por una gran porción de péptidoglucano que rodea a la membrana citoplasmática (plasma). El péptidoglucano es un polímero formado por ácido acetilglucosamida, ácido acetilmurámico y un péptido constituido por 4 o 5 aminoácidos. Al realizarse la tinción, el complejo cristal violeta-iodo queda atrapado en la pared celular de la bacteria después del tratamiento con etanol debido a que se presenta una disminución en el diámetro de los poros que impiden la salida del complejo (39)(47)(102).

El género Staphylococci presenta tinción de Gram positiva y

una acumulación irregular de las células que por lo general semejan racimos. Sin embargo, esta prueba por sí sola no permite la diferenciación de esta especie, de otras de la familia Micrococcaceae (27).

4.1.2 *Morfología colonial.* La morfología colonial observada en la cepa de S. aureus FRI-100 cultivada en BHI concordó con la que se informa en la literatura (cuadro 18) (73).

En agar Baird-Parker las colonias desarrolladas correspondieron a las observadas por Rayman y colaboradores (110): colonias de 1 mm de diámetro o mayores, de color negro brillante rodeadas por un halo claro que en ocasiones presentó precipitación debida a la reacción con la lipovitelina de la yema de huevo.

4.1.3 *Pruebas bioquímicas.* Los resultados obtenidos en las pruebas bioquímicas se presentan en el cuadro 19.

Prueba de termonucleasa y coagulasa. Al realizar la determinación de termonucleasa, S. aureus FRI-100 desarrolló un anillo de decoloración (blanco) alrededor de los pozos hechos en el agar base DNasa lo cual representó un resultado positivo a esta prueba.

La termonucleasa es una enzima extracelular producida por algunas especies del género Staphylococcus, capaz de hidrolizar los enlaces éster de fosfato del DNA. Es termoestable y resistente a altas concentraciones de cloruro de sodio (67).

La detección de termonucleasa en alimentos generalmente se acepta como indicativo de que el producto contiene al menos de 0.5 a 1.0 x 10⁶ células de S. aureus por gramo y puede representar un riesgo para la salud (99).

Por su parte, la prueba de coagulasa dió resultado positivo; S. aureus fue capaz de transformar el fibrinógeno del plasma en fibrina mediante la enzima coagulasa y formar un coágulo visible.

Esta prueba permite diferenciar de manera específica a la especie S. aureus que la da positiva de la S. epidermis que no coagula el plasma (47)(102).

Existen informes que refieren una alta relación entre las producciones de coagulasa y termonucleasa con la síntesis de enterotoxina por S. aureus, por lo que actualmente se utilizan ambas pruebas en conjunto para la identificación de cepas enterotoxigénicas (76)(77).

Durante mucho tiempo la determinación de coagulasa era el criterio más ampliamente usado para identificar cepas de S. aureus productoras de enterotoxina, sin embargo la coagulasa es inactivada ante procesos térmicos y el microorganismo después de la aplicación de calor pierde su capacidad de producir esta enzima. Además, se han aislado algunas cepas enterotoxigénicas coagulasa negativa, termonucleasa positiva (37)(98).

Lachica (76), publicó un estudio en el que confirma que la prueba de termonucleasa presenta una mayor correlación con la producción de enterotoxina que la prueba de coagulasa. Por otra parte, se ha demostrado que las condiciones que pueden alterar la

producción de nucleasa termoestable, tienen efectos similares sobre las enterotoxinas estafilocócicas (74).

Prueba de catalasa. Es otra enzima producida por S. aureus que tiene la habilidad de descomponer la molécula de peróxido de hidrógeno liberando oxígeno y por tanto formando burbujas. Su identificación se utiliza en la diferenciación de colonias de estafilococos (catalasa positiva) y estreptococos (catalasa negativa) (73).

Fermentación de azúcares. En la presente investigación se utilizaron los azúcares: lactosa, glucosa, sacarosa y manitol, dando en todos los casos resultados positivos (cuadro 19).

La fermentación de carbohidratos juega un papel muy importante en la caracterización de S. aureus; se ha establecido que cada microorganismo tiene la capacidad de fermentar un determinado hidrato de carbono en un medio básico, lo que permite determinar modelos de fermentación para una especie específica (81).

S. aureus tiene la capacidad de producir ácido en forma aeróbica a partir de glucosa, sacarosa y lactosa, función que se detecta por el virre del indicador rojo de fenol a amarillo. Por otra parte, la fermentación de manitol es una prueba altamente selectiva para la confirmación de cepas patógenas de S. aureus (87).

Cuadro 18. MORFOLOGIA COLONIAL DE *S. aureus* FRI-100.

CARACTERISTICA	RESULTADO
Medio de crecimiento	Agar BHI
Tamaño	2 - 3 mm
Color	Amarillento
Consistencia	Cremosa
Borde	Entero
Aspecto	Húmedo
Elevación	Convexa
Luz transmitada	Opaca
Luz reflejada	Brillante
Superficie	Lisa

Cuadro 19. CARACTERISTICAS BIOQUIMICAS DE *S. aureus* FRI-100.

PRUEBA	RESPUESTA
<i>Termonucleasa</i>	+
<i>Coagulasa</i>	+
<i>Catalasa</i>	+
<i>Lactosa</i>	Producción de ácido
<i>Sacarosa</i>	Producción de ácido
<i>Glucosa</i>	Producción de ácido
<i>Manitol</i>	Producción de ácido
<i>Voges-Proskauer</i>	+
<i>Motilidad</i>	-

Reacción de Voges-Proskauer. Mediante esta prueba se determina la capacidad que tiene un microorganismo de sintetizar acetil metilcarbinol (acetoina). Un color rojo rosado desarrollado en la superficie del medio indica presencia de acetoina y por lo tanto la positividad de la prueba (81). La cepa de *S. aureus* FRI-100 analizada presentó esta característica.

Motilidad. Como se puede observar en el cuadro 19, la cepa en estudio dió en esta prueba un resultado negativo con acentuado crecimiento sobre la línea de siembra. Cabe señalar que esta prueba determina si un microorganismo tiene flagelos para poder movilizarse. *S. aureus* es una bacteria que carece de este organelo (81).

4.1.4 Producción y detección de enterotoxina A. Producción.- Para la producción de enterotoxina A por la cepa de *S. aureus* FRI-100 se empleó la técnica de celofán, mediante la cual es posible sintetizar cantidades significativas del metabolito (26). El microorganismo al sembrarse para tal fin, se encontraba en fase logarítmica de crecimiento ya que se ha demostrado que la mayor síntesis de enterotoxina se produce durante la transición de ésta a la fase estacionaria (91).

La selección de este método para producir la enterotoxina A se basó en los resultados obtenidos por Robbins y colaboradores (114) acerca de la superioridad que esta técnica presenta para la síntesis de toxinas A, D y E sobre otras.

Se observó que el agar EHI que se utilizó contuvo los

nutrimentos necesarios para permitir la producción de enterotoxina a niveles mayores a 1 μg .

Las enterotoxinas son cadenas simples de proteínas con un peso molecular de 26,000 a 29,000 D, característica que ayudó en su extracción a través de la imposibilidad para traspasar los tubos de diálisis empleados. Estos últimos presentan uniformidad en sus poros e impermeabilidad a moléculas con pesos mayores a 12,000 D, no muestran interferencia con los compuestos y son de fácil adquisición (114).

Por lo anterior, al lavar la membrana con la solución amortiguadora pudo recuperarse casi la totalidad de la enterotoxina presente (86).

Identificación.- La confirmación de enterotoxina A producida por S. aureus FRI-100, se efectuó mediante el método de Reversed Passive Latex Agglutination (RPLA) descrito con anterioridad. La reacción inmunológica entre la enterotoxina A y la antitoxina específica fue positiva, evidenciándose mediante la aglutinación del látex en el fondo de los pozos.

En esta prueba, el grado de aglutinación que se obtiene después de un período de incubación de 20 a 24 h en cámara húmeda es proporcional a la cantidad de toxina colocada en el pozo, por lo que se considera una prueba semicuantitativa. Para una mayor apreciación de la aglutinación formada, se recomienda que la placa se observe con la ayuda de un espejo.

Debido a que es una prueba de apreciación visual, es recomendable poner especial cuidado en que las diluciones se

hagan con una micropipeta para obtener la cantidad exacta de cada una de las sustancias utilizadas en esta determinación y que los resultados sean confiables.

Los antisueros usados en los métodos serológicos para la identificación de enterotoxinas son aislados generalmente de animales de laboratorio como conejos (37).

4.2 Curva de Crecimiento.

Para determinar la curva de crecimiento, se utilizaron los métodos de vaciado en placa y espectrofotométrico a una longitud de onda de 600 nm. Este último permite conocer la concentración de las partículas suspendidas en un líquido en relación con el grado de luz que absorben, por lo que la absorbancia en un momento determinado se debe tanto a células vivas como muertas (26). Por lo anterior estos recuentos se relacionan con los obtenidos por el método de vaciado en placa, los que indican el número de unidades formadoras de colonias por mililitro.

