



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLÁN

EFECTO INHIBITORIO DE PROBIÓTICOS EN  
*Escherichia coli* AISLADA DE UN CASO CLÍNICO  
DURANTE LA VIDA ÚTIL DE YOGURT COMERCIAL

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
INGENIERA EN ALIMENTOS

PRESENTAN:

JACINTO PÉREZ MARISOL

MONROY GARCÍA MÓNICA

ASESOR: M. en C. MARÍA GUADALUPE AMAYA LEÓN

COASESOR: PhD SARA ESTHER VALDÉS MARTÍNEZ

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO 2014



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AVANZADA DE  
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN  
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR  
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

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

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

ATN: L.A. ARACELI HERRERA HERNÁNDEZ  
Jefa del Departamento de Exámenes  
Profesionales de la FES Cuautitlán.

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

Efecto inhibitorio de probióticos en *Escherichia coli* aislada de un caso clínico durante la vida útil de yogurt comercial

Que presenta la pasante: Marisol Jacinto Pérez

Con número de cuenta: 409015571 para obtener el Título de: Ingeniera en Alimentos

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

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 14 de enero de 2014.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	IBQ. Saturnino Maya Ramírez	
VOCAL	M. en C. María Guadalupe Amaya León	
SECRETARIO	IA. Ana María Soto Bautista	
1er. SUPLENTE	IA. Ana María Sabina de la Cruz Javier	
2do. SUPLENTE	IA. Zaira Berenice Guadarrama Álvarez	

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

HHA/lac



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AVANZADA DE  
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN  
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR  
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

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

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

ATN: L.A. ARACELI HERRERA HERNÁNDEZ  
Jefa del Departamento de Exámenes  
Profesionales de la FES Cuautitlán.

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

Efecto inhibitorio de probióticos en *Escherichia coli* aislada de un caso clínico durante la vida útil de yogurt comercial

Que presenta la pasante: Mónica Monroy García  
Con número de cuenta: 409018383 para obtener el Título de: Ingeniera en Alimentos

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

ATENTAMENTE  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"  
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 14 de Enero de 2014.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	IBQ. Saturnino Maya Ramirez	
VOCAL	M. en C. María Guadalupe Amaya León	
SECRETARIO	IA. Ana Maria Soto Bautista	
1er. SUPLENTE	IA. Ana María Sabina de la Cruz Javier	
2do. SUPLENTE	IA. Zaira Berenice Guadarrama Álvarez	

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

HHA/fac

## *Agradecimientos*

*A mis padres: Rosa María Pérez Ramírez y Eloy Jacinto Robles quienes con amor y paciencia me inculcaron desde pequeña los valores que me convirtieron en la persona que soy ahora, gracias por su apoyo incondicional y por su fe en mí porque siempre me impulsaron a seguir adelante y a tomar mis propias decisiones, inclusive en momentos difíciles. No encuentro palabras para decírles lo mucho que los amo y nunca terminare de agradecerles por todo lo que han hecho por mí, por aguantar mi rebeldía y múltiples locuras, por su esfuerzo y sacrificios para que nunca me faltara nada. Me llevo de ustedes los consejos, abrazos, besos y regaños que sirvieron para guiarme. LOS AMO.*

*A la Maestra María Guadalupe Amaya León y la Doctora Sara Esther Valdés Martínez por ser nuestras asesoras y sobre todo por su colaboración y experiencia que fueron fundamentales para el logro de éste proyecto, por su paciencia, confianza, buenos consejos, cuestionamientos y regaños que me sirvieron tanto en el ámbito académico como personal, ustedes me enseñaron a analizar las cosas y que lo que parece obvio no siempre es la respuesta. Gracias por estar allí inclusive horas extras y fines de semana apoyándonos en todo.*

*A Mony mi compañera de equipo gracias por todos los momentos que compartimos, por tu amistad, tu comprensión, tu compañía y por escucharme. Tú me ensañaste que ser amigo o trabajar con una persona con carácter y opiniones diferentes se convierte en el mejor complemento.*

*A Sergio y Ángeles que siempre fueron una gran ayuda y buenos amigos. Gracias por brindarnos su tiempo y hacer tantas horas de espera y trabajo divertidas. Pero sobre todo gracias por sus enseñanzas.*

*A mis amigos Nelly, Celene, Efra, Karen, Gerardo, Lucero, Lilo, Lupillo, Erick, Chucho, Jonathan, Jácome, Omar, Cesar y Valeria gracias por estar allí siempre, por creer en mí y por darme ánimos cuando sentía ganas de dejarlo todo, porque gracias a ustedes siempre recordare la universidad como la época más divertida donde encontré a los mejores amigos. Gracias por convertirse en mi familia SIEMPRE SERÁN MIS MANTOS LOS QUIERO.*

*MARISOL*

## *Agradecimientos*

*A mis padres, les estaré infinitamente agradecida por todo el amor que me han brindado a lo largo de mi vida, porque siempre han estado al pendiente mío, cuidándome y procurando que nunca me falte nada y tratar de siempre darme lo mejor, por enseñarme que no hay obstáculos pequeños y que todo con esfuerzo se puede lograr, por estar animándome, apoyándome y sobre todo por creer en mí. Gracias por aguantar mi mal humor cuando las cosas no salían o estaba estresada, pero a la vez pasar conmigo muchas alegrías. Muchas gracias por todo!!!, ya que sin ustedes no habría llegado hasta aquí. MARTHA Y ELIAS GRACIAS POR HABER HECHO DE MI LO QUE SOY. LOS AMO!!!*

*A mi hermano Daniel, gracias por siempre estarme atendiendo y soportar mis cambios de humor y gritos, por tu compañía, amor y ser mi confidente, gracias. Te amo papi!!*

*A la Maestra Guadalupe Amaya y a la Dra. Sara Esther Valdés quienes fueron mis asesoras de tesis, gracias por el apoyo, paciencia, la confianza brindada y por ser una guía científica, de quienes aprendí mucho a lo largo de la realización de este proyecto.*

*A mi equipo Mary, gracias por tu apoyo, comprensión, compañía, amistad y por todas las aventuras buenas y malas que pasamos mientras experimentábamos y escribíamos la tesis.*

*A mis amigos Vane, Carmen, Sun, Sergio, Luis, Paola, Ariana, gracias por sus consejos y hacer de la Universidad una de las mejores etapas de mi vida, por pasar momentos muy buenos, chistosos. Me dejan grandes recuerdos, aprendizajes y sobre todo gracias por ser los mejores amigos. Los quiero mucho. También le agradezco a Angeles con quien pase momentos buenos y malos y que me enseñó muchas cosas.*

*MÓNICA*

## CONTENIDO

<b>Abreviaturas</b>	<b>vi</b>
<b>Resumen</b>	<b>viii</b>
<b>Introducción</b>	<b>x</b>
<b>Capítulo I. Antecedentes</b>	<b>2</b>
1.1 Aspectos socioeconómicos	3
1.2 Composición química del yogurt	6
1.3 Clasificación del yogurt	8
1.4 Proceso de elaboración del yogurt	9
1.5 El yogurt como alimento funcional	13
1.6 Microorganismos responsables de la producción del yogurt	15
1.6.1 Cultivos iniciadores tradicionales	16
1.6.1.1 <i>Lactobacillus delbrueckii</i> spp. <i>bulgaricus</i>	17
1.6.1.2 <i>Streptococcus thermophilus</i>	17
1.6.2 Combinación de distintas cepas de BAL	18
1.6.2.1 Género <i>Lactobacillus</i>	20
1.6.2.1.1 <i>Lactobacillus johnsonii</i> La1	21
1.6.2.1.2 <i>Lactobacillus casei</i> Shirota	22
1.7 BAL como bioconservadores	23
1.7.1 Compuestos inhibitorios producidos por BAL	23
1.7.1.1 Ácidos orgánicos	24
1.7.1.2 Peróxido de hidrógeno	24
1.7.1.3 Dióxido de carbono	25
1.7.1.4 Diacetil y Acetaldehídos	25
1.7.1.5 Biocinas	26
1.8 Factores que influyen en el crecimiento y supervivencia de los microorganismos	28
1.9 Microbiología Predictiva	29
1.9.1. Modelos matemáticos utilizados para la Microbiología Predictiva	30
1.9.2. Inactivación microbiana (muerte no térmica)	32

1.10 Microorganismos indicadores de calidad sanitaria	37
1.10.1 <i>Escherichia coli</i> como indicador de calidad sanitaria	39
<b>Capítulo 2. Metodología</b>	<b>41</b>
Cuadro Metodológico	43
2.1 Materiales y Métodos	44
<b>Capítulo 3. Resultados y Análisis de Resultados</b>	<b>57</b>
<b>Conclusiones</b>	<b>96</b>
<b>Recomendaciones</b>	<b>99</b>
<b>Bibliografía</b>	<b>101</b>
<b>Anexos</b>	<b>113</b>



## ÍNDICE DE TABLAS

1. Especificaciones fisicoquímicas del yogurt.	7
2. Efectos saludables de los probióticos.	14
3. Especificaciones microbiológicas de cultivos iniciadores.	16
4. Características del <i>Lactobacillus delbrueckii</i> spp. <i>bulgaricus</i> .	17
5. Características del <i>Streptococcus salivarius</i> spp. <i>thermophilus</i> .	18
6. Principales software utilizados en la Microbiología Predictiva.	31
7. Aplicación de Modelos Matemáticos para la Inactivación bacteriana.	34
8. Especificaciones microbiológicas del yogurt.	39
9. Cultivos iniciadores para cada muestra de yogurt.	44
10. Condiciones establecidas para las determinaciones microbiológicas.	45
11. Determinaciones químicas realizadas a los yogurts.	46
12. Determinaciones fisicoquímicas realizadas a los tres yogurts.	47
13. Tabla de McFarland.	49
14. Condiciones de almacenamiento para las muestras de yogurt.	52
15. Parámetros cinéticos del Modelo de Double Weibull.	53
16. Condiciones de incubación para el conteo de BAL.	54
17. Resultados del análisis microbiológico a las tres muestras de yogurt comercial.	58
18. Resultados de los análisis fisicoquímicos contrastados con las especificaciones normativas.	62
19. Porcentajes de ART obtenidos a diferentes condiciones de hidrólisis.	66
20. Resultados del Análisis Químico Proximal y contrastación de los valores con la etiqueta de cada producto evaluado.	71
21. Porcentajes de sodio y calcio para los yogurts.	73
22. Ajuste de datos a 37°C para el modelo lineal.	76
23. Parámetros cinéticos de inhibición de <i>E. coli</i> .	81

## ÍNDICE DE FIGURAS

1. Principales países consumidores de yogurt.	3
2. Volumen de producción de yogurt en México durante enero de 2012 a marzo de 2013.	4
3. Diferentes tipos de yogurt consumidos en México.	5
4. Clasificación del yogurt.	8
5. Diagrama de flujo de la elaboración del yogurt.	12
6. Características de las cepas probióticas.	19
7. <i>Lactobacillus johnsonii</i> La1.	21
8. <i>Lactobacillus casei</i> Shirota.	22
9. Factores que afectan la composición del alimento.	28
10. Aplicación industrial de la Microbiología Predictiva.	30
11. Tipos de curvas de inactivación comúnmente observadas.	32
12. Diagrama basado en el modelo de supervivencia de Doble Weibull.	37
13. Propagación de la cepa <i>Escherichia coli</i> .	50
14. Colonias de <i>Escherichia coli</i> en agar rojo violeta bilis.	53
15. Medición del pH a las muestras inoculadas y testigos negativos.	54
16. Cuantificación de <i>Lactobacillus</i> en una muestra de yogurt.	57
17. Determinación de Coliformes totales incubados a 37°C durante 24 h.	59
18. Aislamiento de <i>Salmonella</i> en medios selectivos agar SB, SS y VB, incubado a 35°C por 24 h.	59
19. Aislamiento de <i>Staphylococcus aureus</i> en Agar Baird-Parker incubado a 35°C por 48 h.	60
20. Fase inicial de la reacción de Maillard.	67
21. Ajuste de las curvas de supervivencia de <i>E. coli</i> en los tres yogurts a 37°C.	75
22. Ajuste de las curvas de supervivencia de <i>E. coli</i> en los tres yogurts a 4°C.	78
23. Comparación de los valores de $\delta_2$ para los tres yogurts.	83

24. Verificación de la inhibición total de <i>E. coli</i> en Agar MacConkey para el yogurt A.	86
25. Comparación de la viabilidad de los cultivos lácticos ( <i>Lactobacillus casei</i> Shirota y <i>Streptococcus thermophilus</i> ) a las dos temperaturas de almacenamiento para el yogurt A.	88
26. Comparación de la viabilidad de los cultivos lácticos ( <i>Lactobacillus johnsonii</i> La1 y <i>Streptococcus thermophilus</i> ) a las dos temperaturas de almacenamiento para el yogurt B.	90
27. Comparación de la viabilidad de los cultivos lácticos ( <i>Lactobacillus delbrueckii</i> spp. <i>bulgaricus</i> y <i>Streptococcus thermophilus</i> ) a las dos temperaturas de almacenamiento para el yogurt C.	92

## ABREVIATURAS

Agar SB	Agar Sulfito de Bismuto
Agar SS	Agar Salmonella-Shigela
Agar VB	Agar Verde Brillante
AQP	Análisis Químico Proximal
ART	Azúcares Reductores Totales
BAL	Bacterias Ácido Lácticas
BHI	Infusión cerebro-corazón
BPM	Buenas Prácticas de Manufactura
FMVZ	Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
h	horas
$K_{máx}$	Velocidad máxima de muerte microbiana
La1	<i>Lactobacillus johnsonii</i>
LcS	<i>Lactobacillus casei</i> Shirota
Log ( $N_0$ )	Concentración inicial estimada por el modelo
Log (Nf) 37°C	Concentración final de BAL en la muestra inoculada a 37°C
Log (Nf) 4°C	Concentración final de BAL en la muestra inoculada a 4°C
Log ( $N_{inicial}$ )	Concentración inicial de BAL
Log TN 37°C	Concentración final de BAL en el Testigo Negativo a 37°C
Log TN 4°C	Concentración final de BAL en el Testigo Negativo a 4°C
mL	mililitro
NE	Valor no establecido por normatividad
p	Parámetro de forma

pH	Potencial de hidrógeno
RMSE	Raíz del Error Cuadrático Medio
SLNG	Sólidos Lácteos No Grasos
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
UFC/mL	Unidades Formadoras de Colonias por mililitro
$\alpha$	Tamaño de la primer subpoblación
$\delta_1$	Tiempo requerido para la primera reducción decimal en el primer subgrupo
$\delta_2$	Tiempo requerido para la primera reducción decimal en el segundo subgrupo
$\mu\text{g}$	Microgramo
$^{\circ}\text{Brix}$	Grados Brix

## RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto bioconservador *in vitro* en tres yogurts comerciales formulados con cultivos iniciadores diferentes, utilizando como indicador de calidad sanitaria una cepa de *Escherichia coli* aislada de un caso clínico de mastitis, del Departamento de Bacteriología y Micología de la FMVZ de la UNAM, bajo condiciones de refrigeración y temperatura óptima de crecimiento.

Se trabajó con tres yogurts comerciales con probióticos adicionados (*Lactobacillus casei* Shirota y *Lactobacillus johnsonii*) y sin probióticos como control (*Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus*), se les realizaron análisis microbiológicos y pruebas fisicoquímicas de acuerdo a la normatividad mexicana, posteriormente se inocularon con una concentración aproximada de  $10^8$  de *E. coli* y se almacenaron a dos distintas temperaturas, a 37°C (temperatura óptima de crecimiento) y a 4°C (temperatura de refrigeración) y se evaluó el efecto bactericida de las Bacterias Ácido Lácticas (BAL) y la influencia de la matriz del alimento sobre la inhibición de la cepa, en donde el comportamiento de supervivencia de ésta bacteria a 4°C fue ajustado a un modelo de Doble Weibull.

Los tres yogurts analizados cumplieron con las especificaciones microbiológicas establecidas por la norma mexicana al no encontrarse microorganismos patógenos, así mismo, también cumplieron con los límites máximos y mínimos marcados por la NOM-243-SSA1-2010 y la NOM-181-SCFI-2010 para el contenido de proteína, grasa, sólidos lácteos no grasos, pH y acidez. Sin embargo, para los valores reportados en su etiqueta, el yogurt B solo coincide en los porcentajes de grasa 1.3% y de cenizas 0.14%, el yogurt A solo en el contenido de grasa con 0.6%, mientras que el yogurt C difiere en todos los valores reportados por el fabricante con los obtenidos en el AQP.

El tiempo de inhibición de *E. coli* a 37°C se dio en un tiempo menor a las 8 horas de almacenamiento y fue ajustado a un modelo lineal, mientras que a 4°C el comportamiento inhibitorio del indicador siguió una distribución de Doble Weibull para los tres yogurts, siendo el yogurt A el medio menos inhibitorio al presentar el valor más alto de  $\delta_2=151.48$  h, y el yogurt B el más eficiente al inhibir la cepa bacteriana en 79 h.

La viabilidad de las BAL fue afectada principalmente por la temperatura y la matriz del alimento, mientras que la presencia de *E. coli* no tuvo un efecto significativo. La presencia de *Lactobacillus casei* Shirota y *Streptococcus thermophilus* en el yogurt A se mantuvo constante a 37 y 4°C; en el yogurt B *Streptococcus thermophilus* se redujo 3 ciclos logarítmicos aproximadamente ( $P \geq 0.05$ ) debido a las sustancias producidas por *Lactobacillus johnsonii* y para el yogurt C *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus* y *S. thermophilus* disminuyeron 3.5 y 4.3 Log UFC/mL a las dos temperaturas y únicamente para éste yogurt la presencia de *E. coli* tuvo un efecto significativo ( $P \geq 0.05$ ) en la reducción de las mismas.

## INTRODUCCIÓN

La calidad sanitaria de los alimentos es fundamental ya que influye en la conservación y la vida de anaquel de los mismos y, sobre todo, porque los microorganismos presentes en ellos, pueden ser causantes de enfermedades transmitidas por alimentos o ETA's <sup>6</sup>. Por lo anterior, la inocuidad de un alimento se establece determinando la presencia o ausencia de microorganismos.

Una herramienta que ayuda a evaluar la seguridad microbiológica de los alimentos es la Microbiología Predictiva, la cual permite describir y predecir por medio de modelos matemáticos la respuesta microbiana durante el almacenamiento y los factores que pueden afectar su crecimiento o supervivencia en el mismo. Los parámetros proporcionados por cada modelo también facilitan la comparación de distintos procesos tecnológicos para reducir poblaciones microbianas<sup>29</sup>. Las curvas que siguen los microorganismos durante su inhibición son variadas, siguiendo una cinética de primer orden cuando se trata de tratamiento térmicos<sup>56</sup>, sin embargo, cuando se trata de tratamientos no térmicos el comportamiento no es lineal presentando hombros o períodos de retraso, al igual que colas o subpoblaciones de bacterias más resistentes al tratamiento, existen diversos modelos que describen estos tipos de comportamiento<sup>1</sup>, siendo uno de ellos el modelo de Double Weibull, basados en la hipótesis de que existen dos subgrupos con diferentes resistencia en una misma población<sup>28</sup>.

Para predecir el comportamiento de los microorganismos en los alimentos generalmente se utilizan microorganismos indicadores que advierten oportunamente de un manejo inadecuado o contaminación que incrementan el riesgo de presencia de microorganismos patógenos en alimentos. Algunos de los microorganismos que se utilizan para este fin, se encuentran los coliformes, entre ellos *Escherichia coli*<sup>6</sup>.

*Escherichia coli* es un patógeno de gran interés industrial, por estar implicado en una serie de intoxicaciones alimentarias como resultado del consumo de alimentos contaminados por dicha bacteria. Se podría pensar que *E. coli* no crecería en



alimentos ácidos como los productos lácteos fermentados por su bajo pH y alta acidez, en cuyas condiciones no se desarrollaría, sin embargo, en las últimas décadas *E. coli* O157: H7 ha sido implicada en el consumo de alimentos ácidos tales como sidra de manzana, yogurt<sup>68</sup> o mayonesa<sup>111</sup>. Estos brotes sugieren que *E. coli* puede ser tolerante a las condiciones ácidas encontradas en el yogurt y se ha observado que puede permanecer viable hasta 1-8 días durante la refrigeración<sup>64</sup>.

Durante cientos de años las BAL han desempeñado un papel importante en la obtención y producción de la mayor parte de los alimentos fermentados que actualmente se consumen. Las BAL proporcionan características organolépticas y estructurales favorables a los productos y tienen la capacidad de inhibir el desarrollo de microorganismos no deseables, alterantes y patógenos, lo que sugiere la posibilidad de utilizarlos para extender la vida útil y mantener la calidad higiénica de los alimentos. Los efectos inhibitorios no sólo son el resultado de una acidificación del medio, también pueden ejercer diversos sistemas de inhibición microbiana por la producción de ácidos orgánicos, metabolitos del oxígeno, compuestos orgánicos, antibióticos y bacteriocinas<sup>91</sup>. Sin embargo, para que puedan permanecer viables dentro del yogurt, se requiere de la adición de algunos compuestos, como prebióticos (almidón y pectina), levaduras y de algunas sales<sup>34</sup>.

El objetivo del presente estudio fue comparar los efectos del yogurt sin probióticos adicionados y dos yogurts con probióticos (cepas diferentes de *Lactobacillus*), sobre la viabilidad de una cepa de *E. coli* aislada de un caso clínico (utilizada como un indicador de calidad), en condiciones in vitro a temperatura de refrigeración 4°C y a temperatura óptima de crecimiento 37°C, con el fin de determinar si existen diferencias importantes en lo que respecta a la reducción de la población bacteriana.