En la curva de crecimiento obtenida para *S. aureus* FRI-100 se pueden observar 3 fases características (figura 12):

Fase lag o de retardo. Se observó aproximadamente durante las 2.5 primeras horas después de haber inoculado *S. aureus* al medio. En esta etapa el desarrollo del microorganismo es muy bajo debido a que necesita de un cierto tiempo para la adaptación al nuevo entorno (47).

La duración de la fase de latencia está directamente relacionada con el tamaño del inóculo efectivo. En el transcurso

de ésta, las células viables acumulan enzimas, coenzimas difusibles e intermediarios esenciales para la síntesis de sustancia celular (39).

Existen ciertos factores que pueden prolongar indefinidamente esta fase como la aereación vigorosa, al impedir la acumulación de pequeñas cantidades de CO₂ que son esenciales para el crecimiento del organismo; la presencia de sustancias antibacterianas, así como colorantes.

Fase log o fase exponencial. Es la etapa de máximo desarrollo de un cultivo bacteriano, durante ésta las células se replican a una proporción constante, presentando una situación prácticamente estable. La población se encuentra realizando una actividad metabólica que favorece su multiplicación fisiológica (47)(86).

La tasa de crecimiento está determinada por ciertos factores. Estos pueden ser intrínsecos al potencial fisiológico de la célula (capacidad de transporte de nutrimentos a través de la membrana) o extrínsecos (factores ambientales).

La fase exponencial, en la curva de crecimiento de *S. aureus* FRI-100, se presentó de las 2.5 a las 10 h de incubación. Esta etapa se seleccionó como la adecuada para la realización del estudio, debido principalmente a que constituye una fase de desarrollo durante la cual las células son más uniformes y además en la que la tasa de producción de entrotoxina es la más elevada (86)(102). Es en esta fase cuando las células se encuentran con su mayor actividad metabólica y por tanto presenta enormes diferencias funcionales y estructurales con respecto a otras

etapas de crecimiento (27)(39)(73).

Fase estacionaria. Durante las últimas dos horas de la curva 10 a 12 h, se observó cierto freno en el desarrollo del microorganismo. El final de la fase de crecimiento máximo está marcado por este descenso en la tasa de división celular y aunque no se detiene por completo, las células empiezan a morir y las divisiones no son capaces de contrarrestar estas muertes, de manera que el número de microorganismos viables permanece constante durante cierto tiempo (39)(47).

La disminución en la tasa de división celular puede deberse a múltiples factores: descenso de nutrientes esenciales, disminución del sustrato oxidable para la producción de energía o difusión deficiente del oxígeno cuando la densidad celular es elevada. Por otro lado, puede haber una acumulación de productos metabólicos tóxicos o inhibidores del crecimiento tales como ácidos orgánicos (47)(102).

La fase de declinación o muerte no se observa en la curva de crecimiento de S. aureus FRI-100 debido a que además de no ser de interés para este estudio, el método espectrofotométrico no permite la identificación de células muertas y sólo se contaría con los datos de vaciado en placa. En este periodo, las bacterias mueren rápidamente en forma exponencial debido a los mismos factores que afectan la división celular en la etapa anterior (102).

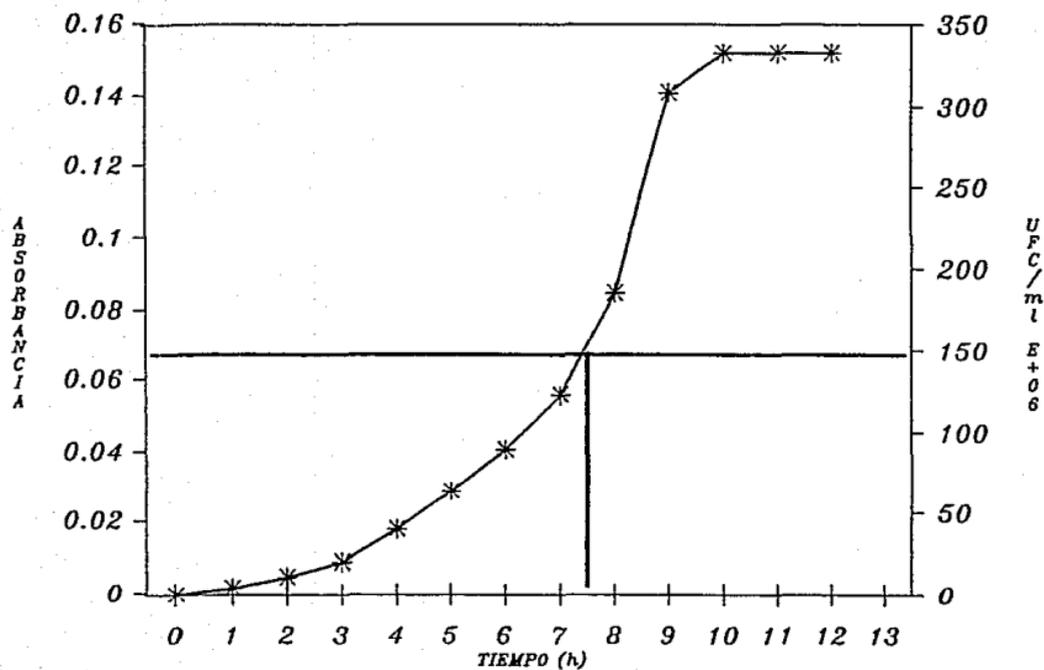


Figura. 12 CURVA DE CRECIMIENTO
DE S.aureus FRI-100

4.3 Estandarización del Inóculo.

Con la finalidad de conocer el número promedio de células a inocular en la leche destinada a la elaboración del yogurt, éste se estandarizó en el período de fase logarítmica de S. aureus. Mediante los métodos espectrofotométrico y de vaciado en placa se pudo determinar que 7 a 7.5 h de incubación de la resiembra del microorganismo cultivado por 18-24 h a 37°C eran necesarias para obtener una cuenta celular aproximada de 1.5×10^8 UFC/ml.

Para estandarizar el inóculo de S. aureus dañado, se emplearon los mismos métodos que en el caso anterior. El inóculo inicial utilizado fue el doble aproximadamente debido a la destrucción de células que hubo durante la aplicación del tratamiento térmico.

4.4 Análisis Microbiológico de la Leche en Polvo.

A pesar de que la leche cruda constituye un excelente medio de cultivo para el desarrollo de microorganismos patógenos como S. aureus entre otros, los procesos térmicos que involucra la producción de leche en polvo destruyen gran parte de la flora microbiana propia del alimento y presumiblemente también las bacterias patógenas. Para la detección de S. aureus en la leche entera en polvo utilizada para elaborar el yogurt y la descremada para la resiembra de cultivos lácticos, se utilizó la técnica de Van Doorne (105)(145).

Se decidió emplear esta técnica además de la recomendada por la Norma Oficial debido a que estudios realizados en el Instituto

Politécnico Nacional mostraron la existencia de cantidades importantes de cepas entotoxigénicas de S. aureus en leches en polvo nacionales y de importación. La técnica de Van Doorne permite determinar la presencia de células dañadas por procesos industriales. Cabe señalar que este tipo de células son incapaces de crecer en medios selectivos, sin un enriquecimiento previo (105)(145).

Al aplicar las técnicas mencionadas no se detectó la presencia de S. aureus en las leches empleadas, "nido" y "sveltes". En relación a mesofílicos aerobios se obtuvieron cuentas de 100 a 130 UFC/g de alimento; con respecto a coliformes y Salmonella, no se registró presencia alguna de ellos en ningún tipo de leche.

4.5 Tratamiento Térmico de S. aureus.

Los tratamientos térmicos aplicados a S. aureus se llevaron a cabo mediante la técnica de tubo capilar utilizando una temperatura de 72°C y tiempos de 0 a 30 s. Con los datos obtenidos se pudieron calcular los porcentajes promedio de células viables, destruidas y dañadas (cuadro 20).

Cabe mencionar que la cuantificación de los microorganismos sobrevivientes denominados células viables se realizó en AST, medio no selectivo que asegura tanto el desarrollo de células sin daño como las que sufren lesiones térmicas. Se ha informado que dependiendo de la magnitud del daño que sufren las células sus funciones reproductivas y/o metabólicas se ven afectadas, de tal

forma que los métodos comúnmente empleados para la detección cualitativa y cuantitativa de *S. aureus* pueden arrojar resultados falsos (53)(59). Además se ha demostrado que uno de los efectos del calor sobre las células dañadas en forma subletal es la pérdida de iones magnesio hacia el medio, lo que provoca una disminución en su halotolerancia; por esta razón el porcentaje de células dañadas térmicamente fue estimado por diferencia entre la cuenta de colonias desarrolladas en AST y AST con 12% de NaCl (30)(59)(128).

La figura 13 muestra los porcentajes de células destruidas al calentar la leche a 72°C por 30 s. En ésta se puede observar una tendencia a la destrucción de microorganismos viables con respecto a la magnitud del tratamiento, variando el porcentaje de células destruidas de 98.9% a los 5 s. hasta 99.2% a los 30 s., no habiéndose logrado la inactivación total del cultivo.