# **CAPÍTULO 1.**

## **ANTECEDENTES**



## 1. ANTECEDENTES

Según fuentes históricas, el yogurt tuvo su origen 2000 años a.C. en el Medio Oriente (Asia y Europa Central), sin embargo, los productos a los que se refiere en esa época son en realidad varias leches fermentadas en forma empírica<sup>48,114</sup> y espontánea que pronto empezaron a elaborarse de forma más sistemática pues, además de ser una forma de conservar durante más tiempo la leche, se les atribuían ciertas propiedades benéficas<sup>27,49</sup> como el alivio de desórdenes estomacales, intestinales y del hígado. Durante la primera mitad del siglo XX, el bacteriólogo ruso Elie Metchnikoff demostró los beneficios de algunas BAL en el tratamiento de las diarreas en lactantes y relacionó estos beneficios con la buena salud y la longevidad de los campesinos de los Balcanes quienes consumían frecuentemente un producto fermentado, a partir de leche, al cual le llamaban *Yahourth*, por este motivo, se consideró que dichas leches fermentadas fueron las precursoras de lo que hoy se conoce como Yogurt<sup>48</sup>. En 1917, Isaac Carasso comenzó a producir yogurts en Barcelona utilizando procedimientos industriales, que se vendían exclusivamente en farmacias<sup>97</sup>.

En la actualidad al existir una gran variedad de alimentos lácteos fermentados los organismos gubernamentales de cada país son obligados a regular dichos alimentos, estableciendo parámetros para garantizar la calidad y seguridad de los mismos.

En México, la NOM-181-SCFI-2010 Yogurt-Denominación, especificaciones fisicoquímicas y microbiológicas, información comercial y métodos de prueba, define al Yogurt como: “el producto obtenido de la fermentación de leche, estandarizada o no, por medio de la acción de microorganismos *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii* subespecie *bulgaricus*, y teniendo como resultado la reducción del pH”, siendo ésta norma que reglamenta la producción de yogurt. Establece además, las distintas denominaciones que se pueden utilizar para dicha definición, las cuales son: yogurt, yogur, yoghurt, yoghurth o yogurth. Para homogeneidad en este trabajo la denominación utilizada será yogurt.

## 1.1 Aspectos socioeconómicos

Actualmente, el yogurt es consumido tanto por niños como por adultos, por lo que se ha convertido en un producto importante dentro de los hogares.

Consistentemente con los esfuerzos de los consumidores para aumentar lo saludable en sus dietas, existe un mayor interés por el consumo de alimentos y bebidas funcionales que mejoran la salud del corazón, del tracto gastrointestinal, la función inmune y bienestar en general, junto con otros beneficios<sup>94</sup>.

Es por esto que la industria láctea ha desarrollado este producto en varias presentaciones, ya que si en los años 80's se contaba con el clásico yogurt batido y el tipo americano, en la actualidad hay en el mercado una amplia variedad tales como yogurt batido, light o descremado, vitaminados, con trozos de frutas, con cereales y aquellos con agregados que regulan el tránsito intestinal.

Firmas como Danone, reconocen que el consumo de yogurt en México va a la alza como se indica en la Figura 1.



Figura 1. Principales países consumidores de yogurt.

Fuente: ANTAD, 2012

Como se puede distinguir en la Figura 1 México es el quinto mercado más importante a nivel mundial, únicamente por debajo de Francia, Rusia, España y Estados Unidos de América. De acuerdo con un artículo publicado en el 2012 por la Asociación Nacional de Tiendas de Autoservicio y Departamentales (ANTAD) reportó que la venta de productos lácteos fermentados como el yogurt se disparará 50 por ciento en los próximos años a nivel mundial.

Dentro de la industria láctea se ha observado un crecimiento constante en la demanda del yogurt, este crecimiento fue originado a partir de la crisis económica del 2009 donde el aumento del consumo de éste producto fue de 7 a 9 kg per cápita en el país. En México las ventas de yogurt de cuchara, para beber y licuado crecieron 8% en valor de enero a diciembre del 2011, comparado con el mismo período de un año antes, según la Encuesta Mensual de la Industria Manufacturera del INEGI de aquel año citada por la ANTAD (2012). La Figura 2 muestra la situación mensual actual de la industria manufacturera del yogurt en México reportada por el INEGI en el Boletín de Información Oportuna del Sector Alimentario publicado en Abril de este año.

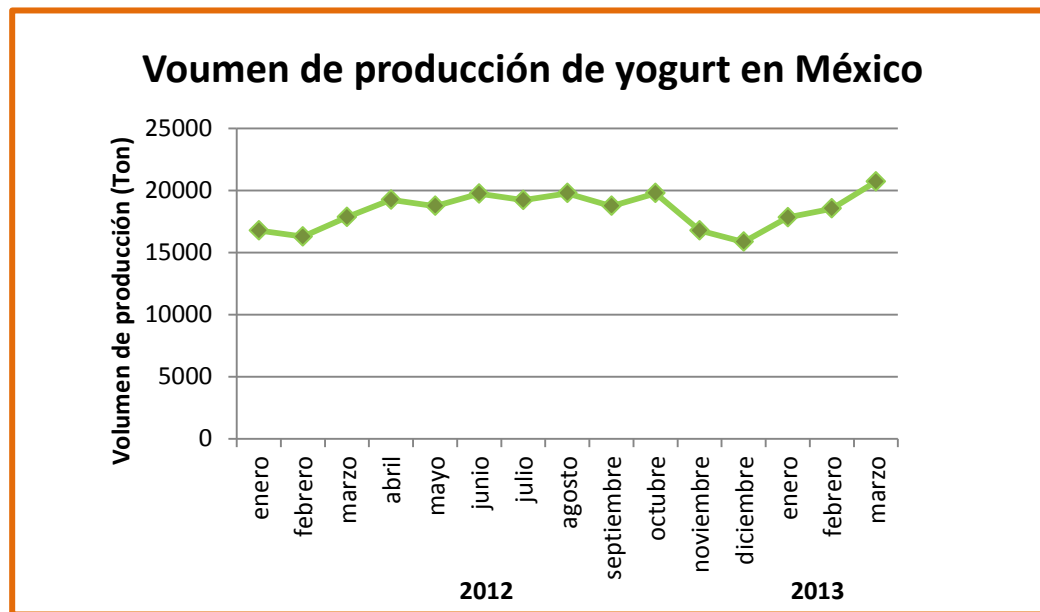


Figura 2. Volumen de producción de yogurt en México durante enero de 2012 a marzo de 2013.

Fuente: INEGI, 2013

De acuerdo con los datos recabados en la Figura 2, los niveles de producción entre enero del 2012 y febrero del 2013 se mantuvieron entre las 15 y 20 mil toneladas de yogurt al mes, reportándose un aumento constante en la producción desde diciembre del 2012 donde se registraron los niveles más bajos de producción, apenas superando las 15,000 toneladas hasta alcanzar su nivel más alto en marzo del 2013 al superar las 20,000 toneladas de producción, nivel que no había sido alcanzado en meses anteriores. Por lo que podemos decir que el comportamiento de los volúmenes de producción es consistente con el crecimiento pronosticado por la ANTAD para este sector.

En México la preferencia en el consumo de yogurt se divide principalmente en tres variedades, el bebible, de cuchara y los licuados. En la Figura 3 se muestran los porcentajes de consumo de éstas variedades de acuerdo a las preferencias del mercado registradas por la SAGARPA en los primeros meses (enero y febrero) del 2013.

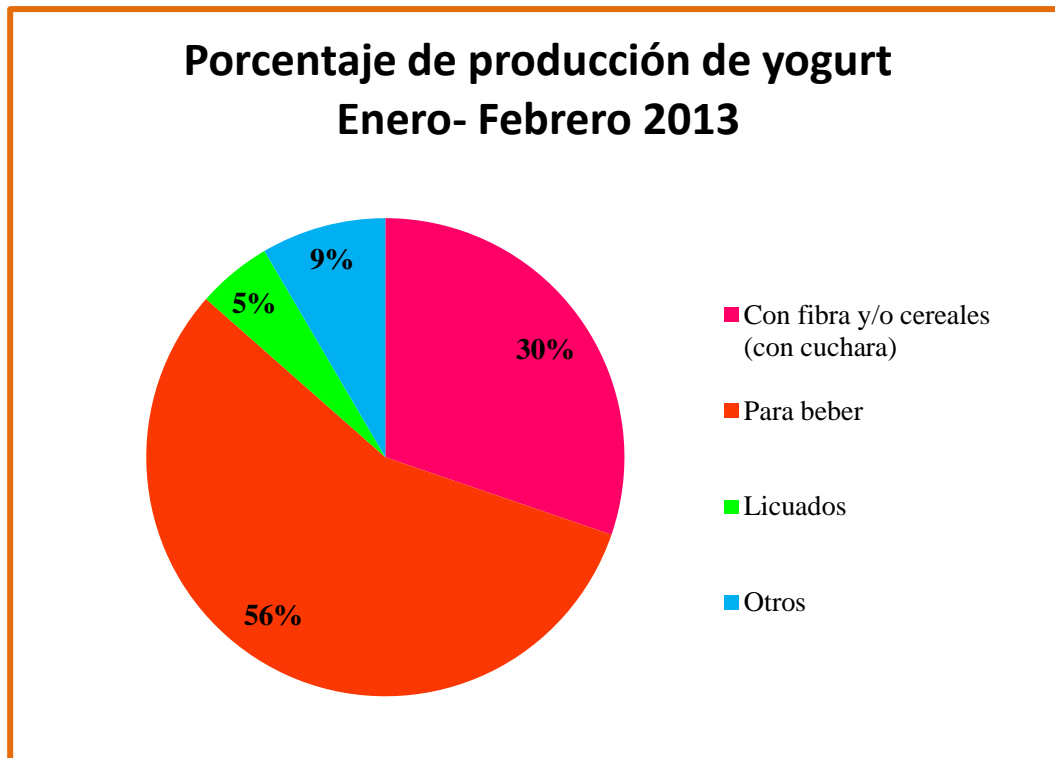


Figura 3. Diferentes tipos de yogurt consumidos en México.  
Fuente: SAGARPA, 2013.

Como se observa en la Figura 3 la mayoría de las ventas en México en el 2013 se concentraron en tres tipos de yogurt, siendo el más popular el yogurt bebible que alcanzó el 56% del total del consumo, seguido por el yogurt que se come con cuchara el cual alcanzó el 30% del total de las ventas, mientras que el tercer puesto fue ocupado por el yogurt tipo licuado con únicamente el 5%; el 9% restante fue ocupado por otros tipos de yogurts. Estos datos reportados por SAGARPA son consistentes por los recabados por ANTAD (2012) de la encuesta realizada por la consultoría Euromonitor a nivel mundial, que dice que el mayor generador de ingresos durante el 2011 fue el yogurt para beber con 14 mil millones de dólares, seguido por el que se come con cuchara en 11 mil 300 millones de dólares.

La popularidad que ha ganado el consumo de yogurt en México como lo reportó el INEGI alcanzó los 10 mil 782 millones de pesos en el 2011 de los cuales el 56% de acuerdo con la Figura 3, suman 6 mil 37 millones de pesos recaudados por las ventas de yogurts bebibles, 3 mil 243 millones de pesos (30% del total del consumo) fueron recaudados por la venta de yogurts de cuchara también conocidos como batidos y en tercer sitio el licuado con 539 millones de pesos (5% del total de las ventas). Si el crecimiento de este sector se mantiene constante como se espera, en los próximos años los niveles anuales de venta de yogurt superarán los 16 mil millones de pesos al año por lo que la industria láctea se ha enfocado en hacer innovaciones para ofrecer al consumidor una variedad cada vez más amplia que cubra las necesidades de cada persona.

## **1.2 Composición química del yogurt**

El valor nutritivo del yogurt depende de su composición y ésta a su vez, varía en función de tres aspectos primordiales<sup>89,109</sup>:

1. El tipo de leche que se utilice para su elaboración.
2. El tipo de yogurt, natural o con fruta, pues al contener fruta en su formulación implica un aumento en el contenido de carbohidratos.



3. De los cambios que ocurren durante la fermentación láctica, éstos cambios resultan con la reducción de la lactosa y la formación de ácido láctico, con un aumento de péptidos libres, aminoácidos y ácidos grasos.

De acuerdo con lo anterior el yogurt contiene proteínas, grasas y carbohidratos que son propios de la leche, y debe contenerlos en las cantidades correspondientes al tipo de leche con que se elabora. Por ejemplo, el yogurt elaborado con leche entera debe contener un mínimo de 2.5 por ciento de grasa láctea si es natural, para el caso de productos elaborados con leche parcialmente descremada, el porcentaje mínimo es de 1 por ciento. Si se elabora a partir de leche descremada, el yogurt natural debe contener un máximo de 0.5 por ciento de grasa láctea y 0.4 por ciento si tiene fruta.

Muchos yogurts se elaboran con leche descremada a la que se agregan crema o concentrados de leche, ocasionando que los contenidos grasos sean distintos a los de su leche de origen.

De acuerdo con la NOM-181-SCFI-2010 el Yogurt genérico debe cumplir con las siguientes especificaciones fisicoquímicas reportadas en la Tabla 1 para poder ser comercializado en el territorio nacional de acuerdo a la Secretaría de Comercio:

Tabla 1. Especificaciones fisicoquímicas del yogurt.

Especificación	Contenido	
	Mínimo	Máximo
Proteína Láctea (%m)	2.9 <sup>I,II</sup>	-----
Grasa Butírica (%)	-----	15
Acidez titulable expresada como porcentaje de Ácido Láctico (%)	0.5	-----
Sólidos Lácteos no grasos(%)	8.25	-----

<sup>I</sup>La relación de la caseína proteína láctea presente en el producto final debe ser al menos de 70% (m/m).

<sup>II</sup>La proporción de proteína láctea respecto a los sólidos lácteos no grasos totales contenidos en el yogurt, no debe disminuir respecto de la proporción de proteína láctea presente originalmente en la leche.

----- No especificado

Fuente: NOM-181-SCFI-2010



### 1.3 Clasificación del yogurt

Generalmente el yogurt y productos similares se clasifican en función de su estado físico, en el envase de venta, etc., sin embargo, no es la única clasificación, en la Figura 4 se muestran algunas de éstas que dependen de diversos factores.

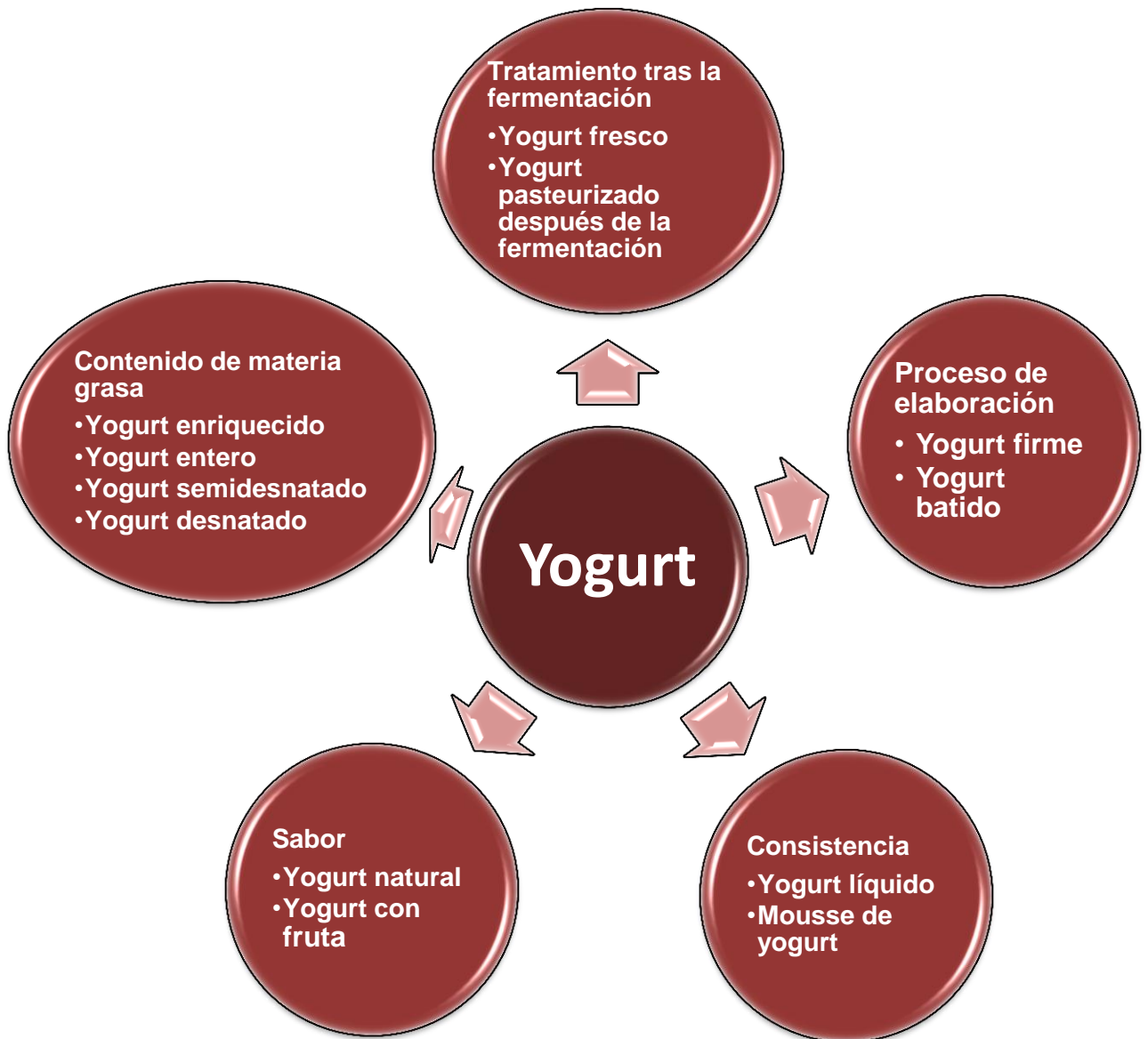


Figura 4. Clasificación del yogurt.

Fuente: Documentos Técnicos de Salud Pública, 2003

## 1.4 Proceso de elaboración del yogurt

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

El yogurt firme y el bebible son dos tipos de yogurt que difieren en el proceso de elaboración. En el yogurt firme, la leche inoculada con los microorganismos se debe empacar en los recipientes definitivos antes de que inicie la fermentación, es decir, la fermentación se lleva a cabo en el mismo recipiente en el que será distribuido el producto. Si se desea agregarle frutas, se adicionan en el fondo del envase antes de la leche. El yogurt bebible es producido en tanques de fermentación y se empaqueta una vez que las frutas o los saborizantes han sido mezclados con el yogurt<sup>109</sup>.

Los métodos de fabricación varían según la materia prima utilizada, el volumen de producción, la formulación del producto y el tipo de yogurt que se desea obtener, sin embargo, existen algunos principios básicos comunes, como son<sup>48</sup>:

1. *Tratamiento previo de la Leche.* En esta etapa se incluye:

1.1 Estandarización. Para aumentar el contenido de sólidos totales en la leche, primero es necesario estandarizar la cantidad de grasa. El contenido de grasa del yogurt debe ser alrededor de 0.5% en el caso del descremado, y de 2.5 % a 3.5%, en el caso del entero. Entre mayor sea su contenido de grasa, mayor será su viscosidad. Para elevar el contenido de sólidos totales actualmente se adiciona leche en polvo hasta alcanzar la concentración deseada, también se le adicionan algunos estabilizantes, que mejoran el cuerpo, la textura y la apariencia del yogurt, entre ellos se encuentra, el almidón, la carragenina, los alginatos y la pectina.

1.2 Homogenización. Consiste en someter la leche a altas presiones con el fin de disminuir el tamaño de las gotas de grasa y otros constituyentes y, así se dispersen mejor. El resultado es un yogurt más viscoso, más estable y con mejores características organolépticas.

## 2. *Pasteurización*

En esta etapa se elimina la mayor parte de la flora contenida en la leche, ésta disminución permite el crecimiento de los microorganismos productores del yogurt libres de competencia, con todos los nutrientes de la leche a su disposición. Las elevadas temperaturas de este proceso desnaturalizan las proteínas de la leche, con lo cual, se liberan péptidos como casoquininas, casoplatelinas, casecidas y lactoferrinas<sup>114</sup> que contribuyen al crecimiento de los microorganismos inoculados.

## 3. *Enfriamiento a temperatura de incubación*

Después de la pasteurización, la leche debe ser enfriada a temperatura óptima de crecimiento de los microorganismos, que oscila entre los 40°C y 45°C.

## 4. *Inoculación y Fermentación*

El cultivo iniciador se inocula en una proporción que oscila entre el 1% y 5% v/v de la cantidad de leche inicial que se utiliza. Se debe mezclar muy bien con la leche para asegurar una adecuada distribución de los microorganismos, en este momento, empieza el proceso de fermentación. La fermentación se realiza durante un promedio de tres a seis horas, a una temperatura entre los 40 y 45°C. El proceso se debe detener cuando se alcanza una concentración de ácido láctico entre 0.70 y 1.1% p/v, en este rango de concentración el valor del pH se encuentra entre 4.2 y 4.6.

## 5. *Enfriamiento posfermentación*

Cuando se alcanza la acidez deseada, se debe detener el proceso de fermentación. Para detenerlo se disminuye la temperatura, pues los microorganismos involucrados no son capaces de crecer a temperaturas inferiores a 10°C. La temperatura recomendada es la de refrigeración 4 ó 5°C.

#### 6. *Agitación y la adición de frutas*

Una vez que el yogurt se encuentra frío, se debe agitar para romper el coágulo. Para el caso del yogurt bebible en esta etapa del proceso dicho coágulo formado debe ser destruido por completo confiriendo así una textura lo suficientemente fluida para poder beberlo y bombearlo.

Durante esta etapa, se adiciona la fruta, previamente preparada en forma de trozos o puré. Las frutas deben recibir tratamiento térmico previo, ya que, de lo contrario, pueden ser fuente de hongos y levaduras que contaminarían el yogurt y disminuirán su vida útil.

#### 7. *Empaque*

Cuando el yogurt se ha enfriado, el producto se empaca. Los recipientes deben ser resistentes, impermeables y de un material que no reaccione con el producto para protegerlo de alteraciones físicas, químicas y de microorganismos alterantes y patógenos. Después de empacado, el yogurt debe conservarse en refrigeración con el fin de aumentar su vida útil, que se calcula sea de un mes.

El proceso de elaboración de yogurt comprende varias etapas y procesos térmicos que ayudan a la conformidad de la acidez y la textura del producto final para lo cual también es necesaria la adición de microorganismos especiales (cultivos iniciadores), estas etapas principales se representan mediante el diagrama de flujo que se presenta en la Figura 5.

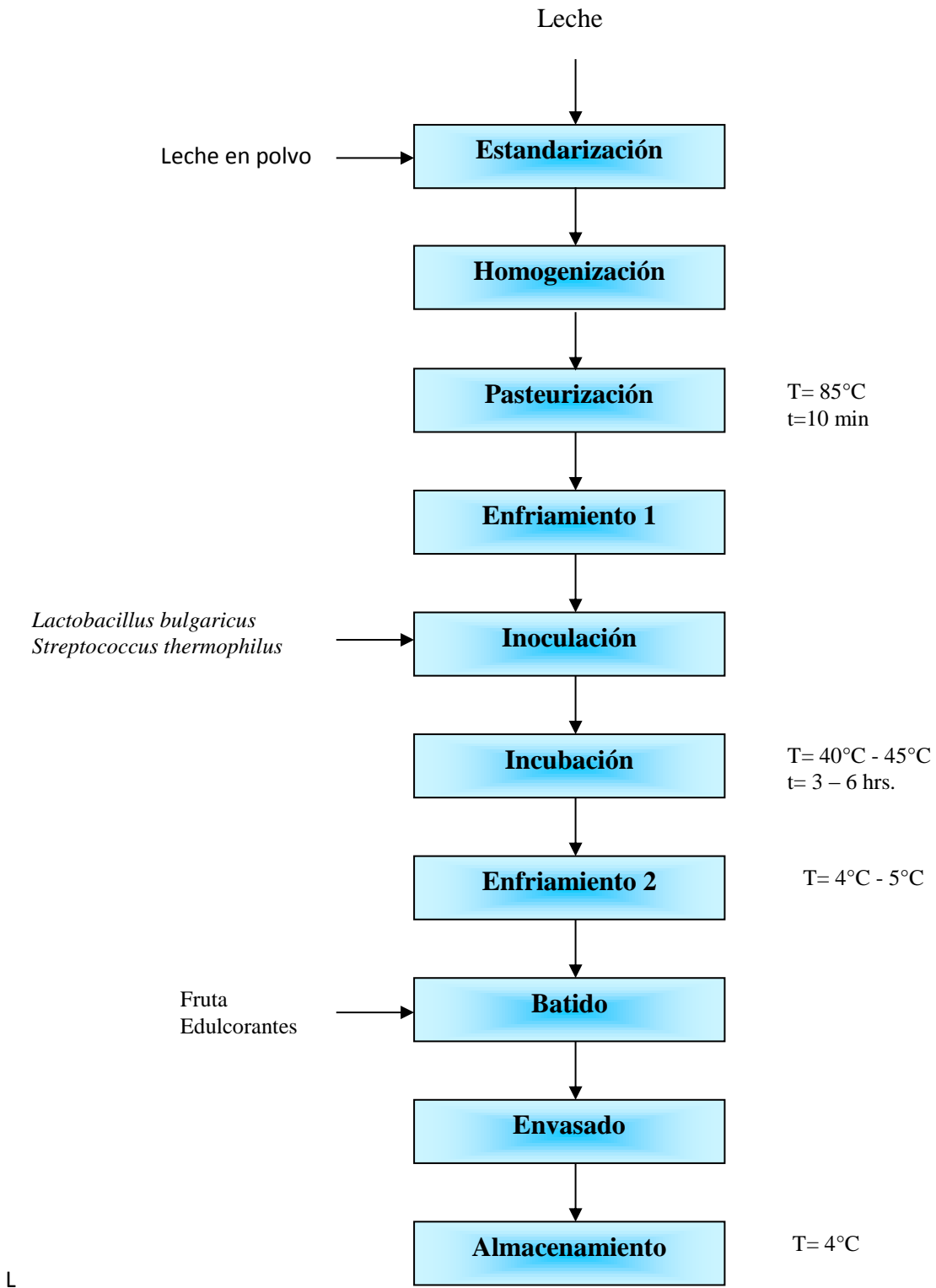


Figura 5. Diagrama de flujo de la elaboración del yogurt.

## 1.5 El yogurt como alimento funcional

Hace un siglo, Elie Metchnikoff (bacteriólogo ruso, premio Nobel, y profesor del Instituto Pasteur en París) postuló que las BAL ofrecían beneficios a la salud que llevaban a la longevidad. Sugirió que la “autointoxicación intestinal” y el envejecimiento resultante podrían suprimirse modificando la microbiota intestinal y utilizando bacterias útiles para sustituir a los microorganismos proteolíticos como *Clostridium*. Desarrolló entonces una dieta con leche fermentada por la bacteria, a la que denominó “bacilo búlgaro”.

En 1965 el término “probiótico” fue introducido por primera vez por Lilly y Stillwell; a diferencia de los antibióticos, se definió al probiótico como aquel factor de origen microbiológico que estimula el crecimiento de otros organismos. En 1989, Roy Fuller enfatizó el requisito de viabilidad para los probióticos e introdujo la idea de que tienen un efecto benéfico para el huésped<sup>85</sup>.

El término Probiótico significa “a favor de la vida” y de acuerdo con la Food and Agriculture Organization (FAO) son “microorganismos vivos que ejercen una acción benéfica sobre la salud del huésped al ser administrados en cantidades adecuadas” o “alimentos susceptibles de producir un efecto benéfico sobre una o varias funciones específicas en el organismo, más allá de los efectos nutricionales habituales, de mejorar el estado de salud y de bienestar y/o de reducir el riesgo de una enfermedad”<sup>83</sup>.

Japón fue el primer lugar del mundo donde se empezó a hablar de los alimentos funcionales hace ya unos 30 años. Unos 10 años más tarde estos productos alimenticios aparecen en Europa. En ese momento un grupo de expertos, coordinados por el International Life Science Institute (ILSI) creó un proyecto para definir y obtener un mejor conocimiento acerca de éstos alimentos, sus efectos, áreas de aplicación y todo lo relativo a estos productos<sup>33</sup>.

En la Tabla 2 se hace un resumen de los beneficios para la salud que son otorgados por los probióticos:

Tabla 2. Efectos saludables de los probióticos.

<b>Efectos fisiológicos</b>	
Cepas resistentes al pH biliar, actividad enzimática.	Producción de bacteriocinas.
Mejora de la digestión.	Efecto antagonista de <i>Helicobacter pylori</i> .
<b>Acción en el tracto digestivo</b>	
Mejora de la digestión de la lactosa.	Estabilidad de la enfermedad de Crohn.
Estimulación de la inmunidad en modelos animales.	Adhesión a los cultivos de la línea celular intestinal humana.
Prevención de molestias intestinales.	Regulación de la motilidad intestinal.
<b>Alteración de la microflora intestinal</b>	
Balance de las bacterias intestinales.	Colonización del tracto intestinal.
Disminución del tiempo de residencia de <i>Salmonella spp.</i>	Disminución en la actividad de las enzimas fecales.
Aumento de las bifidobacterias fecales.	Disminución de la mutagenicidad fecal.
<b>Acción sobre la diarrea</b>	
Prevención y tratamiento de la diarrea aguda.	Prevención de la diarrea asociada a antibióticos.
Tratamiento de la diarrea recurrente por <i>Clostridium difficile</i> .	Prevención y tratamiento de la diarrea por Rotavirus.
Tratamiento de la diarrea persistente.	
<b>Sistémicos</b>	
Estimulación de la actividad fagocítica y de la producción de interferones en células sanguíneas mononucleares en humanos en cultivo.	Disminución de hipertensión en modelos animales y humanos.
Alivio de síntomas clínicos de dermatosis atópica.	Efectos benéficos en diferentes tipos de cáncer.

Fuente: Documentos Técnicos de Salud Pública, 2003.

## 1.6 Microorganismos responsables de la producción del yogurt

En la producción del yogurt, uno de los factores más importantes para determinar la calidad del producto es el tipo de cultivo iniciador utilizado. Es por eso que la selección de la cepa como cultivo iniciador es crucial. Una buena cepa del cultivo iniciador no solo afecta el sabor y aroma, sino que también puede acelerar el proceso y, por lo tanto, reduce el costo del mismo<sup>114</sup>.

Los cultivos iniciadores de alimentos fermentados se pueden definir como las preparaciones de uno o varios sistemas de microorganismos que se aplican para iniciar el proceso de fermentación durante la fabricación de alimentos, fundamentalmente en la industria de productos lácteos. Las bacterias utilizadas se seleccionan dependiendo del tipo de alimento con el fin de afectar positivamente los parámetros físicos, químicos, así como la composición final de los alimentos, proporcionando interesantes propiedades de sabor para el consumidor. Una cepa ideal sería aquella que cumpla tanto las características metabólicas como antimicrobianas<sup>5</sup>.

Algunas de las funciones de los cultivos iniciadores son<sup>96</sup>:

- La bioconservación del alimento debido a la fermentación, que da como resultado una vida de anaquel más larga y seguridad mayor, así como la producción de bacteriocinas.
- Mejorar las propiedades sensoriales del producto, debido, por ejemplo, a la producción de ácidos orgánicos, compuestos carbonílicos y a la hidrólisis parcial de las proteínas y/o grasas.
- El desarrollo de propiedades reológicas y color.

El yogurt debe cumplir las especificaciones microbiológicas presentadas en la Tabla 3, en cuanto a los cultivos iniciadores tradicionales y a las BAL alternativas (Ver sección 1.6.2) que deberán permanecer viables, activos y abundantes hasta la fecha de caducidad del producto.



Tabla 3. Especificaciones microbiológicas de cultivos iniciadores.

Microorganismo	Límite mínimo
<i>Streptococcus thermophilus</i>	10 <sup>7</sup> UFC/mL
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> spp. <i>bulgaricus</i>	
Cultivos alternativos adicionales	10 <sup>6</sup> UFC/mL

Fuente: NOM-181-SCFI-2010.

Estos límites mínimos son necesarios para que lleguen al intestino humano y con ello ejerzan los efectos benéficos que se les asocian.

### 1.6.1 Cultivos iniciadores tradicionales

En la elaboración de yogurt, los cultivos iniciadores del mismo son adicionados cuando la mezcla fue homogenizada y después ha sido enfriada a la temperatura óptima de crecimiento de dichos microorganismos.

Los cultivos iniciadores comerciales para la producción de yogurt están compuestos por una mezcla simbiótica de relación de 1:1 (generalmente) de *S. thermophilus* y *L. bulgaricus*. Éstos organismos iniciadores son los responsables de la formación del sabor y la textura típica del yogurt. La fermentación se lleva a cabo a una temperatura de 40°C a 45°C y es mantenida de 4 a 6 horas sin agitación. Ésta temperatura es un promedio de las temperaturas óptimas de ambos microorganismos (*S. thermophilus* 37°C; *L. bulgaricus* 45°C)<sup>114</sup>.

En esta simbiosis es el *S. thermophilus* el que inicia la fermentación láctica y que se desarrolla muy intensamente hasta un pH de 5,5. La acidez, el consumo de oxígeno y la liberación de sustancias volátiles, por ejemplo, ácido fórmico que produce, crea las condiciones ideales para que se desarrolle *L. bulgaricus*<sup>95</sup>.


La actividad proteolítica de *L. delbrueckii bulgaricus* produce péptidos estimuladores y aminoácidos que estimulan, a su vez el crecimiento y la actividad acidificante del *S.*

*thermophilus*. El *L. delbrueckii bulgaricus* desarrolla aparte una actividad lipolítica, por lo que se liberan ácidos grasos y produce además acetaldehído, constituyéndose así en los principales compuestos que aportan el aroma y sabor característico del yogurt. Al final de la fermentación del mismo el pH oscila entre 4.2 y 4.6<sup>114</sup>.

### 1.6.1.1 *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus*

Algunas de las características de éste microorganismo se enlistan en la Tabla 4.

Tabla 4. Características del *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus*.

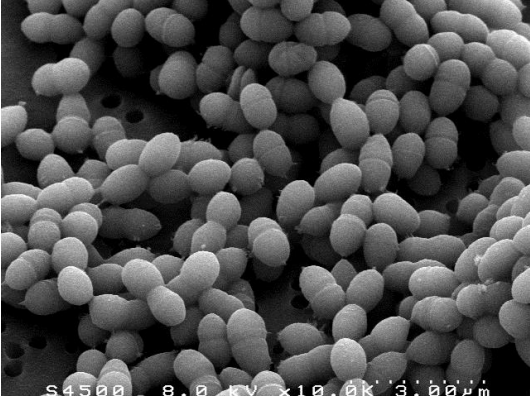
	Características
<p><i>Lactobacillus delbrueckii</i> spp. <i>bulgaricus</i></p>  <p><i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Bacilo homofermentativo</li> <li>• Gram-positivo</li> <li>• No esporulado</li> <li>• Anaerobio facultativo</li> <li>• Temperatura óptima: 40 – 43°C,</li> <li>• 45°C &gt; rango de temperatura &gt;15°C</li> <li>• Produce: ácido D-(-) láctico, etanol, ácido acético y CO<sub>2</sub>.</li> <li>• Fermenta: lactosa, fructosa, galactosa y glucosa.</li> <li>• Puede crecer a pH inferiores de 5</li> </ul>

Fuente: González, Gómez & Jiménez, 2005; Ray & Bhunia, 2010; Yildiz, 2010.

### 1.6.1.2 *Streptococcus thermophilus*

En 1984 Farrow y Collins propusieron la reclasificación de *S. thermophilus* como una subespecie de *Streptococcus salivarius*, nombrado *Streptococcus salivarius* spp. *thermophilus*, la cual fue aceptada y validada. En la Tabla 5 se muestran las características generales del mismo.

Tabla 5. Características del *Streptococcus salivarius* spp. *thermophilus*.

<i>Streptococcus salivarius</i> spp. <i>thermophilus</i>	Características
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Homofermentativo</li> <li>• Gram-positivo</li> <li>• Anaerobio facultativo</li> <li>• Temperatura óptima: 37 – 40°C</li> <li>• 52°C &gt; rango de temperatura &gt;10°C</li> <li>• Produce: L(+) láctico, acetaldehído, diacetil y polisacáridos.</li> <li>• Fermenta: lactosa, fructosa, manosa, sacarosa.</li> </ul>

Fuente: Lactobex, 2013; Ray & Bhunia, 2010; Yildiz, 2010

### 1.6.2 Combinación de distintas cepas de BAL

Los probióticos son usualmente de origen humano, mientras que *S. thermophilus* y *L. bulgaricus* se producen en el entorno de los productos lácteos. Por lo tanto, las bacterias del yogurt *L. bulgaricus* y *S. thermophilus* no son consideradas como organismos probióticos ya que no son habitantes naturales del intestino, por lo que no pueden implantarse en él y no sobreviven a las condiciones ácidas y a las concentraciones biliares del tracto gastrointestinal.

Las preparaciones probióticas generalmente contienen BAL (*Lactobacillus*, enterobacteria y bifidobacteria), las cuales son constituyentes normales de la microflora gastrointestinal del humano<sup>114</sup>.

Las cepas para el uso de probióticos deben ser representativas de las bacterias que son Generalmente Reconocidos como Seguros (microorganismos GRAS). El uso de nuevas cepas sin historial comprobado de bioseguridad, requiere de extensas pruebas toxicológicas y de tolerancia antes de ser aceptado<sup>115</sup>.

Algunas de las propiedades de las bacterias probióticas para ser consideradas como tal, se muestran en la Figura 6<sup>114, 115</sup>:



Figura 6. Características de las cepas probióticas.

En México, la Secretaría de Comercio y Fomento Industrial (SCFI) mediante la NOM-181-SCFI-2010 enlista algunos de los microorganismos alternativos considerados como probióticos del género *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* que pueden adicionarse al yogurt, algunos de ellos son:

- *Bifidobacterium bifidum*
- *Bifidobacterium breve*
- *Streptococcus salivarius spp. thermophilus*
- *Lactobacillus helveticus*
- *Lactobacillus casei*
- *Lactobacillus casei spp. paracasei*
- *Lactobacillus casei* Shirota (LcS)
- *Lactobacillus lactis*
- *Lactobacillus rhamnosus*
- *Lactobacillus plantarum*
- *Lactobacillus johnsonii* (La1)
- *Lactobacillus acidophilus*

#### **1.6.2.1 Género *Lactobacillus***

Forman parte de la flora normal de la boca, tracto intestinal y aparato reproductor femenino humano y de muchos animales.

Son bacilos largos, Gram-positivos, no esporulados. Su característica principal es la de fermentar azúcares con producción de ácido láctico, pudiendo ser homofermentadores o heterofermentadores. Crecen entre 2°C y 53°C, aunque su temperatura óptima es de 30-40°C. Son acidúricos, creciendo óptimamente a pH comprendidos entre 5,5-6,2.

### 1.6.2.1.1 *Lactobacillus johnsonii* La1

Es una de las 6 especies representativas del grupo *Lactobacillus acidophilus*<sup>36</sup> la cual se ilustra en la Figura 7. Posee características homofermentativas y crece a temperaturas de entre 15 y 45°C, es una cepa probiótica capaz de estimular el sistema inmune del huésped e interferir contra los patógenos gastrointestinales<sup>40,96</sup>. Es incapaz de crecer por sí mismo en leche por contener pocos aminoácidos libres y pequeños péptidos, por lo que para promover su desarrollo usualmente se adiciona extracto de levadura o una mezcla de alanina, serina, isoleucina y cisteína. Durante su fase exponencial crece a un tasa de  $1.0h^{-1}$ . Por su incapacidad de convertir la totalidad de la lactosa en ácido láctico no son capaces de desarrollar una alta biomasa en leche<sup>36</sup>, por lo que únicamente alcanza conteos finales de hasta 7.8 Log UFC/mL y tiene la ventaja de ser un buen productor de bacteriocinas durante la fermentación<sup>8</sup>. Gueimonde y colaboradores (2004) encontraron después de realizar la caracterización de cepas por perfiles de fermentación de hidratos de carbono, que es capaz de metabolizar glucosa, maltosa, sacarosa, galactosa, lactosa y trehalosa.

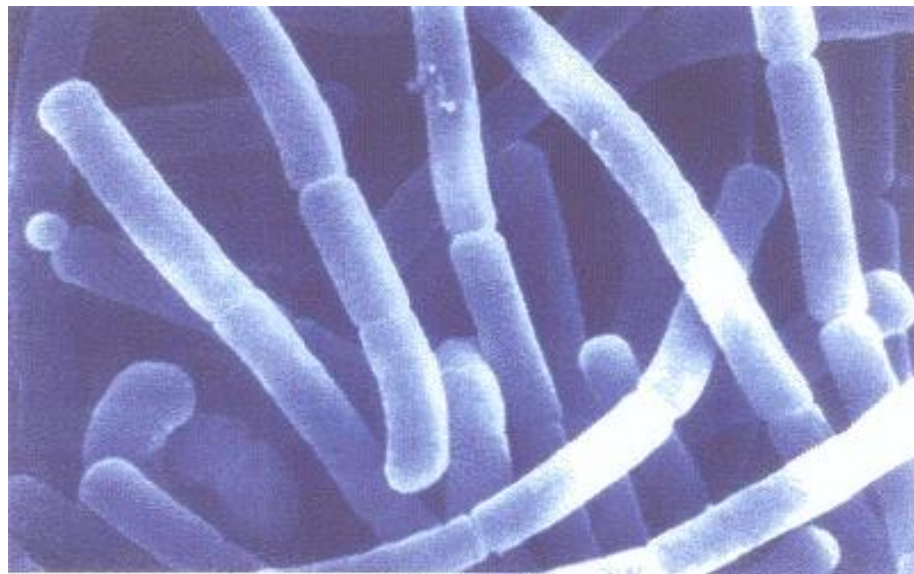


Figura 7. *Lactobacillus johnsonii* La1.

Fuente: González, Gómez & Jiménez, 2005

### 1.6.2.1.2 *Lactobacillus casei* spp. Shirota

Es una de las especies representativas del grupo *Lactobacillus casei* ilustrada en la Figura 8. Posee características heterofermentativa facultativa y para su crecimiento únicamente requiere tiamina<sup>96,102</sup> por lo que tiene la capacidad de crecer por sí misma en leche, sin la necesidad de la adición de aminoácidos libres o péptidos extras, en ausencia de algún otro cultivo láctico crece exponencialmente durante 6 a 7 horas por su capacidad de convertir la totalidad de la lactosa en ácido a una tasa de  $0.4 \text{ h}^{-1}$  y alcanzar conteos de hasta 9 Log UFC/mL, sin evidenciar muerte celular durante todo el periodo de fermentación<sup>8</sup>. Durante la fermentación produce  $\text{CO}_2$  a partir de la glucosa y también puede fermentar la fructosa, algunas pentosas<sup>96,102</sup>, glucosa, galactosa, maltosa, sacarosa, trehalosa, manitol y celobiosa<sup>47</sup>. A pesar de producir un compuesto antibacteriano, no es considerada como una de las mejores productoras de éstos péptidos<sup>8</sup>.



Figura 8. *Lactobacillus casei* Shirota.