Estos resultados concuerdan con lo informado por Walker y colaboradores (149), quienes encontraron que la destrucción total de *S. aureus* en leche entera se logra sólo después de haber aplicado una temperatura de 72°C por 45 min. Por otro lado, se ha comprobado la existencia de cierto efecto protector sobre los microorganismos por parte de los componentes del medio de suspensión, siendo en el caso de la leche debido principalmente a proteínas, grasa y sales minerales (128)(136).

El calor aplicado a los microorganismos puede causar además la desnaturalización de proteínas, ruptura de la estructura del DNA y daños a la membrana citoplasmática (12). La degradación del

DNA y desnaturalización de proteínas implicadas en la respiración están relacionadas directamente con la muerte celular (119).

Los porcentajes de células dañadas obtenidas en la población sobreviviente de cada tratamiento térmico aplicado, mostraron que 25 s. de exposición fueron suficientes para provocar la mayor proporción de daño (38.65%). En forma general, se observó un comportamiento en el que a tiempos que provocan porcentajes de daño elevado, siguen etapas en las que existe una mayor destrucción celular y por lo tanto se registra un menor número de células dañadas (figura 14). Este fenómeno puede ser debido a la vulnerabilidad que estas células presentan a tratamientos subsecuentes, lo cual ha sido estudiado y descrito por Bucker y colaboradores (30), quienes resaltan como factores de importancia en este tipo de lesión: "las bacterias sometidas a tratamientos térmicos subletales presentan daños reparables y se convierten en organismos hipersensibles ante tipos de estrés subsecuentes". Por tal razón, la enumeración de células dañadas no puede realizarse de manera confiable mediante la utilización de un medio selectivo.

Las células dañadas disminuyen su capacidad metabólica presentando un decremento de las enzimas y desnaturalización parcial de las enzimas y proteínas celulares (12). A pesar de esto, se ha informado la recuperación de los microorganismos en su crecimiento y metabolismo incluyendo la producción de enterotoxina al ser transferidos a un medio con aminoácidos, glucosa y minerales como fosfatos y magnesio (55)(62)(119).

**Cuadro 20. RESULTADOS OBTENIDOS DEL TRATAMIENTO TERMICO
DE *S. aureus* A 72°C.**

TIEMPO	% CELULAS			
(s)	VIABLES	DESTRUIDAS	DANADAS	SIN DANAR
0	100	0	0	100
5	1.1	98.9	11.71	88.29
10	0.86	99.14	18.85	81.15
15	0.98	99.02	8.87	91.13
20	1.3	98.7	24.12	75.88
25	0.82	99.18	38.65	61.35
30	0.78	99.22	19.99	80.01

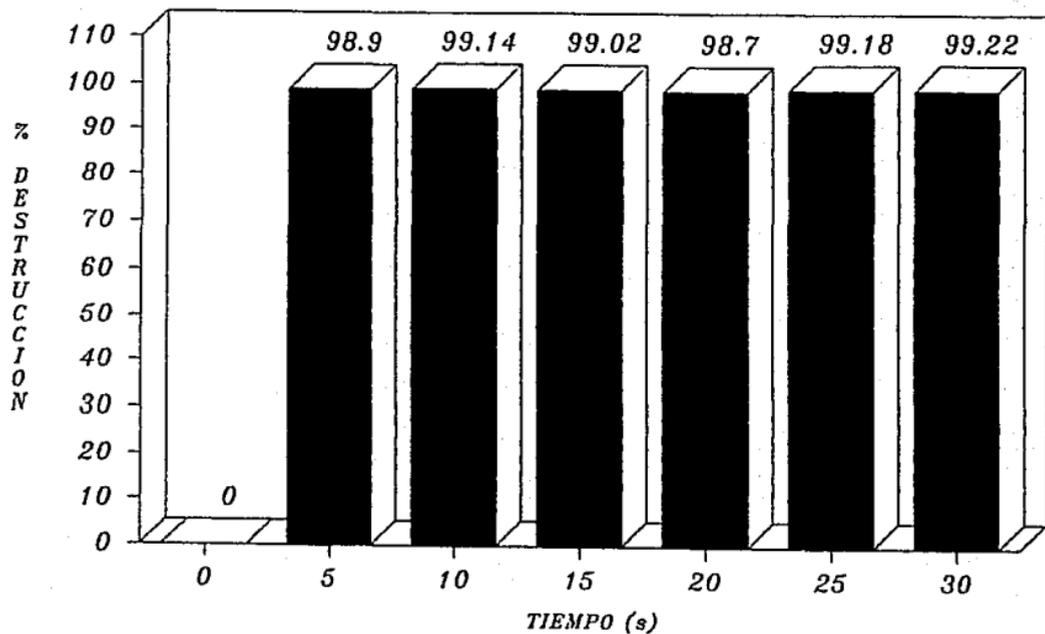


Figura 13. PORCENTAJE DE
DESTRUCCION DE S.aureus FRI-100
A 72°C.

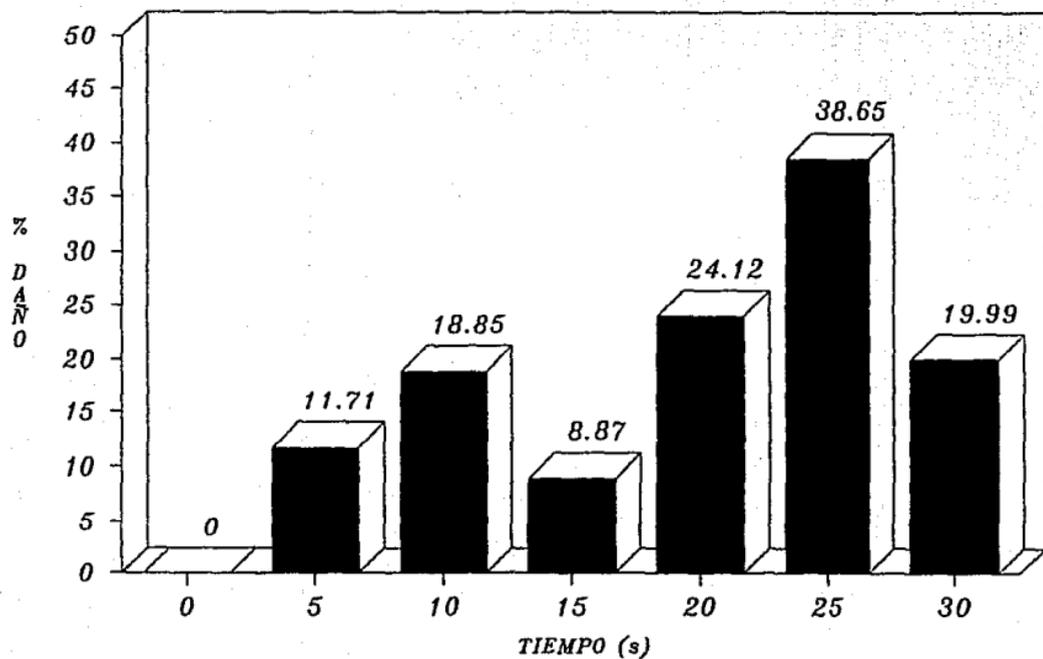


Figura. 14 PORCENTAJE DE DAÑO SUBLETAL
EN S.aureus FRI-100 a 72°C.

4.6 Selección de Medios de Cultivo para Recuento y Aislamiento de los Cultivos Lácticos.

Los resultados obtenidos al utilizar los agares de Lee y MRS para la identificación y recuento de *S. thermophilus* y *L. bulgaricus* respectivamente, coincidieron con los informados en la literatura (cuadro 14) (29).

Lee y colaboradores (78), desarrollaron un medio para la cuantificación diferencial de bacterias iniciadoras de yogurt que se basa en la fermentación de carbohidratos por varios bacilos y cocos. Observaron que teniendo una apropiada combinación de sacarosa y lactosa, la producción de ácido por *S. thermophilus* es estimulada, mientras que *L. bulgaricus* sólo aprovecha una mínima cantidad de este segundo carbohidrato, lo que ocasiona que su producción de ácido se vea restringida. Por lo anterior, la concentración de lactosa se ajusta de forma que se favorezca la formación de colonias de este microorganismo en el agar. El medio MRS en cambio, contiene glucosa en lugar de lactosa y sacarosa, azúcar que metaboliza fácilmente *L. bulgaricus* permitiendo su desarrollo (5).

Para la detección visual de la fermentación, al agar de Lee se le adiciona púrpura de bromocresol. Además se le agrega carbonato de calcio para prevenir la difusión del ácido por todo el medio de cultivo y localizarlo únicamente alrededor de cada colonia que lo produce (29)(96).

Debido a que durante la elaboración del yogurt se inoculó *S. aureus*, se decidió emplear un agar selectivo para cada uno de los

tres microorganismos involucrados en el proceso. Se observó que en el agar de Lee existían interferencias para el desarrollo óptimo de las colonias de L. bulgaricus, presumiblemente ocasionados por la presencia de S. aureus por lo que se utilizó el agar MRS que es especial para su desarrollo (133).

Se observó que tanto los cultivos lácticos, como S. aureus tenían la capacidad de desarrollarse en el agar de Lee y que cuando este último se encontraba presente, la morfología colonial de S. thermophilus y L. bulgaricus se veía alterada. Esto puede deberse probablemente a que existe cierta competitividad entre los tres microorganismos por los nutrimentos del medio (78).