Fuente: [www.yakult.com.mx](http://www.yakult.com.mx)

---

## 1.7 BAL como bioconservadores

Ananou y colaboradores (2007) definen a la Bioconservación como: “la extensión de la vida útil y la seguridad de los alimentos mediante el uso de la microbiota natural o controlada y/o sus compuestos antimicrobianos”. Una de las formas más comunes de bioconservación es la fermentación, un proceso basado en el crecimiento de microorganismos en los alimentos, ya sea natural o añadido. Estos organismos comprenden principalmente las BAL, que producen los ácidos orgánicos y otros compuestos que, además de propiedades antimicrobianas, también confieren sabores y texturas únicos a los productos alimenticios. Tradicionalmente, una gran cantidad de alimentos han sido preservados por procesos naturales de fermentación. Actualmente, los alimentos fermentados han aumentado en popularidad (60% de la dieta en los países industrializados) debido a las cualidades organolépticas mejoradas de alimentos fermentados tradicionales, una amplia investigación sobre su biodiversidad microbiana ha sido llevada a cabo con el objetivo de reproducir estas cualidades, que se atribuyen a la microbiota nativa, en un entorno controlado.

Además de que las BAL proporcionan sabor y textura e incrementan el valor nutricional de los alimentos, desde hace décadas se utilizan en la industria alimenticia como bioconservadores debido a la producción de bacteriocinas y otras sustancias que ejercen acción antibacteriana que contribuyen a la prevención de la descomposición de alimentos<sup>19</sup> además de competir por los nutrientes.

### 1.7.1 Compuestos inhibitorios producidos por BAL

En una fermentación las BAL reducen los carbohidratos disponibles en el producto y como resultado se produce una variedad de moléculas orgánicas de bajo peso molecular que presentan actividad antimicrobiana, capaces de inhibir bacterias, hongos y/o levaduras<sup>99</sup>. Durante la fermentación se produce ácido láctico y ácido acético como productos finales de ésta, causando una reducción en el pH, pero también producen otras sustancias como peróxido de hidrógeno, diacetilo, etc.<sup>5</sup>.



### 1.7.1.1 Ácidos orgánicos

La fermentación que involucra BAL tiene como resultado la acumulación de ácidos orgánicos, principalmente ácido láctico, como producto final del metabolismo de los carbohidratos, generados a partir del piruvato por la deshidrogenación del ácido láctico. La acumulación del ácido láctico tiene como consecuencia la simultánea reducción del pH del medio y la solubilidad en grasa de la forma no disociada de los ácidos orgánicos<sup>50</sup>, tienen como resultado un amplio espectro en la actividad inhibitoria contra bacterias Gram-negativas, por la alta permeabilidad de la molécula no cargada a través de los lipopolisacáridos de la membrana plasmática, que al disociarse en el interior de la célula liberan aniones y protones cargados que no pueden escapar y acidifican el interior de la célula provocando la disrupción de la membrana y la inhibición de reacciones metabólicas esenciales que trae como consecuencia la muerte celular<sup>16</sup>. La combinación del pH ácido, la constante de disociación (valor de pK) y la concentración molar son factores que determinan la actividad inhibitoria del ácido láctico y ácido acético en el medio. El ácido acético (pK de 4.756) tiene mayor actividad antimicrobiana que el ácido láctico (pK de 3.860)<sup>115</sup>. A un pH 4, el porcentaje que permanece en la forma no disociada de estos ácidos es: el 11% del ácido láctico y 85% del ácido acético. Cuando están presentes en una mezcla para el caso de las BAL heterofermentativas el ácido láctico contribuye mayormente a la reducción del pH, mientras el ácido acético causa un efecto inhibitorio<sup>99</sup>. Un estudio realizado por Adams and Hall en 1998 reportó que existe sinergismo entre el ácido láctico y el ácido acético en la inhibición de *E. coli* y *Salmonella*<sup>115</sup>.

### 1.7.1.2 Peróxido de hidrógeno

La mayoría de las BAL son capaces de generar peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) en presencia de oxígeno, a través de flavoproteínas oxidasa, NADH oxidasa y peróxido dismutasas. El efecto antibacteriano del peróxido de hidrógeno se atribuye a su efecto fuertemente oxidante sobre la pared celular y la destrucción de estructuras de proteínas celulares. Su efecto puede incrementarse por la presencia de

lactoperoxidasa y tiocianato ( $\text{SCN}^-$ ) ya que la membrana de las bacterias sufre daños estructurales al exponerse al  $\text{OSCN}^-$ ; sin embargo, el mayor efecto se da por el bloqueo de la glucólisis, ya que inhibe el transporte de glucosa, la actividad de la hexocinasa y de la gliceraldehído-3-3-fosfato deshidrogenasa. La actividad contra bacterias Gram-positivas es bacteriostática, mientras que a las Gram-negativas las mata rápidamente. El peróxido de hidrógeno se excreta y se acumula, ya que no produce catalasa, sin embargo, no se acumula en cantidades significativas pues es descompuesto por la acción de peroxidases, flavoproteínas y pseudocatalasas<sup>60,99</sup>.

#### **1.7.1.3 Dióxido de carbono**

El dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) es el principal producto final obtenido de la fermentación de hexosas por BAL heterofermentativas. Algunas BAL son capaces de producir  $\text{CO}_2$  a partir de malato y citrato, por el metabolismo de la arginina o por la descarboxilación de aminoácidos<sup>115</sup>.

El  $\text{CO}_2$  también contribuye en la creación de un ambiente anaeróbico reemplazando las moléculas de oxígeno, su capacidad extra e intra celular para disminuir el pH y sus efectos destructivos en la membrana celular<sup>115</sup> por la acumulación de éste en la doble capa lipídica que causa su disfunción hacen del  $\text{CO}_2$  un potente sistema contra una amplia variedad de microorganismos. Sin embargo, la literatura reporta que a bajas concentraciones el  $\text{CO}_2$  puede estimular el crecimiento de algunos organismos, mientras a altas concentraciones puede prevenir su crecimiento. Así mismo las bacterias Gram-negativas han reportado ser más sensibles al dióxido de carbono que las bacterias Gram-positivas<sup>99</sup>.

#### **1.7.1.4 Diacetil y Acetaldehídos**

El diacetil (2,3-butanodiona) fue identificado por Van Niel y sus colaboradores de trabajo como el componente de aroma y sabor de las grasas. Es producido por especies y cepas de los géneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* y *Streptococcus*. Cuando las hexosas son metabolizadas, la formación de diacetil será



reprimida. Sin embargo, el diacetil puede ser producido en exceso si el citrato es metabolizado por la vía del piruvato<sup>99</sup>.

Jay observó que el diacetil fue progresivamente más efectivo a pH <7 y que la actividad antimicrobiana fue antagonizada por la presencia de glucosa y acetato. También se encontró que el diacetil tenía mayor actividad en contra de bacterias Gram-negativas, levaduras y mohos que contra bacterias Gram-positivas, siendo las BAL las más sensibles<sup>99</sup>. Se requiere de altas concentraciones de diacetil (0.4mg/ml) para tener un efecto antimicrobiano contra la mayoría de los microorganismos lo que afectaría drásticamente el sabor y aroma de los productos, sin embargo, *E. coli* es susceptible a concentraciones extremadamente bajas, Motlagh en 1991 reportó que la dosis para percibir efecto bactericida fue de 344 ppm para *E. coli*<sup>15</sup>. Se cree que el diacetil reacciona con el enlace arginina- proteína de las bacterias Gram-negativas interfiriendo de este modo con la utilización de este aminoácido<sup>99</sup>.

El acetaldehído es formado durante el metabolismo de los carbohidratos de BAL heterofermentativas es reducida a etanol por la re-oxidación de los nucleótidos de piridina, catalizada por NAD<sup>+</sup> dependiendo de la enzima alcohol deshidrogenasa. El acetaldehído imparte su aroma típico al yogurt y se ha reportado que posee una actividad antimicrobiana con dosis entre 10-100 ppm contra patógenos transmitidos por alimentos como *E. coli*, *Salmonella typhimurium* y *Staphylococcus aureus*<sup>99</sup>.

#### 1.7.1.5 Biocinas

La actividad antimicrobiana de las bacteriocinas permite utilizarlas como conservadores biológicos puros que en un momento dado podrían remplazar a los conservadores químicos, ya que tienen la ventaja de ser proteínas (péptidos biológicamente activos) que al biodegradarse no forman compuestos secundarios<sup>44</sup>.

Existen numerosas bacteriocinas producidas por las BAL y cada una tiene espectros de inhibición particulares, es decir, únicamente tienen efecto sobre bacterias estrechamente relacionadas con el productor de la bacteriocina<sup>105</sup>. Por lo general actúan destruyendo la integridad de la membrana citoplasmática a través de la

formación de poros, lo que provoca la salida de compuestos pequeños o altera la fuerza motriz de protones necesaria para la producción de energía y la síntesis de proteínas o ácidos nucleicos<sup>23,67</sup>.

Las bacteriocinas de las BAL tienen muchas características atractivas que las hacen candidatas adecuadas para su uso como conservante de alimentos, como<sup>5</sup>:

- Naturaleza proteica, para la inactivación de las enzimas proteolíticas del tracto gastrointestinal.
- No son tóxicas para los animales de laboratorio analizados y generalmente no inmunogénicas.
- Carácter inactivo contra las células eucariotas.
- Por lo general son termorresistentes (puede mantener la actividad antimicrobiana después de la pasteurización y esterilización).
- Amplia actividad bactericida que afecta a la mayoría de las bacterias Gram-positivas y algunas Gram-negativas incluyendo diversos patógenos, tales como *L. monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *S. aureus*, y *Salmonella*.
- Determinantes genéticos generalmente situados en el plásmido, los cuales facilitan la manipulación genética para aumentar la variedad de análogos de péptidos naturales con características deseables.

Pero de la misma manera debido a su efecto limitado a microorganismos directamente relacionados con la cepa productora tienen algunos inconvenientes como<sup>50</sup>:

- Las bacterias producidas por cultivos protectores pueden inhibir a otros cultivos iniciadores deseados.
- A excepción de los casos ya mencionados no son activas contra bacterias Gram-negativas y bacterias de descomposición en general.
- Riesgo de inactivación por el sistema alimentario debido a su unión no específica con algunos ingredientes como proteasas o lípidos.

## 1.8 Factores que influyen en el crecimiento y supervivencia de los microorganismos

Los alimentos que se consumen normalmente, casi nunca están estériles, sino que contienen asociaciones microbianas cuya composición depende de qué organismos llegan a él y como se multiplican, sobreviven e interaccionan en el alimento durante el transcurso del tiempo<sup>62</sup>. Los tipos y cantidad de microorganismos serán determinados por algunos factores intrínsecos y extrínsecos que deben ser considerados en todas las etapas entre la adición del probiótico al alimento y el consumo de éste para proporcionar el beneficio al individuo.

Los principales factores que pueden influir en la capacidad de los probióticos para sobrevivir en los productos lácteos se ilustran en la Figura 9.

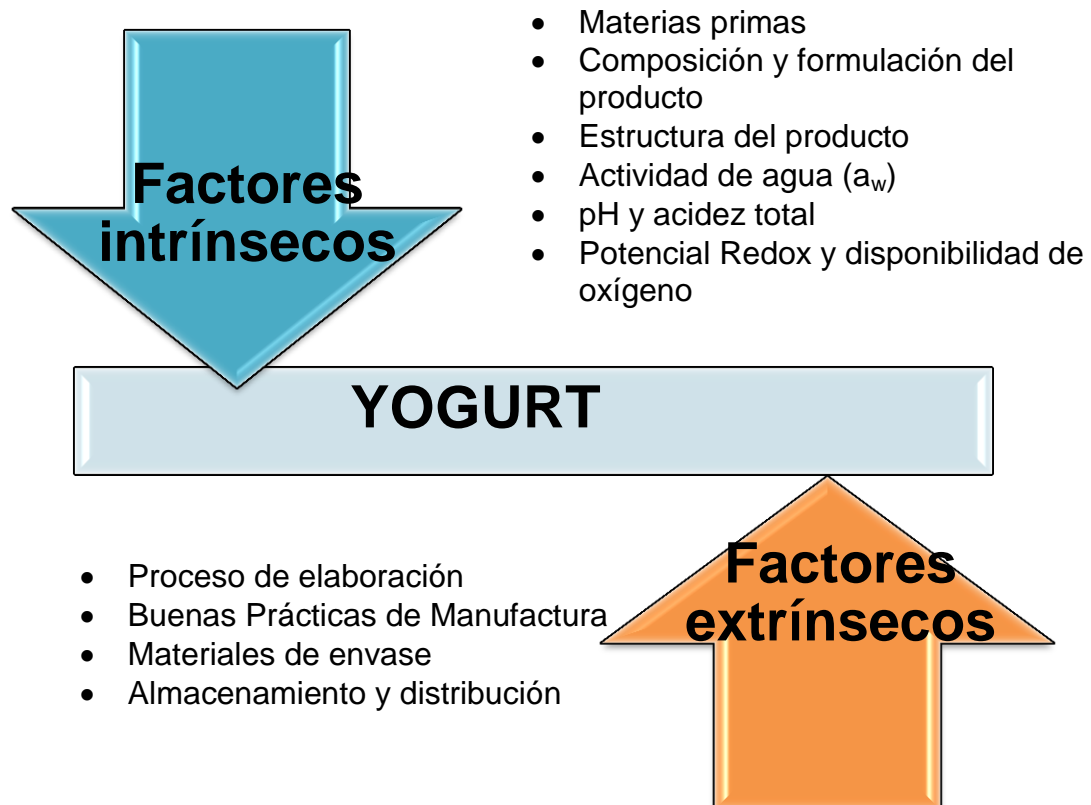


Figura 9. Factores que afectan la composición del alimento.

Fuente: Manzilla Arellano, 2011.

La combinación de estos factores tiene un impacto importante sobre la vida de anaquel del producto terminado, reduciendo el tiempo en el que puede ser almacenado, distribuido y consumido sin presentar un riesgo para la salud.

En caso de que los factores antes mencionados no sean controlados de manera adecuada los microorganismos pueden manifestar su presencia en una de las formas siguientes<sup>17</sup>:

- Causando alteración de los alimentos.
- Provocando Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA's).
- En algunos casos, de forma intencional en la elaboración de un alimento, se transforman sus propiedades de forma beneficiosa mediante su fermentación.

## 1.9 Microbiología Predictiva

La microbiología predictiva es una disciplina científica que trata de describir la respuesta de los microorganismos en los alimentos en función de factores intrínsecos, extrínsecos y de procesamiento. Aplicando funciones técnicas de cálculo ofrecidas por las matemáticas y la estadística, ésta rama científica permite simular las condiciones del alimento examinado, cuantificando el comportamiento de los microorganismos en un producto a lo largo del tiempo, a través de parámetros de crecimiento, supervivencia o inhibición. Así mismo, permite estudiar los procesos bioquímicos relacionados con la producción de metabolitos (toxinas, compuestos volátiles, ácidos orgánicos, etc.) ante situaciones de combinación de factores de conservación y en distintos niveles de aplicación<sup>32</sup>.

Muchos fabricantes han utilizado la microbiología predictiva para reducir el riesgo de los consumidores asociados al crecimiento de patógenos, lo mismo ha ocurrido con los microorganismos productores de alteración, sin embargo, éstos modelos rara vez son publicados por considerarlos una ventaja competitiva de la empresa que los desarrolla<sup>66</sup>. Algunas de las aplicaciones modernas de la microbiología predictiva en la industria de acuerdo con Membré & Lambert (2008) se resumen en la Figura 10.



Figura 10. Aplicación industrial de la microbiología predictiva.

Fuente: Membré, J.M. & Lambert, R.J.W., 2008.

### 1.9.1 Modelos matemáticos utilizados para la Microbiología Predictiva

Los modelos matemáticos considerados en el ámbito de la microbiología predictiva se pueden clasificar según distintos criterios, usos y finalidades. Existen modelos probabilísticos que permiten estimar los límites de crecimiento/no crecimiento o producción/no producción de toxina, modelos cinéticos de crecimiento, de supervivencia o de inactivación (para determinar el número de microorganismos en función del tiempo). Tras ajustar la curva de crecimiento microbiana mediante funciones matemáticas (modelos primarios) y estudiar sus parámetros según cambios en las condiciones ambientales (modelos secundarios), es posible modelar

el comportamiento microbiano en función de la temperatura, el pH, la actividad del agua y otros factores, independientemente del alimento<sup>32</sup> con la aplicación de herramientas informáticas disponibles en la red (libre acceso), algunos ejemplos de ellas se mencionan en la Tabla 6.

Tabla 6. Principales software utilizados en la microbiología predictiva.

Nombre	Creador	Aplicación
Combase	Institute of Food Research (IFR, UK)	Modelos predictivos de crecimiento e inactivación, generados a partir de datos defacilitados al IFR por cientos de investigadores anónimos.
Pathogen Modeling Program (PMP) <i>Salmonella</i> Enteritidis Risk Assessment (SERA)	United States Department of Agriculture, Agriculture Research Service (USDA-ARS, USA)	Software de libre acceso, describe el crecimiento, supervivencia e inactivación, además de la producción de toxinas bajo condiciones establecidas por el usuario.  El programa SERA incorpora una red de evaluación de riesgos microbiológicos
Seafood Spoilage and Safety Predictor (SSSP)	Danish Institute for Fisheries Research (DIFRES) y la Universidad Técnica de Dinamarca	Este programa predice la vida útil de productos de la pesca con respecto a un determinado microorganismo, considerando la temperatura de almacenamiento, ya sea ésta fija o fluctuante.
Food Spoilage Predictor (FSP) Refrigeration Index Calculator	Universidad de Tasmania	Estos modelos cuantifican el efecto de la temperatura en diversos alimentos (carne, pescado y productos lácteos) y predice el crecimiento de microorganismos alterantes. Además es capaz de relacionar la vida útil de un producto con su historial de temperaturas de almacenamiento.
Food Micro Model (FMM)	Ministry of Agriculture, Fisheries and Food (MAFF, UK)	Este programa predice la evolución de microorganismos patógenos implicados en enfermedades alimentarias, así como la de microorganismos causantes del deterioro de los alimentos.
Micro Hibro 2.0 Beta	Grupo AGR-170 (HIBRO) Universidad de Córdoba, España	Herramienta on-line de evaluación del riesgo microbiano en vegetales y productos cárnicos.
GInaFiT	Katholieke Universiteit Leuven, Belgium	Es una herramienta gratuita, útil para probar diez tipos diferentes de modelos de supervivencia microbiana en los datos experimentales específicos del usuario en relación a la evolución de la población microbiana con respecto al tiempo.

Fuente: Aguirre García, 2013.



### 1.9.2 Inactivación microbiana (muerte no térmica)

Las bacterias pueden ser inactivadas o muertas cuando las condiciones son adversas para su supervivencia. Estas condiciones ambientales pueden causar la inactivación aguda (rápida) como los casos de aplicación de alta temperatura, la cual sigue una cinética de orden cero y de primer orden que corresponde a la forma 1, de la Figura 11, mientras que también se puede generar una inactivación leve (lenta), que genera los demás comportamientos mostrados en la Figura 11 como consecuencia de tratamientos químicos, bajas temperaturas, radiación, la presencia de bajos niveles de ácidos orgánicos u otros factores como pH,  $a_w$ , concentración de nitrito, sales conservadoras, entre otros, que son letales para ciertos microorganismos<sup>22,38,65</sup>.

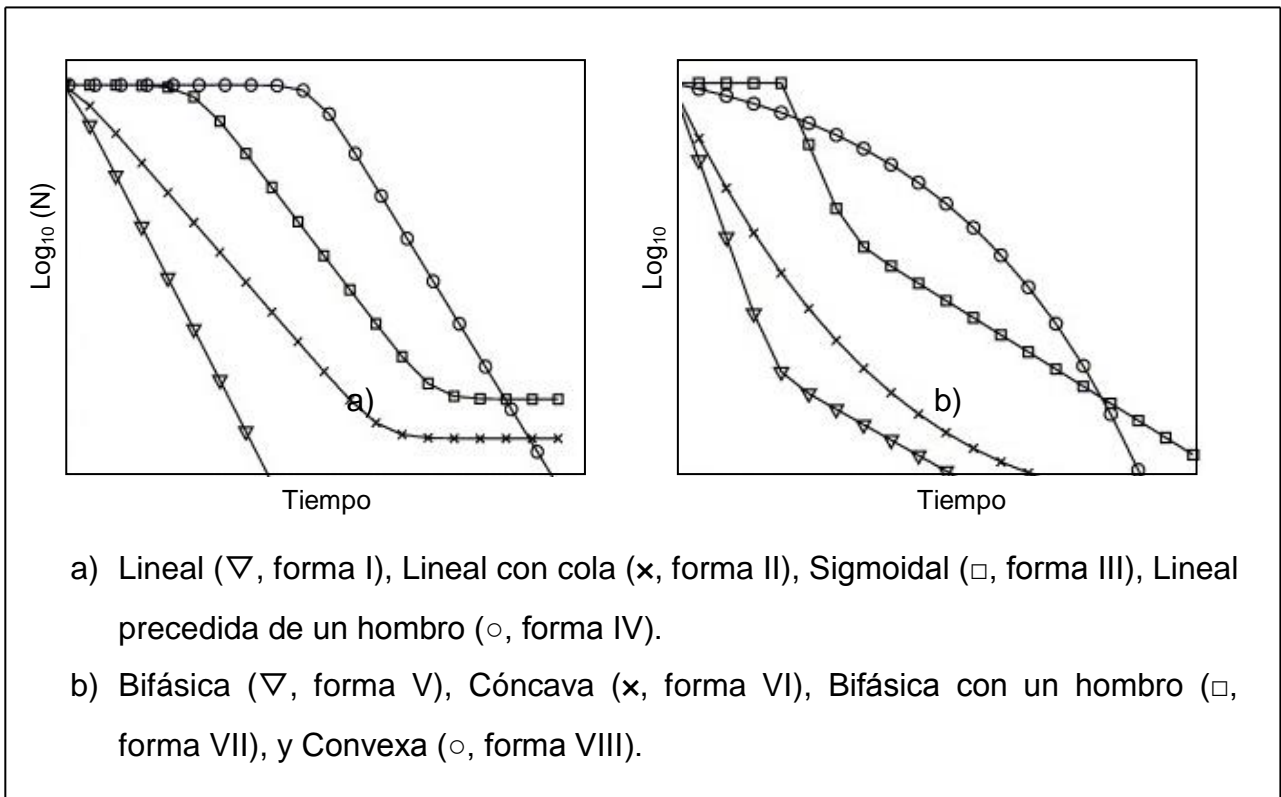


Figura 11. Tipos de curvas de inactivación comúnmente observadas.