Al cosechar únicamente los cultivos lácticos en el agar de Lee, ambos microorganismos presentaron colonias típicas: S. thermophilus formó colonias amarillo fuerte con un halo de decoloración a su alrededor, redondas, irregulares y cóncavas; L. bulgaricus, desarrolló colonias redondas de color blanco a beige, irregulares y húmedas (29). Cuando S. aureus se encontró presente las colonias observadas cambiaron por completo, siendo en el primer caso colonias verdes, acerradas y sin halo de clarificación; L. bulgaricus por su parte formó acúmulos de colonias amarillo claro, de 6 a 7 mm de diámetro e irregulares. S. aureus presentó una morfología muy similar a la de S. thermophilus e incluso creció sobre éstas. Es probable que la competencia entre los tres microorganismos por el medio de cultivo pueda haber interferido en su desarrollo (96)(113).

4.7 Análisis del Yogurt Durante el Proceso.

A lo largo del proceso de elaboración de yogurt, se realizó el seguimiento de dos microorganismos involucrados en su fabricación y de S. aureus. Su aislamiento y cuantificación se efectuó en los tiempos de proceso especificados con anterioridad, 0, 30, 90, 150, 210 y 330 min; se tomaron tres muestras y se sembraron en cada uno de los agares específicos para observar el crecimiento de los tres organismos por separado. Al cabo del período de incubación se leyó la morfología colonial de cada uno de estos, la cual en los tres casos correspondió a la informada en la literatura, descritas anteriormente (78)(110). Los resultados obtenidos de cada uno de los agares se indicaron como UFC/ml de cada microorganismo, posteriormente se graficaron para observar el desarrollo de S. thermophilus, L. bulgaricus y S. aureus durante el proceso (figuras 15 y 16).

Con objeto de conocer las variantes en el comportamiento de los cultivos lácticos ante la presencia de S. aureus, previamente se corrió un blanco, es decir se elaboró yogurt unicamente con inóculo de S. thermophilus y L. bulgaricus (figura 17).

Se determinó acidez y pH de los tres lotes de yogurt fabricados a los mismos tiempos de proceso y los resultados se tabularon en las respectivas gráficas.

Al elaborar yogurt con los cultivos lácticos e inóculo de S. aureus sin daño térmico, en este último se observó durante los primeros 30 minutos de incubación, una disminución severa en su número debido a que la temperatura de incubación del yogurt 45°C,

rebasa el límite máximo para su crecimiento. A partir de este tiempo S. aureus mostró un incremento en su población de aproximadamente 1 ciclo logarítmico, ocasionado probablemente por las propiedades termoprotectoras de los componentes de la leche (128). Hurst y colaboradores (59), informaron que la presencia de algunos solutos en los alimentos contaminados con S. aureus permitieron su desarrollo a temperaturas superiores al máximo valor en que crece. Lo anterior coincide con lo observado en relación a una ligera recuperación de S. aureus durante las siguientes 2 horas. A partir de este punto, cuando ya se había alcanzado una acidez de aproximadamente 40°D en el yogurt, se observó un efecto inhibitorio en el crecimiento del organismo que continuó paralelamente al aumento de acidez, la que se triplicó a las 5.5 horas de incubación (figura 15).

S. aureus con daño (72°C/25 s), mostró el mismo comportamiento inicial que en el caso anterior. En esta ocasión no hubo evidencia de recuperación alguna ya que al daño adicional hay que sumar la acidez presente, de tal forma que hubo un efecto combinado que provocó la disminución de la población durante el proceso (figura 16). Cabe resaltar que se inocularon células dañadas que al ser sometidas a condiciones adversas subsecuentes incrementaron su hipersensibilidad (30).

Al determinar la acidez producida por el cultivo de L. bulgaricus y S. thermophilus se tuvieron los siguientes valores: a los 30 min. de incubación, 36.7°D; a los 90 min., 37°D; a los 150 min., 41.4°D; a los 210 min., 78.9°D y por último a los 330

min. se alcanzó la acidez deseada de 120°D. Cuando se elaboró yogurt inoculando S. aureus con daño subletal, se observó el mismo comportamiento en la producción de acidez; en cambio cuando se incluyó en la fabricación S. aureus sin daño, la producción fue tardía, por ejemplo a los 210 min. tuvo un valor de 56.4°D en comparación con 78.9°D (figuras 15 y 16). Pudiese esto interpretarse como un efecto competitivo entre los cultivos lácticos y S. aureus. Si bien no existe una competencia drástica, si se modifica la producción de ácido, la que aumenta considerablemente hasta que S. aureus se encuentra inhibido (cuadro 21).

4.8 Semicuantificación de Enterotoxina A.

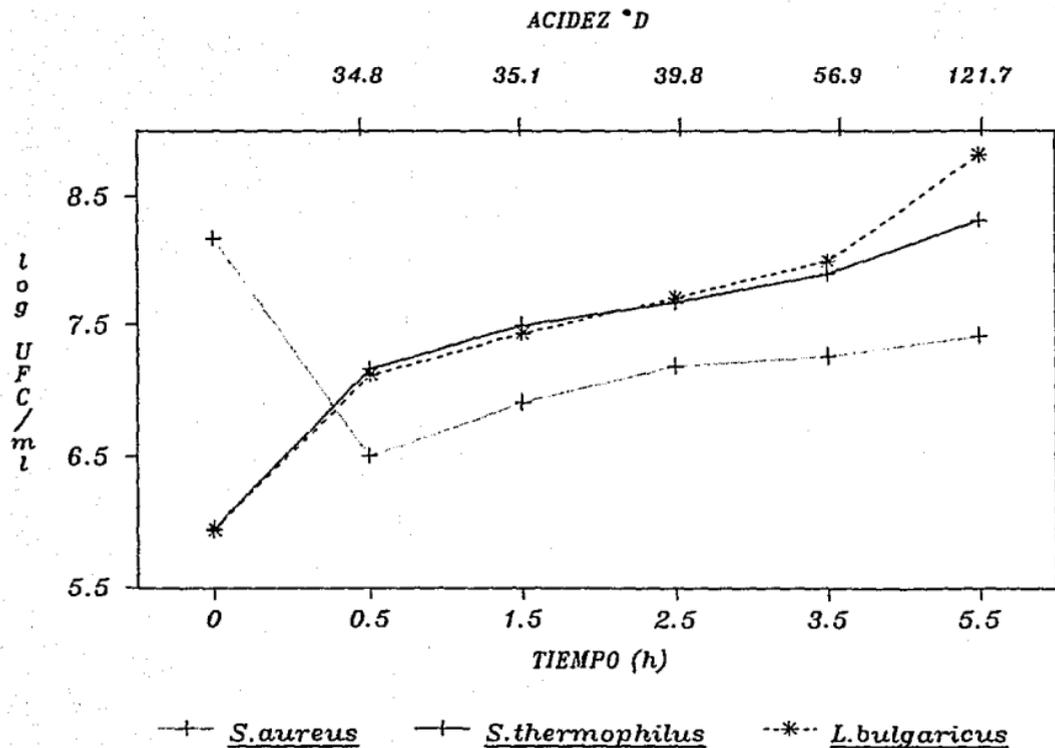
Se realizó mediante el método de RPLA descrito anteriormente. Se observó que en el yogurt en el que se incluyó S. aureus con daño térmico subletal, la concentración de toxina determinada a las 24 h no varió después de 7 días de almacenamiento a 4°C, debido a que al final de la manufactura del yogurt las cuentas de S. aureus se redujeron en un 99.71%. Por el contrario, cuando se utilizó S. aureus sin daño la reducción en la población fue de 82.3% y la concentración de toxina aumentó ligeramente después de 7 días de refrigeración (cuadros 22 y 23). Se ha informado que el daño por acidez sobre este microorganismo no se incrementa cuando es sometido a temperaturas de refrigeración debido a que su metabolismo se ve disminuido (130).