Fuente: Geeraerd, Valdramidis, & Van Impe, 2005.



La forma convencional de calcular la eficiencia de los tratamientos para la protección de los alimentos en general, es mediante el ajuste de los datos experimentales a determinados modelos matemáticos, como se mencionó anteriormente. Diversos estudios indican que muchas especies microbianas responden a curvas no lineales, a menudo con presencia de “hombros” o fase de latencia al comienzo de la inactivación, y “colas” al final del tratamiento que representa una población residual más resistente<sup>42,103</sup>. Además frecuentemente se observa concavidad hacia arriba o hacia abajo en las curvas, cuando son sometidas a tratamientos no térmicos o térmicos suaves<sup>4</sup>.

La explicación a éstos fenómenos, es que la población microbiana está formada por diversas subpoblaciones, cada una con su propia cinética de inactivación. La curva de supervivencia es por lo tanto, el resultado de diferentes patrones de inactivación, dando lugar a curvas no lineales<sup>103</sup>. Es por esto que se requiere del desarrollo de diversos modelos matemáticos que permitan ajustar adecuadamente los datos a una ecuación que proporcione parámetros cinéticos a los que se les puede asignar un significado biológico que facilite su evaluación, algunos de éstos modelos se presentan en la Tabla 7.

Tabla 7. Aplicación de Modelos Matemáticos para la Inactivación bacteriana

Nombre del modelo y/o Autor	Forma de la curva de inactivación	Aplicación	Referencia
Modelo de Arrhenius	Log-lineal	Inactivación térmica en esporas de <i>C. botulinum</i> .	Geeraerd et al., 2000
Modelo de Cerf (1977)	Bifásica y Bifásica con hombro	Supervivencia de <i>Salmonella</i> , <i>L. monocytogenes</i> y <i>S. aureus</i> en caldo BHI condiciones ácidas y con NaCl.	Mafart et al., 2002
Modificación del Modelo de Gompertz. Bhaduri et al. (1991)	Log-lineal, Log-lineal con hombro y cola y Sigmoidal	Inactivación térmica de <i>L. monocytogenes</i> , <i>E. coli</i> O157:H7, <i>L. sakei</i> .	Bhaduri et al., 1991; Geeraerd et al., 2000
Modelo de Baranyi. Baranyi (1994)	Log-lineal, Log-lineal con hombro y cola y Sigmoidal	Inactivación no térmica de células bacterianas.	Baranyi & Roberts, 1994
Modelo de Weibull. Peleg & Cole (1998)	Log-lineal, Log-lineal con hombro y cola	Inactivación térmica en esporas de <i>C. botulinum</i> y <i>B. strearo thermophilus</i> y células de <i>L monocytogenes</i> .	Peleg & Cole, 1998
Modelo de Geeraerd. Geeraerd et al. (2000)	Log-lineal, Log-lineal con hombro y/o cola	Inactivación térmica de <i>B. cereus</i> , <i>Yersinia enterocolitica</i> , <i>E. coli</i> O157:H7, <i>L. monocytogenes</i> y <i>Lactobacillus sake</i> en caldos nutritivos adecuados para cada bacteria.	Geeraerd et al., 2000
Modificación del Modelo de Weibull. Mafart et al. (2002)	Curvas cóncavas y convexas	Curvas de supervivencia de baja concavidad de <i>B. cereus</i> y <i>B. pumilus</i> y curvas convexas de <i>C. botulinum</i> para tratamiento térmico en solución salina.	Mafart et al., 2002
Modificación del modelo de Weibull Albert & Mafart (2005)	Curvas cóncavas y convexas con hombro y/o cola	Tratamiento térmico suave de esporas y bacterias vegetativas de <i>B. pumilus</i> A40 (aislado de los huevos en polvo), <i>B. cereus</i> Bce 1(aislado de la línea de producción de alimentos lácteos).	Albert & Mafart, 2005
Modelo de Coroller Coroller et al. (2006)	Curvas Doble Weibull	Inactivación no térmica de <i>L. monocytogenes</i> y <i>S. typhimurium</i> en pH ácido (3.3) en caldo BHI.	Coroller et al., 2006

BHI: Infusión Cerebro Corazón

### Modelo de distribución de Weibull

Actualmente, la descripción de cinéticas de inactivación de forma no-lineal se han modelado empleando modelos como el de Weibull, basado en la hipótesis que la resistencia al estrés de una población sigue una distribución Weibull<sup>87</sup>.

La forma acumulativa de la función de densidad de la probabilidad de Weibull ha sido usada para describir la inactivación de microorganismos determinando diferentes resistencias de células individuales a tratamientos por calor y se identifica de acuerdo a lo establecido en la Ec. (1)<sup>42,108</sup>:

$$\left(\frac{N}{N_0}\right) = 10^{\left(-\left(\frac{t}{\delta}\right)^p\right)} \quad \text{Ec. (1)}$$

Donde  $N$  (UFC/mL) representa la concentración final de células,  $N_0$  (UFC/mL) es la concentración inicial de células;  $t$  es el tiempo (min);  $\delta$  es el parámetro de escala;  $p$  es el parámetro de forma, el cual corresponde a una curva cóncava hacia arriba si  $p < 1$ , una curva convexa hacia abajo si  $p > 1$ , y lineal si  $p = 1$ <sup>87</sup>.

### Modelo Doble Weibull

Fue propuesto por Coroller y colaboradores (2006) basado en dos hipótesis primordiales, la primera propuesta por Cerf (1977) que establece que existen dos subgrupos que tienen diferentes niveles de resistencia al estrés que coexisten en una población bacteriana y la segunda que establece que cada una de éstas siguen una distribución de Weibull independiente durante su inactivación. Las dos subpoblaciones existentes se relacionan entre sí con una suma de las dos distribuciones, tomando como base el modelo de Whiting (1993). El modelo de Doble Weibull es representado por la Ec. (2):

$$N(t) = \frac{N_0}{1+10^\alpha} \left[ 10^{-\left(\frac{t}{\delta_1}\right)^p + \alpha} + 10^{-\left(\frac{t}{\delta_2}\right)^p} \right] \quad \text{Ec. (2)}$$

Donde  $N$ ,  $N_0$ ,  $t$ ,  $\delta$  y  $p$  tienen el mismo significado que para la distribución de Weibull tradicional y  $\alpha$  corresponde a una transformación matemática de la variable  $f$  que se describe de acuerdo a la Ec. (3):

$$f = \frac{10^\alpha}{1+10^\alpha} \quad \text{Ec. (3)}$$

o su equivalente de acuerdo con la Ec. (4):

$$\alpha = \log_{10} \left( \frac{f}{1-f} \right) \quad \text{Ec. (4)}$$

El cual permite a éste parámetro ir desde el infinito positivo hasta el infinito negativo. Donde  $f$  es la fracción de la población original en el grupo mayor.

La forma de las curvas de inactivación, que pueden ser ajustadas a éste modelo corresponde a dos distribuciones de Weibull superpuestas, una independiente para cada una de las subpoblaciones con distinto grado de resistencia al estrés, como se describe de manera gráfica en la Figura 12:

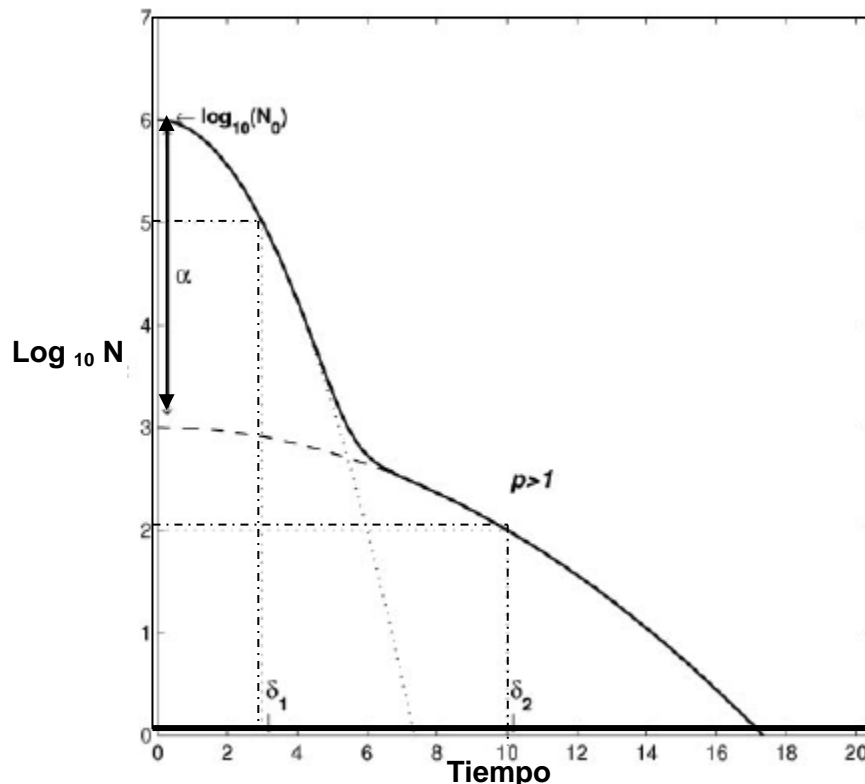


Figura 12. Diagrama basado en el modelo de supervivencia de Doble Weibull.

Fuente: Coroller, Leguerinel, Mettler, Savy, & Mafart, 2006.

### 1.10 Microorganismos indicadores de calidad sanitaria

A menudo la vida útil de un alimento perecedero viene determinada por el número de microorganismos presentes inicialmente. Como regla general, un alimento que contenga una gran población de microorganismos alterantes en un inicio tendrá una vida útil más corta que el mismo alimento si contiene sólo unos pocos microorganismos. Además los criterios microbiológicos también pueden ser usados como monitoreo en el cumplimiento de las BPM y sobre todo porque los microorganismos presentes en ellos pueden ser causantes de ETA's<sup>35</sup>.

En la rama de la Microbiología Predictiva, también suele utilizarse a los indicadores en la investigación de microorganismos patógenos en alimentos, debido a que el estudio específico de éstos últimos no facilita un enfoque preventivo<sup>11,86,88,101</sup>. Por lo cual las normas en materia de alimentos basadas en la prevención, generalmente

establecen la calidad sanitaria en términos de microorganismos indicadores. Éstos son microorganismos o grupos de ellos que advierten oportunamente de un manejo inadecuado o contaminación que incrementan el riesgo de presencia de patógenos en alimentos<sup>6</sup>. Los indicadores utilizados para evaluar la seguridad sanitaria de los alimentos deberán cumplir de acuerdo con lo mencionado anteriormente con las siguientes características<sup>39</sup>:

- Ser fáciles de detectar de forma rápida.
- Ser fácilmente distinguibles del resto de la flora del alimento.
- Tener una historia de constante asociación con el patógeno cuya presencia va a indicar.
- Estar presentes siempre que el patógenos de interés también esté.
- Ser un microorganismo cuyo número idealmente se correlaciona con el del patógeno de interés.
- Poseer requerimientos metabólicos y tasa de crecimiento iguales a los del patógeno de interés.
- Tener una tasa de destrucción al menos paralela a la del patógeno de interés e idealmente persistir algo más.
- Estar ausente de los alimentos en los que no se presente el patógeno de interés excepto quizá en una pequeña tasa.

Los principales microorganismos indicadores en alimentos son:

- Indicadores de condiciones de manejo o de eficiencia de proceso:
  - mesófilos aerobios (o cuenta total)
  - cuenta de hongos y levaduras
  - cuenta de coliformes totales
- Indicadores de contaminación fecal:
  - Coliformes fecales
  - *Escherichia coli*
  - Enterococos
  - *Cl. perfringens*

La selección de indicadores en un alimento depende fundamentalmente de los riesgos implicados y de los que se requiera saber para liberar, controlar o mejorar el alimento, manteniendo el enfoque preventivo<sup>6</sup>.

De acuerdo con lo mencionado anteriormente, la NOM-243-SSA1-2010 establece los límites máximos de contenido microbiano que debe contener el yogurt para poder garantizar que es un producto seguro para el consumo humano, dichos límites son reportados en la Tabla 8.

Tabla 8. Especificaciones microbiológicas del yogurt.

Microorganismos	Límite Máximo
Organismos Coliformes Totales	≤ 10 UFC/mL
<i>Staphylococcus aureus</i>	≤ 100 UFC/mL
<i>Salmonella</i>	Ausente en 25g

Fuente: NOM-243-SSA1-2010.

### 1.10.1 *Escherichia coli* como indicador de calidad sanitaria

El grupo de los coliformes incluye especies de los géneros *Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter* y *Citrobacter* incluida *E. coli*, en general son bacilos cortos Gram-negativos, anaerobios facultativos, no esporulados que fermentan la lactosa a 35°C, en menos de 48h con producción de ácido y gas, no tienen la capacidad de fermentar la sacarosa. Durante mucho tiempo se consideraron evidencia de contaminación fecal, sin embargo, se ha demostrado que muchos de ellos pueden vivir en el suelo, el agua y otros ambientes. Actualmente se consideran un excelente indicador de la eficiencia de los procesos de sanitización y desinfección, así como de calidad sanitaria en agua, vegetales y diversos productos procesados<sup>6,39</sup>. Los criterios microbiológicos que emplean *E. coli* son útiles en aquellos casos en los que se desea determinar si ha ocurrido contaminación de origen fecal. La contaminación de un alimento con *E. coli* implica el riesgo de que otros patógenos entéricos puedan



estar presentes también en el alimento. Los coliformes fecales pueden llegar a establecerse sobre el equipo y los utensilios de los ambientes de la industria alimentaria y contaminar alimentos procesados. La presencia de *E. coli* en un alimento tratado por calor o conservado en congelación significa que ha ocurrido un fallo en el proceso, o más frecuentemente, ha ocurrido una contaminación tras el tratamiento térmico o de los empleados o del contacto con alimentos no tratados<sup>35</sup>.

# **CAPÍTULO 2.**

# **METODOLOGÍA**



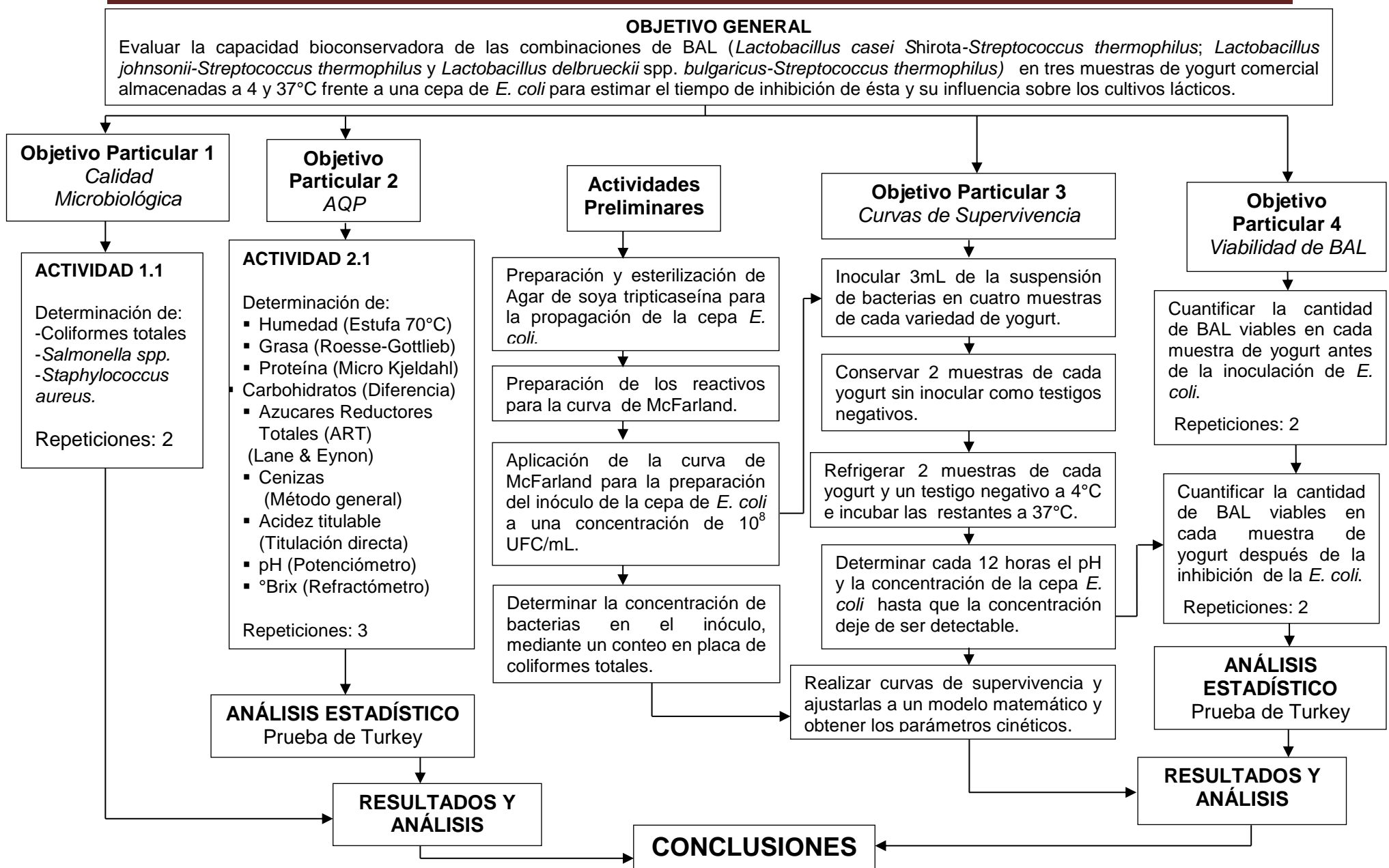
## OBJETIVOS

### General

Evaluar la capacidad bioconservadora de las combinaciones de BAL (*Lactobacillus casei* Shirota-*Streptococcus thermophilus*; *Lactobacillus johnsonii*-*Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus*-*Streptococcus thermophilus*) en tres muestras de yogurt comercial almacenadas a 4 y 37°C frente a una cepa de *E. coli* para estimar el tiempo de inhibición de ésta y su influencia sobre los cultivos lácticos.

### Particulares

1. Evaluar la calidad microbiológica de tres muestras de yogurt comercial mediante la determinación de coliformes totales, *Salmonella* spp. y *Staphylococcus aureus* para asegurarse que se encuentre dentro de los límites permitidos por la normatividad vigente y libres de cualquier patógeno.
2. Evaluar tres muestras de yogurt comercial mediante análisis químico proximal y determinaciones fisicoquímicas para asegurarse que se encuentren dentro de los intervalos permitidos por la normatividad vigente y/o bibliografía, así como los valores reportados en la etiqueta.
3. Evaluar el comportamiento de las combinaciones de las BAL y la influencia de la matriz en cada yogurt comercial frente a una cepa de *E. coli* aislada de un caso clínico mediante la elaboración de curvas de supervivencia a 4 y 37°C que permitan contrastar su efecto inhibitorio.
4. Evaluar la viabilidad de las BAL mediante la técnica de vaciado en placa para determinar el comportamiento de éstas después de la inhibición de *E. coli* en cada muestra de yogurt utilizado.



## 2.1 MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1.1 Material Biológico

Se trabajó con una cepa bacteriana *Escherichia coli* obtenida de un caso clínico de mastitis en vacas, proporcionada por el Cepario del Departamento de Bacteriología y Micología de la FMVZ de la Universidad Nacional Autónoma de México, CU, que fue utilizada como un indicador de la calidad sanitaria.

### 2.1.2 Muestras de Yogurts

Se seleccionaron tres muestras de yogurts bebibles con distintas combinaciones de BAL, conteniendo dos de ellas (muestra A y B) bacterias probióticas del género *Lactobacillus* y la tercera (muestra C) los cultivos iniciadores tradicionales del yogurt que fue utilizada como control. En la Tabla 9 se muestran dichos sistemas:

Tabla 9. Cultivos iniciadores para cada muestra de yogurt.

Muestra	Combinaciones de BAL	Probiótico
A	<i>Lactobacillus casei</i> Shirota - <i>Streptococcus thermophilus</i>	Si
B	<i>Lactobacillus johnsonii</i> - <i>Streptococcus thermophilus</i>	Si
C	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> spp. <i>bulgaricus</i> - <i>Streptococcus thermophilus</i>	No

Las muestras de yogurts fueron adquiridas en un centro comercial del municipio de Cuautitlán Izcalli, Estado de México.

### 2.2 OBJETIVO PARTICULAR 1: Calidad Microbiológica

La determinación de la calidad microbiológica de las muestras de yogurts se realizó al inicio de la experimentación para asegurar que dichas muestras se encontraban dentro de los límites establecidos por la normatividad vigente y libres de algún microorganismo patógeno.

A las muestras se les determinaron los microorganismos que se recomiendan para leches fermentadas establecidos por la NOM-243-SSA1-2010, los análisis realizados se hicieron por duplicado, y son resumidos en la Tabla 10.

Tabla 10. Condiciones establecidas para las determinaciones microbiológicas.

Microorganismo	Medio de cultivo	Temperatura de incubación	Tiempo de incubación	Expresión de resultados	Referencia
Coliformes Totales*	Agar rojo violeta bilis	35°C	24 horas	UFC/mL	NOM-113-SSA1-1994
<i>Staphylococcus aureus</i> *	Agar Baird Parker con emulsión yema de huevo	35°C	45-48 horas	UFC/mL	NOM-115-SSA1-1994
<i>Salmonella ssp</i>	Agar Salmonella-Shigela	35°C	18- 24 horas	Ausencia/25mL	NOM-114-SSA1-1994
	Agar Verde Brillante	35°C	24 horas		
	Agar Sulfito de Bismuto	35°C	48 horas		

\* La preparación de la muestra se realizó por la Técnica de Diluciones siguiendo el procedimiento establecido en la NOM-110-SSA1-1994.