Cuadro 21. CINETICA DE MICROORGANISMOS EN YOGURT

Tiempo (h)	Yogurt 1			Yogurt 2		
	<u>S.aureus</u>	<u>S.thermophilus</u>	<u>L.bulgaricus</u>	<u>S.aureus</u>	<u>S.thermophilus</u>	<u>L.bulgaricus</u>
0	150×10^6	90×10^4	89×10^4	150×10^8	90×10^4	89×10^4
0.5	38×10^6	152×10^5	138×10^6	210×10^4	158×10^6	147×10^6
1.5	85×10^6	32×10^6	280×10^6	94×10^4	45×10^6	39×10^6
2.5	159×10^6	48×10^6	52×10^6	78×10^4	69×10^6	84×10^6
3.5	190×10^6	79×10^6	99×10^6	53×10^4	109×10^6	133×10^6
5.5	265×10^6	210×10^6	65×10^7	43×10^4	45×10^6	99×10^7

Yogurt 1: S.aureus sin dano

Yogurt 2: S.aureus con dano



*Figura 15. COMPORTAMIENTO DE S.aureus
FRI-100 SIN DAÑO SUBLETAL EN YOGURT*

ACIDEZ °D

25.3

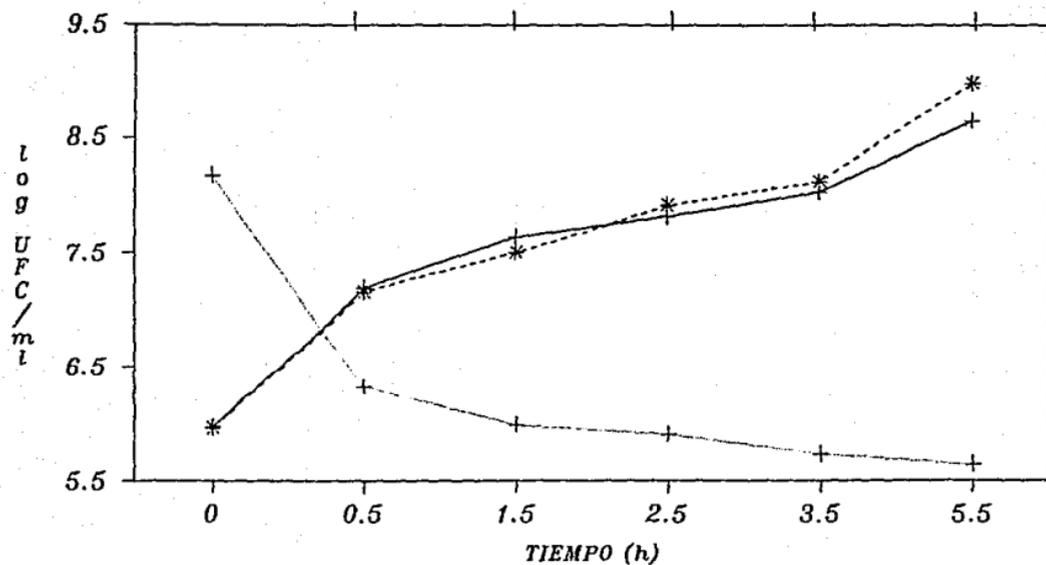
38.1

47.2

80.6

125.3

131



+ S.aureus

+ S.thermophilus

-*- L.bulgaricus

Figura 16. COMPORTAMIENTO DE S.aureus
FRI-100 CON DAÑO SUBLETAL EN YOGURT

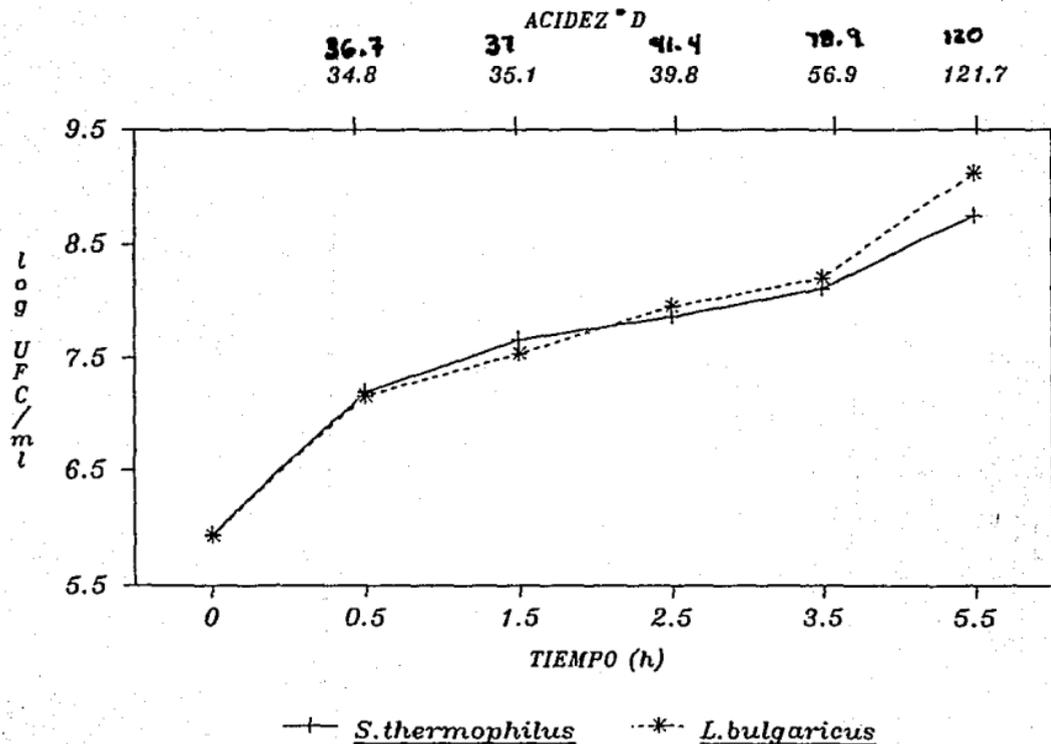


Figura 17. COMPORTAMIENTO DE CULTIVOS LACTICOS EN YOGURT.

**Cuadro 22. PORCENTAJE DE DESTRUCCION DE S.aureus
DURANTE LA ELABORACION DE YOGURT.**

<u>S. aureus</u> SIN DAÑO		<u>S. aureus</u> DAÑADO	
TIEMPO (h)	% DESTRUCCION	TIEMPO (h)	% DESTRUCCION
0	--	0	--
0.5	97.5	0.5	98.5
1.5	92.8	1.5	99.1
2.5	85.4	2.5	99.4
3.5	83.3	3.5	99.6
5.5	82.3	5.5	99.7

Cuadro 23. DETECCION DE ENTEROTOXINA A EN YOGURT POR RPLA.

	UFC/ml		Apreciación Visual		Rangos relacionados (ng/ml)	
	<u>S.aureus</u> sin daño	<u>S.aureus</u> dañado	<u>S.aureus</u> sin daño	<u>S.aureus</u> dañado	<u>S.aureus</u> sin daño	<u>S.aureus</u> dañado
Producto terminado	265×10^5	43×10^4	+	+	0.12 - 0.91	0.12 - 0.91
7 días de almacenado (4 C)	45×10^6	55×10^4	++	+	0.975-3.59	0.12 - 0.91

C A P I T U L O V

CAPITULO V

CONCLUSIONES

1. Bajo condiciones de experimentación, siendo aplicables a procesos industriales, la producción de ácido por los cultivos lácticos se vió retardada en presencia de S. aureus inoculado sin daño térmico subletal.
2. S. aureus sometido a condiciones que ejercen daño, 45°C y acidez de 27 a 120°D durante 330 min., fue capaz de producir enterotoxina en un rango de 0.12 a 0.91 ng/ml de alimento, incrementándose su síntesis aún bajo condiciones de refrigeración a 4°C, 0.975 - 3.59 ng/ml de alimento, convirtiéndolo en una fuente de toxiinfección potencial.
3. S. aureus tratado térmicamente a 72°C durante 25 s. y posteriormente inoculado en el proceso de elaboración de yogurt, también mostró capacidad enterotoxigénica, aunque en este caso la producción del metabolito se mantuvo constante aún después del período de refrigeración, 0.12 - 0.91 ng/ml de alimento.

C A P I T U L O V I

CAPITULO VI

BIBLIOGRAFIA

1) AGUIRRE, M.E. 1989. "Elaboración de caseinato de sodio a partir de leche fresca apta para consumo humano y leche en polvo de importación desviada a alimentación animal". Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México.

2) AKPEMADO, K.M and BRACQUART, P.A. 1983. "Uptake of Branched-Chain Amino Acids by Streptococcus thermophilus". Appl. Environ. Microbiol. 45(1):136-140.

3) ALAIS, C. 1968. "Ciencia de la leche. Principios de la técnica lechera". 6a. edición. Ed. CECSA. México.

4) ALLWOOD, M.C. and RUSSELL, A.D. 1969. "Growth and Metabolic Activities of Heat Treated Staphylococcus aureus". J. Appl. Bact. 32:79-85.

5) AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. 1976. "Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods". 2nd. edition. American Public Health Association, Inc. Washington, D.C. USA.

6) AMIOT, J. 1991. "Ciencia y Tecnología de la Leche". Ed. Acribia, S. A. Zaragoza, España.

- 7) ANDREWS, D.M. 1987. "Microbiological Methods" J. Assoc. Off. Anal. Chem. 70(1):87.
- 8) ANGELOTTI, R., FOSTER, M.J. and LEWIS, K.H. 1961. "Time-Temperature effects on Salmonella and Staphylococci in Foods. I. Behavior in refrigerated foods". Am. J. Public Health. 51:76-83.
- 9) BAIRD-PARKER, A.C. 1962. "An Improved Diagnostic and Selective Medium for Isolating Coagulase Positive Staphylococci in Foods". J. Appl. Bacteriol. 25:12-19.
- 10) BAIRD-PARKER, A.C. 1974. "Family I: Micrococcaceae. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology". Ed. R.E. Buchanan and N.E. Giggns. 8th. edition. Williams, Co. Baltimore, USA.
- 11) BALLESTER, P. 1965. "Nuevas orientaciones en la fabricación de yogur". Revista Española de Lechería. Abril.
- 12) BANWART, G.J. 1979. "Basic Food Microbiology". AVI Publishing Company, Inc. Westport, Connecticut.
- 13) BATISH, V.K., GHODEKER, D.R., RANGANATHAN, B. 1978. "The thermostable deoxyribonuclease (DNase) test as a rapid screening method for the detection of staphylococcal enterotoxin in milk and milk products". Microbiol. Immunol. 22:437-441.
- 14) BEERENS, H., LUQUET, F.M. 1990. "Guía práctica para el análisis microbiológico de la leche y los productos lácteos". Ed. Acribia, S. A. Zaragoza, España.
- 15) BERGDOLL, M.S. 1962. "Chemistry and Detection of Staphylococcal Enterotoxin". Research Council of the American Meat Institute Foundation at the University of Chicago.
- 16) BERGDOLL, M.S. 1967. "Staphylococcal Toxins". In

"Biochemistry of Some Foodborne Microbial Toxins". MATELES, R.I., WOGAN, G.N. The MIT Press. Cambridge, Massachusetts and London, England.