### 2.3 OBJETIVO PARTICULAR 2: Análisis Químico Proximal y Físicoquímico

A las tres muestras de yogurt se les realizaron pruebas analíticas con la finalidad de verificar que cumplieran con lo reportado en su etiqueta así como por lo requerido en la normatividad vigente y/o información bibliográfica, además de analizar los nutrientes contenidos en cada uno de ellos que ayudaron a promover o inhibir el desarrollo de los microorganismos en estudio. Las determinaciones se realizaron por triplicado, obteniendo el resultado del promedio de ellas, en la Tabla 11 se resumen las determinaciones químicas realizadas a cada muestra de yogurt.

Tabla 11. Determinaciones químicas realizadas a los yogurts.

Determinación	Método	Referencia	Fotografía
Humedad	70°C por 5 hrs. Con arena	Kirk, 1991	
Grasa	Roesse-Gottlieb	Kirk, 1991	
Proteína	micro Kjeldahl	NOM-155-SCFI-2012	
Carbohidratos Totales	Por diferencia	Nielsen, 2003	$CT = Hum - Prot - Grasa - Cen$
Azúcares Reductores Totales (ART)	Lane y Eynon	Kirk, 1991	
Cenizas	Método general	Kirk, 1991	

Los carbohidratos totales se obtuvieron por diferencia, siguiendo el procedimiento establecido por el reglamento para el etiquetado nutricional de la Food and Drug Administration (FDA) el cual establece que: “el contenido total de hidratos de carbono de determinados alimentos como el yogurt se debe calcular restando el contenido de proteína bruta, grasa, humedad y cenizas, del peso total del alimento”<sup>71</sup>.

En la Tabla 12 se muestran las determinaciones fisicoquímicas que se realizaron en la experimentación a los 3 yogurts.

Tabla 12. Determinaciones fisicoquímicas realizadas a los tres yogurts.

Determinación	Método	Referencia	Fotografía
Acidez titulable	Titulación	Kirk, 1991	
pH	Electrométrico (Potenciómetro)	Kirk, 1991	
°Brix	Gravimétrico	Kirk, 1991	



## 2.4 OBJETIVO PARTICULAR 3:

### 2.4.1 Actividades Preliminares

#### 2.4.1.1 Propagación de la cepa

Con la finalidad de tener una concentración suficiente de bacterias que fueron inoculadas a las muestras de yogurts, y, para que éstas fueran bacterias jóvenes (que no hubiesen sido sometidas a condiciones de estrés como temperaturas de refrigeración, pH ácidos o falta de nutrientes para sobrevivir) se propagó la cepa de *E. coli* en cajas y tubos en medio nutritivo (Agar de Soya Tripticaseína) a una temperatura de 37°C por 24 horas en incubación. La siembra de la bacteria en las cajas fue mediante la técnica de dilución americana (Figura 13) y en el caso de los tubos se sembró por estría con un asa estéril.



Figura 13. Propagación de la cepa *Escherichia coli*.

### 2.4.1.2 Estándares nefelométricos de McFarland

Para tener una concentración similar de bacterias en cada inóculo que fue preparado, se utilizaron los Estándares nefelométricos de McFarland los cuales permiten determinar el número aproximado de células bacterianas suspendidas en una solución salina. Los reactivos que se utilizaron para la preparación de los estándares fueron solución de  $\text{BaCl}_2$  al 1% y  $\text{H}_2\text{SO}_4$  al 1% que al reaccionar en distintas proporciones (de acuerdo con los volúmenes indicados en la Tabla 13) forman un precipitado de  $\text{BaSO}_4$  el cual corresponde a una concentración determinada de bacterias, que guardan una relación proporcional ya que a mayor turbidez corresponde mayor concentración bacteriana. Las proporciones utilizadas para la preparación de cada tubo se muestran en la Tabla 13<sup>58,70</sup>.

Tabla 13. Tabla de McFarland.

No. Tubo	Solución $\text{BaCl}_2$ (mL)	Solución $\text{H}_2\text{SO}_4$ (mL)	Concentración de bacterias (UFC/mL)
1	0.1	9.9	$3 \times 10^8$
2	0.2	9.8	$6 \times 10^8$
3	0.3	9.7	$9 \times 10^8$
4	0.4	9.6	$12 \times 10^8$
5	0.5	9.5	$15 \times 10^8$
6	0.6	9.4	$18 \times 10^8$
7	0.7	9.3	$21 \times 10^8$
8	0.8	9.2	$24 \times 10^8$
9	0.9	9.1	$27 \times 10^8$
10	1.0	9.0	$30 \times 10^8$

Fuente: MacFaddin, 2004.

Al emplear una cepa de *E. coli* como indicador de la presencia de otra, se debe de trabajar con una concentración bacteriana alta ( $10^7$  -  $10^9$  UFC/mL) que garantice que al inhibirse ésta, también se inhiba el correspondiente patógeno con el que se está

haciendo la correlación. Por ésta razón se eligió el tubo número 10 de la curva de McFarland, pues la turbidez que presenta corresponde a la concentración deseada para ser inoculada, la cual fue de  $3 \times 10^9$ .

#### **2.4.1.3 Preparación del inóculo**

Una vez teniendo las cajas con las colonias desarrolladas de *E. coli* a las 24 horas y el tubo estándar de McFarland, se prosiguió a la preparación de la suspensión bacteriana.

En un tubo de ensayo con solución salina estéril al 0.85% se fueron agregando las células bacterianas de *E. coli* hasta alcanzar la misma turbidez del tubo de McFarland seleccionado.

#### **2.4.1.4 Cuantificación de *E. coli***

Después de haber llegado a una similitud entre la preparación bacteriana y el tubo número 10, se cuantificaron las células contenidas en la solución, con la finalidad de tener la concentración real de *E. coli* que fue inoculada a cada muestra.

La preparación de la muestra se realizó siguiendo el procedimiento establecido en la NOM-110-SSA1-1994 y la cuantificación mediante la técnica vaciado en placa de acuerdo con la NOM-113-SSA1-1994 para la determinación de coliformes totales utilizando como medio selectivo agar rojo violeta bilis. La morfología de las colonias de *E. coli* en el medio son similares a un lente biconvexo con un diámetro de 0.2mm a 5mm, de un color rojo oscuro con un halo de color rojo claro o rosa alrededor de cada colonia (Figura 14).

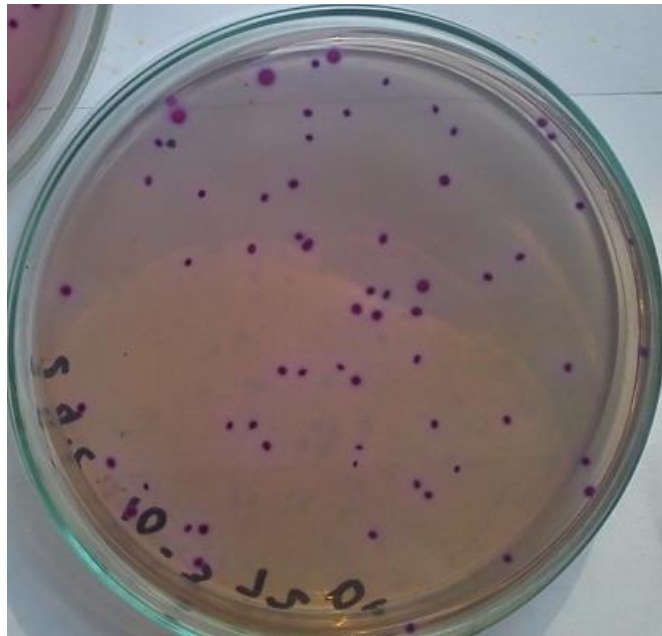


Figura 14. Colonias de *Escherichia coli* en agar rojo violeta bilis.

## 2.4.2 Curvas de supervivencia de *E. coli*

### 2.4.2.1 Inoculación de *E. coli* a las muestras de yogurt

Se prepararon 6 muestras de 112mL de cada yogurt a evaluar, de las cuales únicamente 4 fueron inoculadas con 3mL de la suspensión bacteriana de *E. coli*<sup>10,18</sup> y las otras dos fueron conservadas libres de contaminación como testigos negativos de la experimentación. Tanto a las muestras inoculadas como a los testigos negativos se les determinó la concentración de *E. coli* de acuerdo a la NOM-113-SSA1-1994, con la finalidad de tener un conteo de la población bacteriana viable al tiempo cero antes de ser sometida a las condiciones de almacenamiento y poder evaluar el efecto inmediato de la acidez del medio en la cepa indicador y verificar que los testigos negativos estuvieran libres de contaminación.

### 2.4.2.2 Condiciones de almacenamiento

Las muestras fueron almacenadas en condiciones de refrigeración e incubación de acuerdo con lo indicado en la Tabla 14 para evaluar el efecto de la temperatura en el crecimiento microbiano tanto de las BAL como de la cepa indicadora en los yogurts A, B y C, procurando que las condiciones fueran similares en cada caso.

Tabla 14. Condiciones de almacenamiento para las muestras de yogurt.

Condiciones de almacenamiento	Muestra	Repetición 1	Repetición 2	Testigo negativo
Refrigeración 4°C	A B C	Muestra inoculada	Muestra inoculada	Muestra sin inocular
Incubación 37°C	A B C	Muestra inoculada	Muestra inoculada	Muestra sin inocular

Las seis muestras fueron monitoreadas cada 12 horas, midiendo el pH con tiras indicadoras de pH (marca Sigma Chemical Company) Figura 15 y la concentración de la cepa de *E. coli* a cada una por duplicado, utilizando el promedio de las repeticiones como valor final hasta una concentración no detectable, registrando ésta lectura como el tiempo de inhibición.



Figura 15. Medición del pH a las muestras inoculadas y testigos negativos

#### 2.4.2.3 Elaboración de las curvas de supervivencia de *E. coli*

Con las lecturas de las colonias de *E. coli* en los 3 yogurts a ambas temperaturas en el transcurso del tiempo, se realizaron curvas de supervivencia, graficando tiempo (h) en función de la concentración Log (UFC/mL), dichas curvas se ajustaron a modelos matemáticos, ya sea un modelo lineal o un modelo de Doble Weibull, dependiendo de la temperatura de almacenamiento. Éstos ajustes se realizaron utilizando el programa de GlnaFiT (Versión 1.6), un programa gratuito de complemento para Microsoft Excel<sup>42</sup>. Para evaluar si el modelo era adecuado, es decir, si los datos experimentales se ajustaban al modelo matemático seleccionado, se utilizaron la Raíz del Error Cuadrático Medio (RMSE) y el Coeficiente de correlación ( $R^2$ ) en los casos donde el comportamiento fue lineal y RMSE en el que la inhibición fue no lineal.

De la curva de inactivación de Doble Weibull se obtuvieron los parámetros cinéticos mostrados en la Tabla 15.

Tabla 15. Parámetros cinéticos del Modelo de Double Weibull.

Parámetro	Significado
Log ( $N_0$ )	Concentración inicial estimada
$\rho$	Parámetro de forma
$\delta_1$	Tiempo para la primera reducción decimal de la primera población
$\delta_2$	Tiempo para la primera reducción decimal de la segunda población
$\alpha$	Tamaño de la primer población

**Fuente:** Coroller et al. (2006). General Model Based on Two Mixed Weibull Distributions of Bacterial Resistance for Describing Various Shapes of Inactivation Curves. *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 6493-6502.

#### 2.4.2.4 Verificación de la inhibición total de *Escherichia coli*

Con el propósito de evaluar si la cepa de *Escherichia coli* había sido inhibida parcialmente o si se había dado la muerte celular, las tres muestras inoculadas se neutralizaron con NaOH al 1.25%, después se incubaron a 37°C por 24 horas en caldo nutritivo para restaurar las células dañadas y finalmente se sembraron utilizando la técnica de dilución americana en Agar MacConkey. Al encontrar crecimiento de colonias en el medio se consideraba que la cepa bacteriana solo había sido inhibida temporalmente por las condiciones del medio, por el contrario, la ausencia de colonias confirmó la muerte bacteriana.

### 2.5 OBJETIVO PARTICULAR 4:

#### 2.5.1 Conteo inicial de BAL

Antes de inocular los tres yogurts con la cepa de *E. coli* se cuantificaron los *Lactobacillus* y *Streptococcus*, utilizando la técnica de vaciado en placa en Agar Lactobacilli MRS y Agar Lacti Streptococci M17, determinando *Lactobacillus* (Figura 16) y *Streptococcus* viables en las muestras. Las condiciones de incubación son resumidas en la Tabla 16.

Tabla 16. Condiciones de incubación para el conteo de BAL.

Microorganismo	Medio de cultivo	Temperatura de incubación	Condiciones de incubación	Tiempo de incubación	Expresión de resultados
<i>Lactobacillus</i>	Agar Lactobacilli MRS	37°C	Atmósfera rica en CO <sub>2</sub> *	48 horas	UFC/ml
<i>Streptococcus</i>	Agar Lacti Streptococci M17	37°C	Atmósfera rica en CO <sub>2</sub> *	48 horas	UFC/ml

\*Técnica de doble caja o velobiosis: favorece una atmósfera rica en CO<sub>2</sub> aumentando de 3 a 5% la concentración de éste<sup>70</sup>.

Los géneros *Lactobacillus* y *Streptococcus* por tratarse de BAL requieren condiciones de anaerobiosis para favorecer su crecimiento, por tratarse de bacterias anaerobias facultativas, por esta razón fueron incubadas en una atmósfera rica en CO<sub>2</sub>. En la Figura 16 se muestran las colonias típicas de *Lactobacillus* desarrolladas en Agar Lactobacilli MRS.

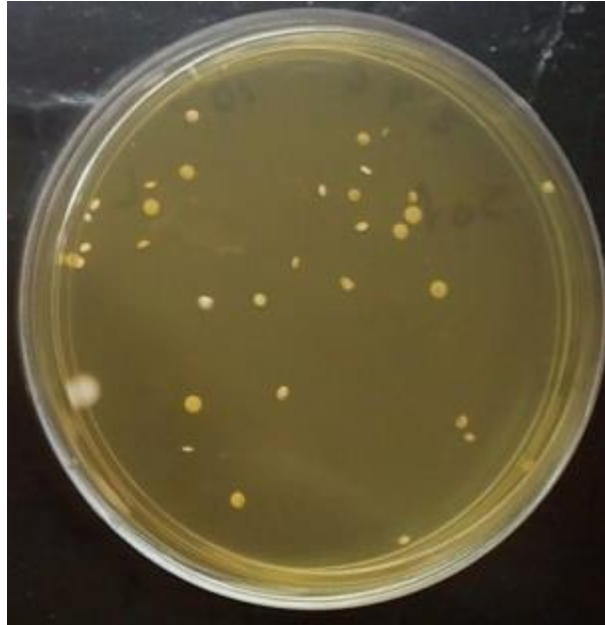


Figura 16. Cuantificación de *Lactobacillus* en una muestra de yogurt.

### **2.5.2 Viabilidad de BAL después de la inhibición de *E. coli***

Después de que se dio la inhibición de la cepa indicadora se cuantificó la concentración de BAL viables en cada muestra de yogurt evaluado, así como en los testigos negativos conservados. Las condiciones fueron las mismas que para el conteo inicial.

Los conteos iniciales y finales de *Lactobacillus* y *Streptococcus* en los 3 yogurts a las dos temperaturas de almacenamiento se representaron mediante gráficas de



barras con el propósito de comparar el impacto de la temperatura y la presencia de *E. coli* sobre su viabilidad.

### **2.1.8 Análisis Estadístico**

Los resultados de las determinaciones fisicoquímicas para la comparación entre los yogurts y los resultados del conteo inicial y final de las BAL se evaluaron por análisis de varianza a  $P < 0.05$ . Las diferencias estadísticas significativamente se analizaron mediante la prueba de Turkey, utilizando el software estadístico Minitab 14<sup>46</sup>.

# **CAPÍTULO 3.**

## **RESULTADOS Y ANÁLISIS**

### **DE RESULTADOS**





### 3. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

#### 3.1 Objetivo Particular 1: Calidad microbiológica.

El control de la calidad microbiológica del yogurt es de importancia primordial para garantizar la inocuidad de éste, así como también para cumplir con los estándares existentes y/o regulaciones de cada país en el que se comercialice. En México la Secretaría de Salud por medio de la NOM-243-SSA1-2010 establece las especificaciones sanitarias que debe cumplir el yogurt. En la Tabla 17 se muestran los resultados obtenidos de la evaluación realizada a las tres muestras de yogurt comercial.

Tabla 17. Resultados del análisis microbiológico a las tres muestras de yogurt comercial.

Determinación	Límites máximos	Yogurt A	Yogurt B	Yogurt C
Coliformes totales*	$\leq 10$ UFC/mL	Negativo	Negativo	Negativo
<i>Salmonella</i> spp.**	Ausente /25mL	Negativo	Negativo	Negativo
<i>Staphylococcus aureus</i> *	$\leq 100$ UFC/mL	Negativo	Negativo	Negativo

\*Los resultados se leyeron utilizando como referencia la dilución  $10^{-1}$

\*\*Los resultados se leyeron de una muestra de 25 mL.

Como se observa en la Tabla 17 los tres yogurts comerciales analizados cumplen con las especificaciones marcadas en la normatividad. En cuanto a coliformes totales no se encontraron colonias en la dilución  $10^{-1}$  para las tres muestras evaluadas. En la Figura 17 se verifica la ausencia de crecimiento de coliformes totales para el Yogurt A, lo que nos da una idea global de que tanto en las granjas como en las plantas procesadoras de cada uno éstos las condiciones de elaboración fueron higiénicas, dando como resultado alimentos seguros para el consumo humano<sup>54</sup>.

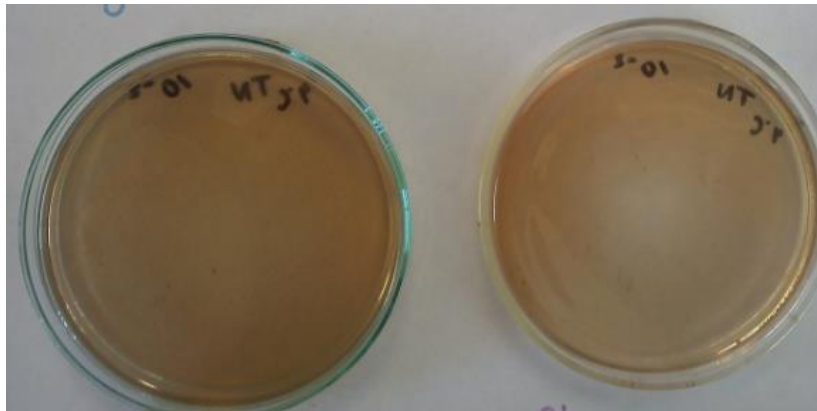


Figura 17. Determinación de Coliformes totales incubados a 37°C por 24 h.

Para el caso de *Salmonella spp*, las tres muestras evaluadas cumplen con el requerimiento establecido, obteniendo como resultado ausencia en 25 mL de producto, en la Figura 18 se observa dicho resultado de la determinación para el yogurt B. El monitoreo de ésta bacteria es exigida para las leches fermentadas y otros productos lácteos debido a que en los últimos años diversos estudios como el realizado por Calderón y colaboradores (2007), demostraron que este patógeno puede llegar a sobrevivir hasta por 4 días a las condiciones ácidas desarrolladas en éstos y ser un factor de riesgo muy importante para el consumidor, ya que algunos géneros de *Salmonella* pueden llegar a causar la muerte.

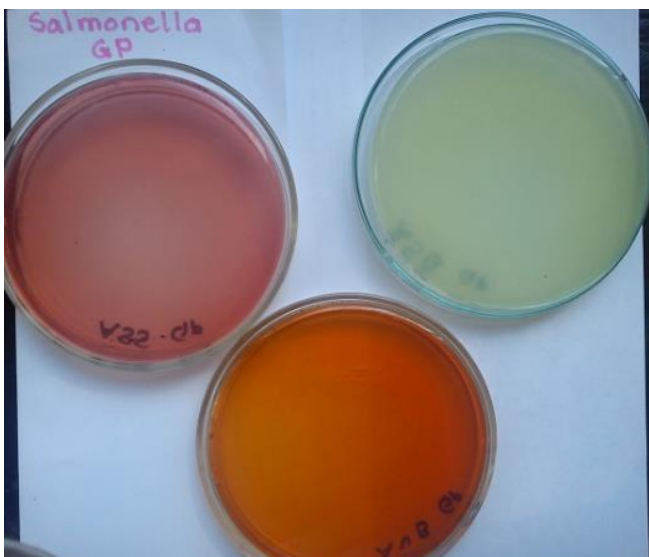


Figura 18. Aislamiento de *Salmonella* en medios selectivos agar SB, SS y VB, incubado a 35°C por 24 h.



Al igual que *Salmonella*, el monitoreo de *Staphylococcus aureus* también es obligatorio para las leches fermentadas por ser un patógeno que puede llegar a sobrevivir a condiciones ácidas y desarrollar resistencia a los compuestos inhibitorios presentes en el yogurt hasta por 15 días<sup>18</sup>. De acuerdo a la Tabla 17, la normatividad mexicana establece como límite máximo 100 UFC/mL, pues para que éste patógeno produzca la dosis necesaria de enterotoxinas (1 a 5 µg) capaz de provocar intoxicación alimentaria se requieren de por lo menos  $10^5$  UFC de *S. aureus* por cada gramo de alimento contaminado<sup>35</sup>. Como se muestra en la Tabla 17 no se detectó la presencia de *Staphylococcus aureus* en la dilución  $10^{-1}$  para las tres muestras evaluadas, lo que indica que los tres yogurt evaluados son de buena calidad. En la Figura 19 se observa la ausencia de éste utilizando como medio selectivo Agar Baird- Parker con suspensión de yema de huevo para el Yogurt B.



Figura 19. Aislamiento de *Staphylococcus aureus* en Agar Baird-Parker incubado a 35°C por 48 h.