17) BERGDOLL, M.S. 1970. "Enterotoxins". In "Microbial Toxins". Vol. III. MONTIE, T.C., KADIS, S., AJL, S.J. Academic Press. New, York.

18) BERGDOLL, M.S. 1972. "The Enterotoxins". In "The Staphylococci". Ed. J.O. Cohen Wiley Interscience. USA.

19) BERGDOLL, M.S. 1979. "Staphylococcal Intoxications" In Food-Borne Infections and Intoxications". Academic Press Inc.

20) BERGDOLL, M.S. 1991. "Staphylococcus aureus". J. Assoc. Off. Anal. Chem. 74(4):706-710.

21) BERGDOLL, M.S. 1990. "Analytical methods for Staphylococcus aureus". International J. Food Microbiol. 10:91-100.

22) BERGDOLL, M.S. 1990. "Staphylococcal Food Poisoning". In "Foodborne Diseases". Academic Press, Inc. New, York.

23) BERGDOLL, M.S. and BENNET, R.W. 1984. "Staphylococcal Enterotoxins". In "Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods". Ed. M.L. Speck. Am. Public Health Assoc. Washington, D.C.

24) BLUHM, L. and ORDAL, Z.L. 1969. "Effect of Sublethal heat on the metabolic activity of S. aureus". J. Bacteriol. 97:140-150.

25) BOLETIN DE INFORMACION OPORTUNA DEL SECTOR ALIMENTARIO. 1990. INEGI. No. 59.

26) BRADSHAW, L.J. 1985. "Microbiología de Laboratorio". Ed.

Manual Moderno, S. A. 3a. edición. México.

27) BROCK, T.D., SMITH, D.W., MADIGAN, M.T. 1987. "Microbiología". Ed. Prentice-Hall Hispanoamericana. 4a. edición. México.

28) BRYAN, F.L., FANELLI, M.J., RIEMANN, H. 1979. "Food Borne Infections and Intoxications". 2nd. edition. Academic Press, N.Y.

29) EUCHANAN, R.E. and GIBBONS, N.E. 1975. "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology". 8th. edition. Ed. Williams and Wilkins Co. Baltimore, USA.

30) BUCKER, E.R., MARTIN, G.P., ANDREWS, G.P., ORDAL, Z.J. 1971. "Effect of hydrogen peroxide and sodium chloride on enumeration of thermally stressed cells of Staphylococcus aureus". J. Food Protect. 42(12):961-964.

31) BULL, A.T. and MEADOW, P.M. 1978. "Companion to Microbiology. Selected Topics for further Study". Longman. London and New York.

32) CARPENTER, D.F. and SILVERMAN, G.J. 1974. "Staphylococcal Enterotoxin B and Nuclease Production under Controlled Dissolved Oxygen Conditions". Appl. Microbiol. 28:628-637.

33) COMPENDIUM OF METHODS FOR THE MICROBIOLOGICAL EXAMINATION OF FOODS. 1976. American Public Health Ass. A.P.H.A. USA.

34) CORDS, B.R. and TATINI, S.R. 1973. "Applicability of heat-stable deoxyribonuclease assay for assesment of staphylococcal growth and likely presence of enterotoxin in cheese". J. Dairy Sci. 56:1512-1519.

35) CORRY, J.E.L., ROBERTS, D., SKINNER, F.A. 1982. "Isolation

and identification methods for food poisoning organisms". The Society for Applied Bacteriology, Technical Series No. 17. Academic Press. U.S.A., Orlando, Flo.

36) CROSBY, N.T. 1981. In "Food Packaging Materials-Aspects of Analysis and Migration Contaminants". Applied Science Publishers Ltd. London, U.K.

37) CURSO INTERNACIONAL SOBRE ENTEROTOXINAS ESTAFILOCOCCICAS. 1991. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. Microbiología Sanitaria. IPN. México.

38) DAGUET, I. 1977. "Exámenes de Laboratorio Técnicos en Bacteriología". Tomo I: Aerobios. Ed. Jims. Barcelona, España.

39) DAVIS, B.D., DULBECCO, R., EINSEN, H.N., GINSBERG, H.S. 1980. "Microbiology". 3th. edition. Harper & Row, Publishers. Philadelphia.

40) DEMETER, K.J. 1969. "Lactobacteriología". Ed. Acribia. Zaragoza, España.

41) EL-BANNA, A.A. and HURST, A. 1983. "Survival in foods of Staphylococcus aureus grown under optimal and stressed conditions and the effect of some food preservatives". Can. J. Microbiol. 29:297-302.

42) FANG, C.S., POST, L.S., SOLBERG, M. 1985. "Antimicrobial Effect and Disappearance of Sodium Nitrite in Staphylococcus aureus Cultures". J. Food Sci. 50:1412-1416.

43) FEY, H., PFISTER, H., RUEGG, O. 1984. "Comparative Evaluation of Different Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Systems for the detection of Staphylococcal Enterotoxins A, B, C and D".

J. Clin. Microbiol. 19:34-38.

44) FIRSTENBERG-EDEN, R., ROSEN, B., MANNHEIM, C.H. 1977. "Death and Injury of *S. aureus* During Thermal Treatment of Milk". Can. J. Microbiol. 23:1034-1037.

45) FRAZIER, W.C. 1981. "Microbiología de los Alimentos". Ed. Acribia, S. A. Zaragoza, España.

46) FREED, R.C., EVERSON, M.L., REISER, R.F., BERGDOLL, M.S. 1982. "Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Detection of Staphylococcal Enterotoxins in Foods". Appl. Environ. Microbiol. 44(6):1349-1355.

47) FREEMAN, B.A. 1985. "Microbiología de Burrows". 22a. edición. Ed. Interamericana Mc.Graw-Hill. México.

48) JARCIA, B.T., RUIZ-ATIENZA, R.L., ESPEJO, D.M. 1986. "Microbiología sanitaria de los yogures, naturales y con sabores, de consumo en la provincia de Alicante". Alimentaria:39-42.

49) GENIGEORGIS, C., FODA, M.S., MANTIS, A., SADLER, W.W. 1971. "Effects of NaCl and pH on Enterotoxin C production". Appl. Microbiol. 21:862-866.

50) GILLILAND, E.S. and KIM, H.S. 1984. "Effect of Viable Starter Culture Bacteria in Yogurt on Lactose Utilization in Humans". J. Dairy Sci. 47(1):1-6.

51) GREENE, V.W., and JEZEKI, J.J. 1957. J. Dairy Sci. 40:1046-1050.

52) HARTMAN, G.H. and DRYDEN, L.P. 1974. In "Fundamentals of Dairy Chemistry". 2th. edition. WEBB, B.H., JOHNSON, A.H., ALFORD, J.A. AVI Publishing Co, Inc., Connecticut, USA.

53) HOBBS, B.C. and OLSON, J.C. 1971. "Symposium on the restoration of sublethally impaired bacterial cells in foods". *J. Milk Food Technol.* 34:548-552.

54) HOOVER, D.G., TATINI, S.R., MALTAIS, J.B. 1983. "Characterization of *Staphylococci*". *Appl. Environ. Microbiol.* 46(3):649-660.

55) HUGHES, A. and HURST, A. 1976. "Magnesium requirements of *S. aureus* after sublethal heating". *Can. J. Microbiol.* 22:1202-1205.

56) HURST, A., ASHTON, H., COLLINS-THOMPSON, D.L. 1974. "The effect of sublethal heating on *Staphylococcus aureus* at different physiological ages". *Can. J. Microbiol.* 20:765-768.

57) HURST, A., HENDRY, G.S., HUGHES, A.A., PALEY, B. 1976. "Enumeration of Sublethally Heated *Staphylococci* in Some Dried Foods". *Can. J. Microbiol.* 22:677-683.

58) HURST, A. and HUGHES, A. 1983. "The protective effect of some food ingredients on *Staphylococcus aureus* MF31". *J. Appl. Bacteriol.* 55:81-88.

59) HURST, A., HUGHES, A., COLLINS-THOMPSON, D.L., SHAH, B.G. 1974. "Relationship between loss of magnesium and loss of salt tolerance after sublethal heating of *Staphylococcus aureus*". *Can. J. Microbiol.* 20:1153-1158.

60) HURST, A., HUGHES, A., PONTEFRAC, R. 1980. "Mechanism of temperature protective effect of salts on *Staphylococcus aureus*". *Can. J. Microbiol.* 26:511-517.

61) HURST, A., OFORI, E., VISHNUEHATLA, I., KATES, M. 1984.

"Adaptational changes in Staphylococcus aureus MF31 grown above its maximum growth temperature when protected by sodium chloride: lipid studies". *Can. J. Microbiol.* 30:1424-1427.

62) IANDALO, J.J. and ORDAL, E.J. 1966. "Repair of Thermal Injury of S. aureus". *J. Bacteriol.* 91(1):134-142.

63) IDZIAK, E.S., MOSSEL, A.A. 1980. "Numeration of Vital and Thermally Stressed Staphylococcus aureus in Foods Using Baird-Parker Pig Plasma Agar (BPP)". *J. Appl. Bacteriol.* 48:101-113.

64) INSTITUTO NACIONAL DE LA LECHE Y COMISION NACIONAL PARA EL FOMENTO DE LA PRODUCCION Y EL APROVECHAMIENTO DE LA LECHE, A.C. 1991. *Comunicación Personal.*

65) JACKSON, H. 1974. "Loss of Viability and Metabolic Injury of Staphylococcus aureus Resulting from the Storage at 5°C". *J. Appl. Bacteriol.* 37:59-64.

66) JACKSON, H. and WOODBINE, M. 1963. "The Effect of Sublethal Treatment on the Growth of Staphylococcus aureus". *J. Appl. Bacteriol.* 26(2):152-158.

67) JAY, J.M. 1981. "Microbiología Moderna de los Alimentos". 2a. edición. Ed. Acribia, S. A. Zaragoza, España.

68) JENSEN, P.J. and HAUSLER, J.R. 1976. "Contribution of KH_2PO_4 to Toxicity in Phosphate Buffered Dilution Water Systems". *J. Milk Food Technol.* 39(12):852-853.

69) JONES, C.L., SALEEM, A.K. 1986. "Nucleotide sequence of the Enterotoxin B Gene from S. aureus". *J. Bacteriol.* 166(1):29-33.

70) KATO, E., KHAN, M., KUJOVICH, L., BERGDOLL, M.S. 1966. "Production of Enterotoxin A". *Appl. Microbiol.* 14(6):966-972.

- 71) KEHAGIAS, C.H. and DALLES, T.N. 1984. "Bacteriological and Biochemical Characteristics of Various Types of Yogurt Made from Sheeps and Cow's Milk". *J. Food Protect.* 47(10):760-761.
- 72) KHALIL, H., VILLOTA, R. 1988. "Comparative Study on Injury and Recovery of Staphylococcus aureus using Microwaves and Conventional Heating". *J. Food Protect.* 51(3):181-186.
- 73) KONEMAN, E.W., ALLEN, S.D., DOWELL, V.R., SOMMERS, H.M. 1989. "Diagnóstico Microbiológico". Ed. Médica Panamericana. México.
- 74) KOUPAL, A. and DEIBEL, R.H. 1978. "Rapid Qualitative Method for Detecting Staphylococcal Nuclease in Foods". *Appl. Environ. Microbiol.* 35(6):1193-1197.
- 75) KUO, J.K., and SILVERMAN, G.J. 1980. "Application of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Detection of Staphylococcal Enterotoxins in Food". *J. Food Protect.* 43(5):404-407.
- 76) LACHICA, R.V.F. 1980. "Accelerated Procedure for the Enumeration and Identification of Food-Borne S. aureus". *Appl. Microbiol.* 29:17-19.
- 77) LACHICA, R.V.F., BARRY, A.L., ATCHINSON, F.W. 1973. "Identification of S. aureus by simultaneous use of tube coagulase and termonuclease test". *Appl. Microbiol.* 35:496-497.
- 78) LEE, S.Y., VEDAMUTHU, E.R., WASHAM, C.J., REINBOLD, G.W. 1974. "An agar Medium for the Differential Enumeration of Yogurt Starter Bacteria". *J. Milk Food Technol.* 37(5):272-276.
- 79) LILLY, H.D., McLEAN, R.A., ALFORD, J.A. 1967. "Effects of meat-curing salts and temperature on production of staphylococcal

enterotoxin B". *J. Bacteriol.* 95:1207-1211.

80) LOTTER, P.L. and GENIGEORGIS, C.A. 1975. "Deoxyribonucleic Acid Base Composition and Biochemical Properties of Certain Coagulase-Negative Enterotoxigenic Cocci". *Appl. Microbiol.* 29:152-158.

81) MaC. FADDIN, J.F. 1990. "Pruebas Bioquímicas para la Identificación de Bacterias de Importancia Clínica". Ed. Médica Panamericana. México.

82) MANUALES PARA LA EDUCACION AGROPECUARIA. 1990. "Elaboración de productos lácteos". Area: Industrias rurales. Ed. Trillas. México.

83) MARKUS, Z.H. and SILVERMAN, G.J. 1970. "Factors Affecting the Secretion of Staphylococcal Enterotoxin A". *Appl. Microbiol.* 20(3):492-496.

84) MATALON, M.E. and SANDINE, W.E. 1966. "Improved Media for Differentiation of Rods and Cocci in Yogurt". *J. of Dairy Sci.* 69(10):2569-2576.

85) MENDEZ, R.L.C. 1988. "Evaluación del medio de Agar de Lee para la determinación y cuantificación de Lactobacillus bulgaricus y Streptococcus thermophilus en Yoghurt". Tesis de Licenciatura. Universidad La Salle. México.

86) METZGER, J.F., JOHNSON, A.D., COLLINS, W.S., MCGANN, V. 1973. "S. aureus Enterotoxin B Release under Controlled Conditions of Fermentation" *Appl. Microbiol.* 25(5)770-773.

87) MINOR, T.E. and MARTH, E.H. 1971. "S. aureus and Staphylococcal Foods Intoxications. A Review". I. *J. Milk Food*

Technol. 34:557-564.

88) MINOR, T.E. and MARTH, E.H. 1972. "Loss of Viability by S. aureus in Acidified media. Inactivation by Several Acids, Mixture of acids and Salts of acids". J. Milk Food Technol. 35:191-196.

89) MOON, N.J. and REINBOLD, G.W. 1976. "Commensalism and Competition in Mixed Cultures of Lactobacillus bulgaricus and Streptococcus thermophilus". J. of Milk Food Technol. 39(5):337-341.

90) MORITA, T.N., PATTERSON, J.E., WOODBURN, M.J. 1979. "Magnesium and Iron addition to casein hydrolysate medium for production of Staphylococcal enterotoxins A, B and C". Appl. Environ. Microbiol. 38:39-42.

91) MORSE, S.A. and MAH, R.A. 1973. "Regulation of Staphylococcal Enterotoxin B Effect of Anaerobic Shock". Appl. Microbiol. 25(4):553-557.

92) NICKERSON, J.T., SINSKEY, A.J. 1980. "Microbiología de los alimentos y sus procesos de elaboración". Ed. Acribia, S. A. Zaragoza, España.

93) NISKANEN, A. and MAURI, A. 1977. "Comparison of Selective Media for Coagulase-Positive Enterotoxigenic S. aureus". Appl. Environ. Microbiol. 35(6):1233-1236.

94) NORMA OFICIAL MEXICANA. NOM F-444-1983. Alimentos - Yoghurt o Leche Búlgara. Especificaciones de Calidad.

95) NOTERMANS, S. and HEUVELMAN, C.J. 1983. "Combined effects of Water Activity, pH and sub-optimal Temperature of growth and Enterotoxin production of S. aureus". J. Food Sci. 48:1832-1840.

96) O'LEARY, V., and WOICHIK, J. 1976. "Utilization of Lactose, glucose and galactose by a Mixed Culture of Streptococcus thermophilus and Lactobacillus bulgaricus in Milk Treated with Lactase Enzyme". *Appl. Environ. Microbiol.* 32(1):89-94.

97) PAINE, F.A. 1967. In "Fundamentals of Packaging". Blackie & Son Ltd. London, U.K.

98) PARIZA, M.W. and IANDOLO, J.J. 1969. "Coagulase Production by Injured Staphylococcus aureus MF-31 During Recovery". *Appl. Microbiol.* 17(6):636-638.

99) PARK, C.E., EIDERE, H.B., RAYMON, M.K. 1978. "Evaluation of staphylococcal thermonuclease (TNase) assay as a means of screening foods of growth of staphylococci and possible enterotoxin production". *Can. J. Microbiol.* 24:1135-1139.

100) PARK, C.E. and SZABO, R. 1986. "Evaluation of the Reversed Passive Latex Agglutination (RPLA) Test Kits for Detection of Staphylococcal Enterotoxins A, B, C and D in Foods". *Can. J. Microbiol.* 32:723-726.

101) FEDERSON, C.S. 1979. "Microbiology of Food Fermentations". 2th. edition. Avi Publishing Co., Inc. Westport, Connecticut.

102) PELCZAR, M.J., REID, R.D., CHAN, E.C.S. 1990. "Microbiologia". Ed. Mc.Graw Hill. 4a. edición. México.

103) PELTIER, L.G. 1986. "Laboratory Manual of General Bacteriology". 1st. edition. John Wiley and Sons Inc. England.