### **3.2 Objetivo Particular 2: Químico proximal y determinaciones fisicoquímicas**

Como se planteó en el objetivo 2 cada uno de los yogurts seleccionados fueron sometidos a un análisis químico proximal, con la finalidad de determinar su composición química y poder analizar más adelante los nutrientes disponibles que ayuden a promover o inhibir el desarrollo de los microorganismos presentes en el yogurt, tanto de las BAL como de los inoculados intencionalmente. Así mismo, se llevaron a cabo determinaciones fisicoquímicas con el objetivo de evaluar las condiciones del medio que permitan predecir la capacidad de los microorganismos, para proliferar en el yogurt en determinado momento. Los resultados experimentales obtenidos se resumen en la Tabla 18, donde se muestran los promedios de las repeticiones para cada ensayo realizado, así como la comparación de éstos con las especificaciones establecidas por la normatividad mexicana.

Tabla 18. Resultados de los análisis fisicoquímicos contrastados con las especificaciones normativas.

Determination	Norma	Experimental		
		Yogurt A	Yogurt B	Yogurt C
Proteína	2.9% <sup>II</sup> mín.	2.49 <sup>a</sup> ± 0.030	2.80 <sup>b</sup> ± 0.163	1.30 <sup>c</sup> ± 0.045
Grasa	15% <sup>II</sup> máx.	0.60 <sup>a</sup> ± 0.007	1.32 <sup>b</sup> ± 0.082	1.82 <sup>c</sup> ± 0.026
Carbohidratos totales *	NE	12.92 <sup>a</sup>	10.61 <sup>b</sup>	14.35 <sup>c</sup>
Azúcares ART	NE	9.22 <sup>a</sup> ± 0.188	10.45 <sup>b</sup> ± 0.407	11.67 <sup>c</sup> ± 0.091
°Brix		12.3 <sup>a</sup> ± 0.0	10.39 <sup>b</sup> ± 0.0	13.66 <sup>c</sup> ± 0.01
Cenizas	NE	0.16 <sup>a</sup> ± 0.003	0.14 <sup>b</sup> ± 0.001	0.06 <sup>c</sup> ± 0.006
Humedad	NE	83.84 <sup>a</sup> ± 0.251	85.13 <sup>b</sup> ± 0.067	82.46 <sup>c</sup> ± 0.049
pH	4.5 <sup>I</sup> máx.	4.22 <sup>a</sup> ± 0.015	4.20 <sup>a</sup> ± 0.01	4.13 <sup>b</sup> ± 0.013
Acidez	0.5% <sup>I,II</sup> mín.	0.83 <sup>a</sup> ± 0.005	0.99 <sup>b</sup> ± 0.005	0.46 <sup>c</sup> ± 0.013
Sólidos Lácteos No Grasos (SLNG)**	8.25% <sup>II</sup> mín	15.56 <sup>a</sup>	13.56 <sup>b</sup>	15.71 <sup>a</sup>

NE. Valor No Establecido por Normatividad.

ART. Azúcares Reductores Totales

<sup>a,b,c</sup> Las letras distintas entre cada determinación indican que existe diferencia significativa con P < 0.05 entre los yogurts

\*Valor obtenido por diferencia

\*\*Valor obtenido de acuerdo a la NOM-155-SCFI-2012. Leche-Denominaciones, especificaciones fisicoquímicas, información comercial y métodos de prueba. Pág. 20, numeral 8.4.

<sup>I</sup> Límites establecidos en la NOM-243-SSA1-2010. Productos y servicios. Leche, fórmula láctea, producto lácteo combinado y derivado lácteo. Disposiciones y especificaciones sanitarias. Métodos de prueba. Pág. 10, numeral 6.2.3.1.

<sup>II</sup> Límites establecidos en la NOM-181-SCFI-2010. Yogurt-Denominación, especificaciones fisicoquímicas y microbiológicas, información comercial y métodos de prueba. Pág. 6, Tabla 1



En la Tabla 18 se muestra el valor de la desviación estándar para cada uno de los ensayos bromatológicos, con el objetivo de dar validez estadística a los resultados. De acuerdo a Nielsen (2003), los valores de las tres repeticiones para cada determinación presentaron resultados muy cercanos a la media en general, es decir, son bastante precisos y por lo tanto, el promedio de éstas es confiable para utilizarse como base en la contrastación de resultados, pues presentan coeficientes de variación menores al 5%. Por otro lado, las letras asignadas a cada resultado corresponden al análisis estadístico para la comparación entre los tres yogurts, las letras iguales indican que no existe diferencia significativa, mientras que letras diferentes establecen que existe una  $P \geq 0.05$  lo que indica diferencia estadística entre ellos<sup>46</sup>.

De acuerdo con la Norma Oficial Mexicana las especificaciones que deben ser monitoreadas durante el proceso de elaboración del yogurt, son: proteínas, grasas, acidez y pH, quedando exentos valores como humedad, minerales y carbohidratos. La NOM-181-SCFI-2010 establece únicamente las especificaciones fisicoquímicas que debe cumplir la mezcla de ingredientes lácteos previa a la adición de componentes no lácteos, tales como: edulcorantes, frutas, jugos, pastas, especias y otros alimentos aromatizantes, así como gelatinas y almidones<sup>26</sup>. Tomando en cuenta lo anterior y el hecho de que los tres yogurts analizados están adicionados de acuerdo a su etiqueta con jarabes saborizados, almidón, pectina, sucralosa, vitaminas, azúcar y algunas sales minerales, el balance total en su composición se ve alterado, dando como resultado que el contenido de proteína sea menor al esperado 2.9% al igual que el contenido de grasa, incrementándose por otra parte el contenido de carbohidratos.

En cuanto al contenido de proteínas reportado en la Tabla 18, todos los yogurts presentaron diferencias significativas entre ellos. El yogurt C es el que presentó menor porcentaje 1.3%, seguido del yogurt A 2.49%, mientras que el B fue el que presentó mayor cantidad 2.8%. El aporte proteico de estos productos se considera bajo en comparación con los yogurts batidos o firmes que tienen un aporte del 4.2%<sup>21,114</sup> debido a que se caracterizan por su bajo contenido de sólidos lácteos,





los cuales son indispensables para el desarrollo de la consistencia y aportan el mayor contenido de proteínas<sup>69</sup>.

En cuanto al porcentaje de grasa, las tres muestras cumplen con lo establecido en la norma al contener menos del 15% de ésta, sin embargo, los valores de grasa entre los yogurts presentan diferencias significativas; como se muestra en la Tabla 18, el yogurt A con 0.6% es el de menor cantidad de grasa, pues en su formulación sólo utilizan leche descremada en comparación con el yogurt B y el C los cuales presentan mayor contenido de grasa, de 1.32% y 1.82% respectivamente, éste aumento es debido a que son formulados con leche parcialmente descremada, además, el yogurt C tiene un mayor contenido de grasa que el B por estar adicionado con crema y sólidos de leche, siendo el de mayor aporte, mientras que el B sólo está adicionado con grasa de leche. De acuerdo a lo anterior, se puede afirmar que estas variaciones dependen en gran medida del tipo de leche así como de la adición de algunos ingredientes lácteos como los ya mencionados<sup>109</sup>.

De acuerdo a la lista de ingredientes aquellos que contribuyen al aporte de carbohidratos en los yogurts son: azúcar, almidón modificado, pectina y sucralosa, sin embargo, la normatividad establece que éstos deben ser usados en las menores concentraciones posibles, en el caso de la pectina y el azúcar siguiendo las BPM, mientras que para el almidón modificado establece una dosis máxima del 2%, y para la sucralosa en éste tipo de productos en específico la NOM-086-SSA1-1994 establece que se adicione siguiendo las BPM y el CODEX STAN 192-1995 marca un límite máximo de 0.3%, por lo que existe variación muy significativa entre el porcentaje de carbohidratos totales encontrados en cada uno. Por ejemplo, el yogurt B es el que tiene menos carbohidratos 10.61%, ya que es el único que contiene sucralosa en su formulación, que al ser un endulzante no calórico de alta intensidad con un dulzor relativo equivalente a 600 veces el del azúcar<sup>24</sup> permite reducir éstos en comparación con los yogurts A y C que al ser endulzados en su totalidad con azúcar el contenido de carbohidratos incrementa, presentando un porcentaje de 12.92 y 14.35% respectivamente. Además el A y B



contienen una combinación de pectina y almidón que además de ser adicionados por su función prebiótica<sup>34</sup>, también tienen un efecto como estabilizantes, cuya interacción permite el uso de concentraciones menores en mezcla para proporcionar consistencias similares a las obtenidas si sólo se utilizara uno de ellos, por presentar un efecto sinérgico<sup>104</sup>; al comparar estos con el yogurt C que tiene únicamente almidón, se puede ver que el aporte de carbohidratos es mayor. Cabe señalar que por ser yogurts comerciales siempre existe diferencias tanto en dulzor como en consistencia que caracterizan la marca registrada de cada fabricante.

El edulcorante utilizado en los yogurts A y C es la sacarosa principalmente y en el yogurt B son la sacarosa y sucralosa, para su cuantificación se utilizó la técnica de ART por el método de Fehling, sin embargo, existen una serie de factores que pueden alterar los resultados de esta determinación<sup>72</sup>, por lo que se utilizaron los °Brix para tener una segunda referencia que permita estimar el contenido de azúcares<sup>71,72</sup>. De acuerdo con los resultados de carbohidratos totales, el yogurt con menor contenido es el B, seguido del A y el C, pero, al analizar los resultados reportados en la Tabla 18 (página 62), únicamente la medición de °Brix sigue éste comportamiento, mientras que ART presenta valores diferentes a lo esperado. Para el yogurt B no existe diferencia significativa entre los valores de ART y °Brix, por otra parte, para los yogurts A y C, los resultados de ART muestran desviaciones significativas con respecto a la lectura de °Brix, dichas desviaciones pueden adjudicarse a las dos técnicas, por un lado, °Brix se utiliza para medir los sólidos solubles que si bien están integrados mayoritariamente por azúcares también cuantifica minerales, proteínas solubles, ciertos ácidos orgánicos, saborizantes y algunas sales tales como lactato de calcio y sorbato de potasio<sup>71,72</sup>, éstos últimos declarados en las etiquetas de los yogurts A y B, que en conjunto pueden llevar a las desviaciones encontradas. Por otro lado, las desviaciones en ART se adjudica a dos razones, la primera, a la presencia de carbohidratos complejos que intervienen directamente con la hidrólisis a la que fue sometida la muestra<sup>72</sup> para romper los enlaces glucosídicos de los disacáridos como la

sacarosa y sucralosa, y así liberar los azúcares reductores, además de la ruptura de enlaces de algunos carbohidratos complejos como el almidón y la pectina<sup>20</sup> y la segunda, por el desarrollo de la reacción de Maillard que puede interferir con la determinación<sup>30</sup>.

Tomando en cuenta el tipo de carbohidratos en las muestras, y los resultados obtenidos de ART en éstas y las diferencias tan marcadas al compararlas con los °Brix, se decidió que éstas podían deberse a una hidrólisis incompleta y se pensó que siguiendo las condiciones marcadas por la técnica estándar de 70°C por una hora, no se lograba una hidrólisis total de éstos. Por lo anterior, se procedió a hidrolizar las muestras durante tiempos mayores como se muestra en la Tabla 19, debido a que en la bibliografía, dependiendo el autor consultado existen metodologías donde la hidrólisis se prolonga hasta por una semana a temperatura ambiente<sup>55</sup>.

Tabla 19. Porcentajes de ART obtenidos a diferentes condiciones de hidrólisis.

Condiciones de hidrólisis		% ART		
Tiempo (h)	Temperatura (°C)	Yogurt A	Yogurt B	Yogurt C
1	70 ± 2	6.16	7.43	5.06
2	70 ± 2	7.58	10.44	8.51
3	70 ± 2	9.03	10.45	10.39
12	60 ± 2	9.22	---	11.67

De acuerdo con la Tabla 19, el yogurt B solo requirió de 2 horas para dar resultados constantes por tener la menor concentración de azúcares y estabilizantes, mientras que los yogurts A y C requirieron de 12 horas para dar resultados aproximados a los esperados. Cabe mencionar que las muestras A y C no fueron hidrolizadas por más tiempo, por haber observado en éstas el desarrollo de la reacción de Maillard, ya que la hidrolisis además de romper los enlaces glucosídicos favoreció la desnaturalización de las proteínas en péptidos y aminoácidos<sup>71</sup> que por tener grupos amino libres promovieron la reacción de éstos

con el grupo carbonilo de los azúcares<sup>30,12</sup>, tal como se ilustra en la Figura 20, la cual muestra la primera etapa de ésta reacción para el caso específico de la glucosa donde se da la formación del compuesto de Amadori, como principal intermediario de reacción, el cual conserva su capacidad reductora<sup>12</sup>.

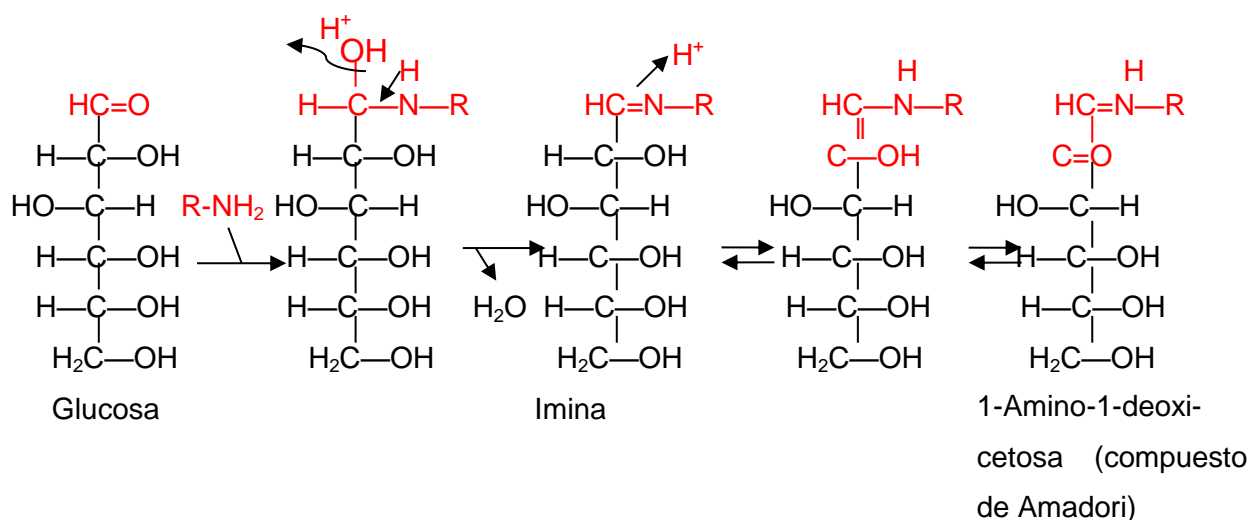


Figura 20. Fase inicial de la reacción de Maillard.

Fuente: Belitz, Grosch, & Schieberle, 2011.

Los compuestos de Amadori son la base de numerosos productos secundarios, que desencadenan en la formación de pirazinas, pirroles, furanos, tiazoles, melanoidinas entre otros, que contribuyen al desarrollo de sabores y pigmentos característicos de la reacción, los cuales no presentan capacidad<sup>30</sup> por lo que su cuantificación no es posible durante la titulación con el reactivo de Fehling<sup>55</sup>. Esta reacción fue detectada en las muestras A y C después de su hidrólisis por el color pardo característico<sup>30,12</sup>, desarrollándose para la muestra A un color más oscuro que puede atribuirse a su mayor contenido de proteínas<sup>12</sup>, obteniendo como consecuencia menos azúcares 9.22% de los declarados en la etiqueta, de la misma manera para el C se obtuvo 11.67% que también se encuentra por debajo del valor reportado en la etiqueta, mientras que para el yogurt B no se detectó la coloración por lo que se estima que la reacción de Maillard no fue favorecida en este caso.

En cuanto al porcentaje de cenizas, la normatividad mexicana no establece límites, por lo que se utilizó como referencia la composición química promedio reportada por Yildiz (2010), la cual establece que los elementos inorgánicos que están presentes mayoritariamente en el yogurt líquido son: potasio, calcio, cloro, sodio y otros minerales en menor proporción como hierro. De acuerdo a los resultados de la Tabla 18 (página 62) el yogurt con más aporte es el A con un 0.16%, presentando diferencia significativa con el yogurt B que tiene 0.14%, estas variaciones se atribuyen al enriquecimiento del yogurt A con lactato de calcio declarado en su etiqueta, que es una sal de calcio comúnmente utilizada para leches fermentadas y otros productos lácteos<sup>43,81</sup>, así mismo, el yogurt B contiene un aporte alto de minerales que podría atribuirse a las características de la materia prima, mientras que el yogurt C es el de menor cantidad de minerales 0.06% pudiendo haber sido elaborado a partir de leche con bajas concentraciones de minerales o no estar enriquecido, por no declarar algún ingrediente que lo evidencie. Éstas variaciones para el contenido de minerales entre los yogurts pueden ser atribuidas a factores genéticos, climáticos, prácticas de cultivo, condiciones de proceso, ingredientes incorporados en la formulación, etc.<sup>12</sup>.

La NOM-181-SCFI-2010 no establece límites máximos o mínimos para el contenido de humedad en el yogurt, debido a que la funcionalidad del agua en éste alimento es principalmente como disolvente, utilizado para reconstruir y/o rehidratar algunos ingredientes que así lo requieran como la leche en polvo para el caso específico del yogurt A. Comparando entre sí los valores obtenidos se puede afirmar que si bien existe diferencia estadísticamente significativa entre cada muestra no es tan grande como para otras determinaciones, ya que tomando como referencia al yogurt C por tener la menor cantidad de humedad del 82.46%, presenta una diferencia mínima con respecto al yogurt B 85.13% y al yogurt A 83.84%. De acuerdo al valor promedio reportado por Yildiz (2010) el yogurt líquido tiene una humedad aproximada de 84.4% que al ser comparado con los resultados obtenidos se consideran aceptables, esta variabilidad puede deberse a las diferentes formulaciones empleadas en la elaboración de cada uno de estos.



Por su consistencia, se podría pensar que el yogurt líquido tiene mayor cantidad de agua que un yogurt batido o firme, sin embargo, esto no es así ya que de acuerdo a los valores reportados por CESNID (2008) y Yildiz (2010) se observa que el contenido de humedad del yogurt batido varía en un intervalo entre 86-87%, por lo que la consistencia no se debe al porcentaje de agua, si no al proceso de batido al que es sometido después de la fermentación, el cual provoca la ruptura de la estructura del gel proporcionándole su apariencia líquida<sup>109</sup> además de la adición de estabilizantes<sup>12</sup> como el almidón para el yogurt C y una mezcla de almidón y pectina para el A y B de acuerdo a los ingredientes declarados, que ligan el agua, evitando así su determinación por el método de estufa de aire<sup>55,72</sup>.

El monitoreo del pH y acidez en la elaboración de yogurts se debe a dos razones principales, la primera y más importante relacionada con el control del proceso de elaboración es el pH, que describe la actividad y concentración de iones hidronio ( $H_3O^+$ ) en el alimento con la finalidad de no exceder un límite determinado y con ello impedir el desarrollo de los cultivos lácticos<sup>71</sup>, mientras que la segunda está más relacionada con el control de la concentración del ácido láctico que se va generando por la acción de las BAL sobre la lactosa de la leche<sup>12</sup> y que es utilizado como un indicador del impacto de los ácidos en el gusto<sup>71</sup>, es decir, la acidez está más relacionada con las preferencias del consumidor y puede ser variable. En cuanto a la especificación de pH, en la NOM-181-SSA1-2010 se establece un máximo de 4.5 habiendo encontrado que los tres yogurts cumplen con éste parámetro. Como se sabe el valor de pH y acidez tienen cierta relación, ya que a valores más bajos de pH corresponden porcentajes más altos de acidez<sup>72</sup> como ocurre con los yogurts A y B que a pesar de no tener diferencias significativas en cuanto a pH presentando valores de 4.2 (ver Tabla 18, página 62), sus valores de acidez son estadísticamente diferentes 0.83% y 0.99% para el A y B respectivamente, sin embargo, para el caso del yogurt C, como se observa en la Tabla 18 mientras el pH es similar a los otros 4.13 (página 62), la acidez obtenida es menor, reportando únicamente 0.46% de ácido láctico que es significativamente diferente ( $P \geq 0.05$ ), esto puede deberse a la presencia de



algunas sales aniónicas, no declaradas en los ingredientes, que pueden interferir en la valoración surgiendo nuevos iones hidrógenos a partir de las moléculas no disociadas anteriormente, por lo que éstos últimos no alcanzan a ser valorados, dando como resultado un porcentaje de acidez menor al esperado, mientras que el pH no se ve afectado pues la actividad de iones hidronio continúa a pesar de la presencia de sales aniónicas<sup>71,72</sup>.

Los Sólidos Lácteos No Grasos (SLNG) del yogurt se refieren principalmente a la lactosa, proteína y minerales<sup>107</sup>, un yogurt con bajo contenido de sólidos no grasos sería poco aceptable por el consumidor, debido a que la variación en su contenido tiene influencia muy significativa en propiedades como la textura y la viscosidad<sup>107,114</sup>. Como se muestra en la Tabla 18 (página 62), los tres yogurt evaluados cumplen con el mínimo requerido por la normatividad teniendo más del 8.25% de sólidos lácteos. Para la fortificación de la base del yogurt con sólidos lácteos existen diferentes métodos, uno de ellos es mediante la adición de leche descremada en polvo (SMP, por sus siglas en inglés) como se reporta en la etiqueta para el caso específico de los yogurts A y C, por tal motivo, entre éstos dos yogurts no hay diferencia estadística ( $P \leq 0.05$ ) y son los que tienen mayor contenido de sólidos lácteos, 15.56% y 15.71% respectivamente, en comparación con el B el cual es estadísticamente diferente ( $P \geq 0.05$ ) a los anteriores y presenta únicamente 13.56% de SLNG.