104) PEREIRA, J.L, SALZBERG, S.P., BERGDOLL, M.S. 1982. "Effect of Temperature, pH and Sodium Chloride Concentration on Production of Staphylococcal Enterotoxins A and B". *J. of Food*

Protect. 45(14):1306-1309.

105) PEREZ GAVILAN, E.J. 1964. "Bioquímica y Microbiología de la Leche". Ed. Limusa. México.

106) PIATKIN, K., KRIVOSHEIN, Yu. 1989. "Microbiología". Ed. MIR. Moscú. URSS.

107) POUTREL, B and EUCELLIEZ, M. 1979. "Evaluation of three Rapid Tests for Identification of Staphylococcus aureus isolated in Bovine Milk". Ann. Rech. Vet. 10(1):125-129.

108) RAO, K.S., BATISH, V.K., GHODEKER, D.R. 1980. "Screening Kulfi for Staphylococcal Enterotoxins with Thermonuclease Test". J. Food Protect. 43(1):49-51.

109) RASIC, J.L. and KURMANN, J.A. 1978. "Yogurt: scientific grounds, technology and preparation". Technical dairy publishing house. Copenhagen.

110) RAYMAN, M.K., DEVEYOD, J.J., PURVIS, U., KUSCH, D., LANIER, J., GILBERT, R.J., TILL, D.G., JARVIS, G.A. 1978. "ICMSF. methods Studies. X. An International comparative study of four media for the enumeration of Staphylococcus aureus in foods". Can. J. Microbiol. 24:274-281.

111) READ, R.B. and BRADSHAW, J.G. 1966. "Thermal Inactivation of Staphylococcal Enterotoxin B in Veronal Buffer". Appl. Microbiol. 14:130-132.

112) REVILLA, A. 1985. "Tecnología de la Leche". Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. San José, Costa Rica.

113) ROBBINS, R. and BERGDOLL, M.S. 1983. "Production of Rabbit

Antisera to the Staphylococcal Enterotoxins". J. Food Protect. 47(3):172-176.

114) ROBBINS, R., GOULD, S., BERGDOLL, M. 1974. "Detecting the Enterotoxigenicity of Staphylococcus aureus Strains". Appl. Microbiol. 28(6):946-950.

115) ROBINSON, R.K. 1987. "Microbiología Lactológica". Vol. I y II. Ed. Acribia, S. A. Zaragoza, España.

116) ROMERO, E.M.C. 1988. "Aplicación del proceso de ultrafiltración a la fabricación de yogur". Alimentaria. Abril:33-70.

117) ROSE, A.H. 1983. "Food Microbiology". Economic Microbiology, Vol. 8. Academic Press. London.

118) ROSE, S.A., BANKES, P., STRINGER, M.F. 1989. "Detection of Staphylococcal Enterotoxins in Dairy Products by the Reversed-Passive Latex Agglutination (SET-RPLA) Kit". I. J. Food Microbiol. 8:65-72.

119) RUSELL, F.S. and MARTIN, S.E. 1980. "Ribosome assembly during recovery of heat-injured Staphylococcus aureus cells". J. Bacteriol. 141:645-651.

120) RUTZINSKI, J.L., MARTH, E.H. 1980. "Behavior of Enterobacter Species and Hafnia Species in Skimmilk During Fermentation by Lactic Acid Bacteria". J. Food Protect. 43(9):720-728.

121) SALINAS, R.J. 1986. "Evaluación de la calidad higiénica de yogures comerciales". Alimentaria. Diciembre:27-30.

122) SAMPLING FOR MICROBIOLOGICAL ANALYSIS. 1978. International

Commission on Microbiological Specification for Food (ICMSF). 2th. edition. Academic Press Ass. Toronto, Canada.

123) SALJI, P.J. and ISMAIL, A.A. 1983. "Effect of Initial Acidity of Plain Yogurt on Acidity Changes during Refrigerated Storage". *J. Food Sci.* 48:258-259.

124) SCHEUSNER, D.L. and HARMON, L.G. 1973. "Growth and Enterotoxin Production by various Strains of *S. aureus* in Selected Foods". *J. Food Sci.* 38:474-476.

125) SELLARS, R.L. and BABEL, F.J. 1970. "Cultures for the manufacture of dairy products". CHR. Hansen's Laboratory, Inc. Milwaukee, Wisconsin.

127) SINGH, J. and RANGANATHAN, B. 1978. "A comparison of the activity of *Lactobacillus bulgaricus* and one of its mutants in different types of milk". *J. of Dairy Research.* 45:123-125.

128) SMITH, J.L., BENEDICT, R.C., KALINOWSKI, S.M. 1985. "Solutes that protect *Staphylococcus aureus* against Heat-Induced Injury and their effect on cellular leakage". *J. Food Protect.* 48(7):600-602.

129) SMITH, J.L., BUCHANAN, R.L., PALUMBO, S.A. 1982. "Effect of Food Environment on Staphylococcal Enterotoxin Synthesis: A Review". *J. Food Protect.* 46(6):545-555.

130) SMITH, J.L. and PALUMBO, S.A. 1978. "Injury to *Staphylococcus aureus* During Sausage Fermentation". *Appl. Environ. Microbiol.* 36(6):857-860.

131) SOGIN, S.J. and ORDAL, Z.J. 1967. "Regeneration of ribosomal ribonucleic acid during repair of thermal injury to

Staphylococcus aureus". *J. Bacteriol.* 94:1082-1087.

132) SOKARI, T.G. and ANOZIE, S.O. 1989. "Modified Single Radial Immunodiffusion Method for Screening Staphylococcal Isolation for Enterotoxin". *Food Microbiol.* 6(1):45-48.

133) SPECK, M.L. and GEOFFRION, J.W. 1988. "Lactase and Starter Culture Survival in Heated and Frozen Yogurts". *J. Food. Protect.* 43(1):26-28.

134) STANLEY, E.G. 1986. "Bacterial Starter Cultures for Foods". CRC, Inc. BocaRaton, Flo. USA.

135) STILES, M.E. and CLARK, P.C. 1974. "The reliability of selective media for the enumeration of unheated and heated staphylococci". *Can. J. Microbiol.* 20:1735-1744.

136) STILES, M.E. and WRITTER, L.D. 1955. "Thermal Inactivation, Heat Injury and Recovery of Staphylococcus aureus". Division of Environmental Engineering and Food Protection, United States Public Health Service.

137) STOGARDS, T. 1964. "Heat treatment of milk prior to the addition of cultures". International Dairy Federation, Annual Bulletin III, Document 18.

138) SUGIYAMA, H. 1951. "Studies of Factors affecting the Heat Resistance of spores of C. botulinum". *J. Bacteriol.* 62:81-90.

139) TAMINE, A.Y. and DEETH, H.C. 1981. "Yogurth: Nutritive and Therapeutic Aspects". *J. Food Protect.* 44(1):78-86.

140) TAMINE, A.Y., ROBINSON, R.K. 1991. "Yogurt. Ciencia y Tecnologia". Ed. Acribia, S.A. Zaragoza, España.

141) TATINI, S.R., CORDS, S.R., GRAMOLI, J. 1976. "Screening for

Staphylococcal Enterotoxins in Foods". *J. Food Technol.* Abril:64-73.

142) TATINI, S.R., STEIN, S.A., SOO, H.M. 1976. "Influence of Protein Supplements on Growth of *S. aureus* and Production of Enterotoxins". *J. Food Sci.* 41:133-135.

143) THORN, G., ADAMS, R., BRAUNWALD, E., ISSELBACHER, K., PETERSDORF, R. 1990. "Harrison's Principles of Internal Medicine". 18th. edition. Mac. Graw-Hill Inc. Boston, Massachusetts. USA.

144) TROLLER, J. 1986. "Water activity of Food Borne Bacterial Pathogens". *J. Food Protect.* 49:656-670.

145) VAN DEN BERG, J.C.T. 1988. "Dairy Technology in the tropics and subtropics". Pudoc Wageningen. Netherlands.

146) VAN DOORNE, H., PAUWELS, H.P., MOSSEL, D.A.A. 1982. "Selective Isolation and Enumeration of Low Numbers of *Staphylococcus aureus* by a Procedure That Relies on Elevated-Temperature Culturing". *Appl. and Environ. Microbiol.* 44(6):1459-1462.

147) VEISSEYRE, R. 1988. "Lactologia Técnica". Ed. Acribia, S.A. 2a. edición. Zaragoza, España.

148) VICTOR, R., LACHICA, F., WEISS, K.L., DEIBEL, R.H. 1969. "Relationships Among Coagulase, Enterotoxin, and Heat-stable Deoxyribonuclease Production by *Staphylococcus aureus*". *Appl. Microbiol.* 18(1):126-127.

149) WALKER, G.C. and HARMON, L.G. 1966. "Thermal Resistance of *Staphylococcus aureus* in Milk, Whey, and Phosphate Buffer". *Appl. Microbiol.* 14(4):548-590.

150) WARNER, J.N. 1989. "Principios de la tecnología de lácteos". AGT Editor, S.A. México.

151) WEIR, D.M. 1985. "Handbook of Experimental Immunology". Vol. I y II. 4th. edition. Blackwell Scientific Publications. Oxford.