La NOM-051-SCFI/SSA1-2010 establece: “Los nutrimentos que deben de ser declarados obligatoriamente en la etiqueta son carbohidratos, proteínas, grasas y minerales, así mismo también se indica que la información contenida en éstas debe ser veraz, describirse y presentarse en forma tal que no induzca al consumidor a un error con respecto a la naturaleza y características del producto, y queda prohibido el uso de declaraciones que no puedan comprobarse” por lo que se consideró importante verificar el cumplimiento de lo establecido para cada producto evaluado. En la Tabla 20 se hace una comparación de los valores experimentales obtenidos con los reportados por el fabricante de cada yogurt.

Tabla 20: Resultados del Análisis Químico Proximal y contrastación de los valores con la etiqueta de cada producto evaluado.

Determinación	Yogurt A		Yogurt B		Yogurt C	
	Etiqueta	Experimental	Etiqueta	Experimental	Etiqueta	Experimental
Carbohidratos totales*	12.4	12.92	9.7	10.61	14.57	14.35
Azúcares (ART)	11.40	9.22	9.3	10.45	12.93	11.67
Proteína	2.8	2.49	2.5	2.80	1.64	1.30
Grasa	0.6	0.60	1.3	1.32	1.64	1.82
Cenizas	0.203	0.16	0.14	0.14	0.092	0.06

\*Valor experimental obtenido por diferencia.

Los valores reportados en la etiqueta no son iguales a los obtenidos por las determinaciones bromatológicas al comparar los datos proporcionados en la Tabla 20, debido a que la NOM-051-SSA1-2010 establece que éstos “deben ser valores medios derivados por análisis, bases de datos o tablas reconocidas internacionalmente”. Las diferencias encontradas pudieran llegar a ser significativas para el caso de los valores reportados para cenizas, proteínas y ART que reportan variaciones mayores al 10% con respecto a los valores establecidos en la etiqueta, mientras que para carbohidratos totales y grasa la variación es menor al 10%.

De acuerdo a la NOM-051-SSA1-2010 además de indicar la cantidad de carbohidratos disponibles es necesario especificar la cantidad correspondiente de azúcares. En la Tabla 20 se muestra que para carbohidratos totales en el yogurt A y C los valores experimentales concuerdan con los de la etiqueta, mientras que los valores para ART son menores a los esperados, sin embargo, ésta desviación no evidencia un incumplimiento, ya que puede atribuirse a las dificultades anteriormente discutidas por lo que pudieron estar presentes aunque su cuantificación no fue posible por el desarrollo de la reacción de Maillard, mientras para el yogurt B tanto los Carbohidratos totales (10.61%) y ART (10.45%) se





encuentran por arriba del porcentaje esperado 9.7% y 9.3% respectivamente, lo que corrobora una posible desviación del valor reportado por el fabricante.

Al comparar los valores obtenidos de proteína con los reportados en la etiqueta, de acuerdo a la Tabla 20 (página 71), se puede ver que los yogurts A y C contienen menor cantidad de proteína 2.49% y 1.30% respectivamente, de la que está declarada en su tabla nutrimental 2.8% y 1.64%, presentando una desviación, mientras que para el yogurt B ocurre lo contrario, reportando menos proteínas de las obtenidas 2.8%.

Para el porcentaje de grasa, los valores experimentales tanto del yogurt A con 0.6%, como del B con 1.32% son iguales con el reportado en su etiqueta. Además es importante mencionar que aunque solo el yogurt B declara que es “bajo en grasa”, el yogurt A, de acuerdo a la NOM-086-SSA1-1994, también entra en esta clasificación por tener menos de 1.5% de grasa. Por otro lado el yogurt C, es el que más grasa presentó 1.82% existiendo una desviación con el reportado, así mismo en su etiqueta el porcentaje de proteína y grasa es igual, pero los resultados difieren, determinando un aumento en grasa que provoca un menor aporte proteico.

En cuanto a las cenizas se esperaba encontrar un porcentaje mayor al estimado debido a que el porcentaje establecido en la etiqueta únicamente considera los porcentajes de sodio y de calcio los cuales es obligatorio reportar en la tabla nutrimental de cada muestra de acuerdo con las especificaciones de la NOM-051-SSA1-2010 y no considera algunos otros minerales presentes en el yogurt como potasio, cloro, hierro, entre otros<sup>114</sup>, sin embargo, no fue así, debido a que la técnica de calcinación a 500 – 550°C, provoca que algunos minerales contenidos en la muestra puedan convertirse en óxidos, fosfatos y sulfatos, o ser volatilizados como el sodio, hierro y potasio<sup>53,71,72</sup> ocasionando variaciones muy significativas. En la Tabla 21 se reporta el contenido de sodio y calcio contenidos en cada yogurt de acuerdo a su etiqueta.



Tabla 21. Porcentajes de sodio y calcio para los yogurts.

Mineral	Yogurt A	Yogurt B	Yogurt C
Calcio	0.157 %	0.08 %	0.063 %
Sodio	.046 %	0.06 %	0.0319 %

De acuerdo con la Tabla 20 (página 71) para los yogurts A y C los resultados obtenidos en cuanto al porcentaje de cenizas son 0.16% y 0.06% respectivamente, éstos porcentajes medidos coinciden con el porcentaje de calcio reportado en la etiqueta de cada producto (Tabla 21), por lo que se estima que el sodio y demás minerales pudieron haber sido volatilizados como se mencionó anteriormente<sup>53,71,72</sup>, en cuanto al yogurt B se observa que el porcentaje determinado por el método analítico 0.14% es mayor que el porcentaje de calcio reportado en la etiqueta 0.063% esta diferencia puede deberse a que la técnica por calcinación cuantifico un mineral extra que no estaba presente en los otras muestras, se estima que este mineral es el cloro el cual no es volatilizado durante la incineración debido a que reacciona para formar cloruros<sup>55</sup> y que ésta presente en el alimento debido a la adición de Sucralosa como endulzante, cuya fórmula química es triclorogalactosacarosa que contribuye al aporte de cenizas.



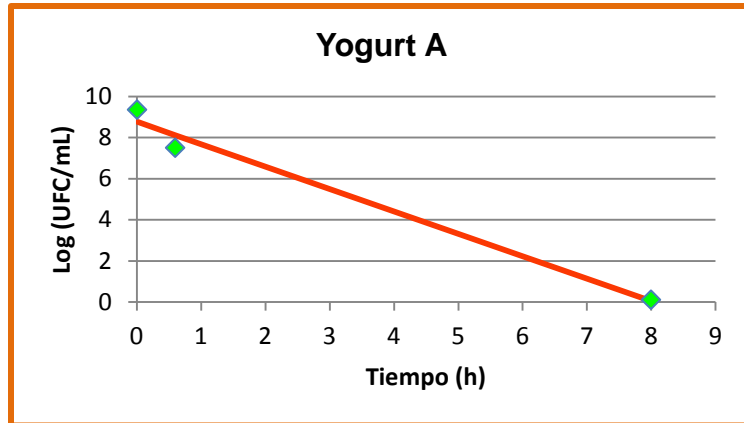
### 3.3 Objetivo Particular 3: Curvas de supervivencia.

Debido a que la presencia de *Escherichia coli* es más común en alimentos ácidos, representando un riesgo para la salud del consumidor, se evaluó la supervivencia de una cepa aislada de un caso clínico utilizada como indicador de calidad ya que diversos estudios demostraron que algunas cepas de *Escherichia coli*, como: *E. coli* ATCC 8739<sup>11</sup>, *E. coli* M23 OR.H-<sup>101</sup>, *E. coli* K12 MG1655<sup>42</sup>, *E. coli* NCTC 12900<sup>86</sup> y *E. coli* ATCC 43888<sup>88</sup> presentan curvas de supervivencia bacteriana similares al comportamiento de patógenos. Las curvas de supervivencia fueron obtenidas a partir del conteo de *E. coli* siguiendo el procedimiento establecido en la metodología (página 51) a las dos temperaturas de almacenamiento 4 y 37°C (4°C para simular condiciones de refrigeración y 37°C por ser la temperatura óptima de crecimiento del microorganismo indicador). Los datos obtenidos fueron posteriormente ajustados a uno de los modelos matemáticos disponibles en el Software GInaFiT 1.6, que permite conocer los parámetros cinéticos que describen los diferentes comportamientos inhibitorios<sup>42</sup>.

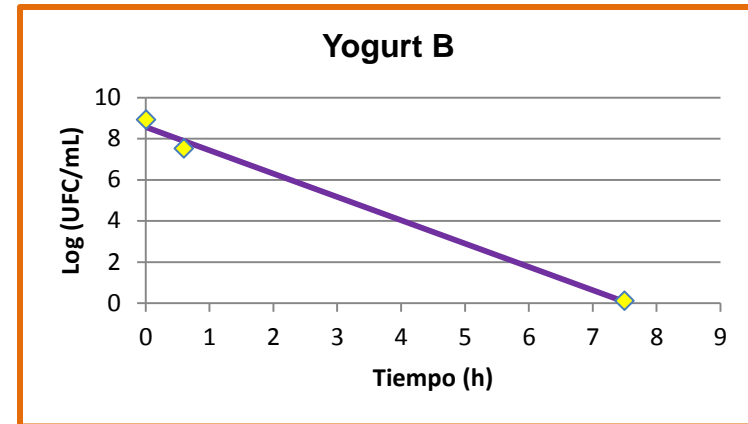
Los resultados obtenidos por el ajuste de los datos experimentales recabados a 37°C se muestran en la Figura 21 donde se observa el promedio de las repeticiones realizadas para los tres yogurts (los datos obtenidos de cada muestra para la realización de las curvas de supervivencia se presentan en el Anexo A). Los resultados obtenidos en el presente estudio para los 3 yogurts estudiados fueron similares entre sí y pueden ser ajustados siguiendo el modelo propuesto por Bigelow & Esty (1920), el cual describe una inactivación lineal que es común en alimentos donde la muerte de microorganismos es acelerada de acuerdo con lo encontrado en diversas investigaciones por Labuza (1984).



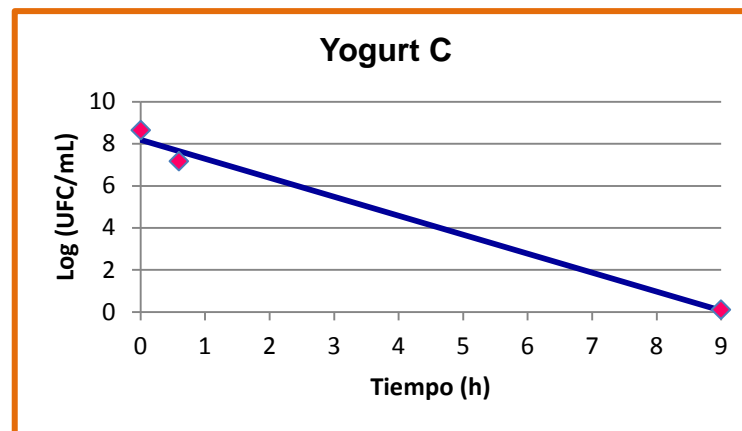
Curvas de inhibición a 37°C



Yogurt A. *Lactobacillus casei* Shirota – *Streptococcus thermophilus*



Yogurt B. *Lactobacillus johnsonii* – *Streptococcus thermophilus*



Yogurt C. *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* – *Streptococcus thermophilus*

Figura 21. Ajuste de las curvas de supervivencia de *E. coli* en los tres yogurts a 37°C.

Fuente: Bigelow, W.D. & Esty, J.R. (1920). The thermal death point in relation to typical thermophylic organisms. *Journal of Infectious Diseases*, 27, 602.

## Resultados y Análisis de Resultados

En un tiempo inicial, para los tres yogurts se estima una disminución de 1.5 ciclos logarítmicos aproximadamente en 0.6 horas lo que demuestra una rápida inhibición de la cepa de *E. coli* a éstas condiciones, sin embargo, el seguimiento de la medición se realizó alrededor de las 8 horas de almacenamiento, tiempo en el que no fue posible determinar la presencia de alguna colonia bacteriana de *E. coli*, por lo que se estima que la inhibición se dio en un tiempo significativamente menor a 8 horas. Como no se pudieron graficar más puntos, se propuso una inactivación lineal, sin embargo, para realmente conocer la curva de supervivencia se requieren por lo menos de 5 puntos, por lo que, los parámetros cinéticos obtenidos por dicho modelo no pueden ser utilizados.

Lo anterior se confirma utilizando como criterio la Raíz del Error Cuadrático Medio (RMSE), que es uno de los parámetros proporcionados por el software el cual permite evaluar la diferencia entre los valores estimados por la predicción de acuerdo al modelo ocupado y el valor real de las mediciones, que fue seleccionado entre los otros disponibles por ser considerada la medida más simple e informativa de la bondad de ajuste tanto para modelos lineales como para no lineales, además se muestra en la columna tres, el valor del Coeficiente de Determinación ( $R^2$ ), como la medida estadística comúnmente utilizada para describir el ajuste de datos a una línea recta. En la Tabla 22 se reportan éstos valores para cada yogurt (en el Anexo A se encuentran reportados los otros parámetros estadísticos disponibles para el análisis del ajuste).

Tabla 22. Ajuste de datos a 37°C para el modelo lineal.

Yogurt	RMSE	$R^2$
A	0.8561	0.9847
B	0.5166	0.9940
C	0.6611	0.9895

De acuerdo con la Tabla 22, los valores que mejor describen un comportamiento lineal son los obtenidos por el yogurt B al presentar un  $R^2$  más cercano a 1 ( $R^2=0.9940$ ) y un RMSE menor (RMSE=0.5166) y el A es el que mayor variación

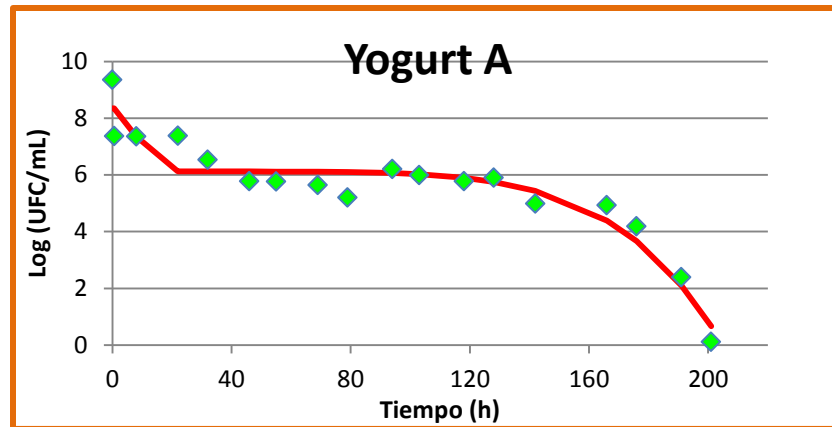
presenta con  $RMSE=0.8561$  y una  $R^2=0.9847$ . La variación en los valores reportados puede adjudicarse a la falta de mediciones, por contar únicamente con tres puntos que respalden éste comportamiento o a que la inhibición se ajusta a otro modelo diferente al lineal, sin embargo, para hacer un ajuste a un modelo diferente se requiere contar con un mínimo de 10 mediciones que permitan validar el modelo<sup>28</sup>. Con base en lo citado anteriormente no es posible utilizar los valores de  $K_{max}$  y  $\text{Log}(N_0)$  proporcionados por el modelo para llevar a cabo una comparación objetiva de las velocidades de inhibición registradas en cada sistema a ésta temperatura de almacenamiento, sin embargo, los valores obtenidos son reportados en el Anexo A.

La rápida inhibición de la cepa de *E. coli* evaluada, se debe a la temperatura de almacenamiento de  $37^\circ\text{C}$ , ya que de acuerdo con diversos estudios realizados una temperatura más alta da como resultado una tasa de mortalidad más elevada, siempre y cuando no se excedan los límites de tolerancia térmica<sup>28,86,101</sup>. A ésta temperatura las BAL continúan con su actividad proteolítica y con la fermentación de los azúcares acidificando más rápido el medio, provocando una disminución del pH de 5 a 4 registrado a las 8 horas de almacenamiento, lo que conduce a la muerte acelerada de *E. coli* por efecto de la concentración elevada de los ácidos orgánicos, principalmente del ácido láctico, considerado como el principal agente inhibidor del crecimiento de microorganismos Gram-negativos<sup>90,3</sup>, así como de otros metabolitos inhibidores, tales como peróxido de hidrógeno, acetaldehído, acetoína, entre otros<sup>31,84</sup> que dependen de la combinación de bacterias lácticas en cada yogurt.

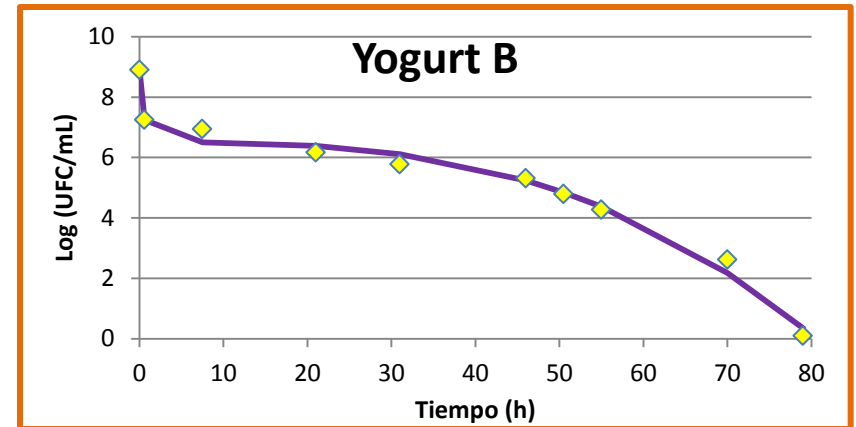
Al comparar los tiempos de inhibición registrados en la Figura 21 obtenidas a  $37^\circ\text{C}$  con las curvas de la Figura 22 a  $4^\circ\text{C}$ , se puede observar que a ésta última temperatura el tiempo de inhibición es considerablemente mayor, por lo que se puede apreciar las diferentes fases encontradas en la supervivencia de *E. coli* como la fase de transición, en la que se observa una rápida inhibición del indicador en las primeras horas, una fase donde se registra una resistencia a la muerte celular y la última fase en la que se lleva a cabo la inhibición total.



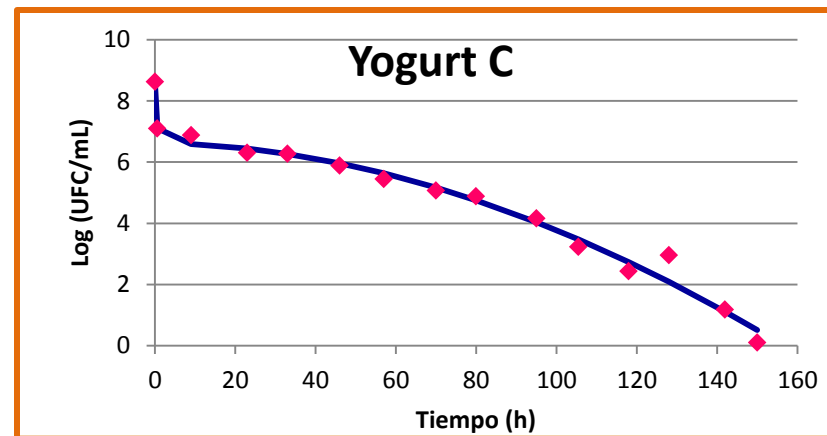
Curvas de inhibición a 4°C



Yogurt A. *Lactobacillus casei* Shirota – *Streptococcus thermophilus*



Yogurt B. *Lactobacillus johnsonii* – *Streptococcus thermophilus*



Yogurt C. *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* – *Streptococcus thermophilus*

Figura 22. Ajuste de las curvas de supervivencia de *E. coli* en los tres yogurts a 4°C.

Fuente: Coroller et al. (2006). General Model Based on Two Mixed Weibull Distributions of Bacterial Resistance for Describing Various Shapes of Inactivation Curves. *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 6493-6502.



De acuerdo con lo establecido por Coroller y colaboradores (2006), las curvas de supervivencia para los yogurts B y C presentan un buen ajuste al Modelo de Doble Weibull con valores de RMSE de 0.3511 y 0.3386 respectivamente, mientras que para el yogurt A, el ajuste no fue tan adecuado, presentando el valor más alto  $RMSE=0.6684$ , sin embargo, fue ajustado a éste modelo por no contar con otro que describiera con mayor precisión los datos.

El modelo de Doble Weibull se basa en la suposición de la existencia de dos subgrupos que tienen diferentes niveles de resistencia al estrés y que coexisten en una misma población bacteriana, siendo el primero de ellos el más vulnerable<sup>28</sup>. Para el caso de los yogurts B y C de acuerdo con la Figura 22 ésta primera subpoblación está integrada por los dos primeros valores obtenidos en la gráfica que describen una inhibición de la cepa inoculada de *E. coli* de 2 ciclos logarítmicos en un periodo de 36 minutos, mientras que la segunda subpoblación se distingue a partir del tercer punto, que describe una inhibición de tipo convexo después de 80 horas para el yogurt B y de 160 horas para el yogurt C que duplica el tiempo de inhibición del anterior. Para el yogurt A los datos experimentales muestran la presencia de tres diferentes subpoblaciones; la primera integrada por los dos primeros puntos que al igual que el yogurt B y C muestra una reducción 2 ciclos logarítmicos en un periodo de 36 minutos, la segunda subpoblación abarca de 0.6 a 46 horas donde se observa una resistencia de 22 horas, después de las cuales se reducen 1.5 ciclos logarítmicos y la tercera subpoblación abarca de las 46 a 201 horas donde se completa la inhibición, sin embargo, por no contar con un modelo adecuado para la descripción de éste tipo de comportamiento, los datos se ajustaron a un modelo de Doble Weibull en el cual se puede diferenciar el primer grupo hasta las primeras 20 horas de la inhibición con una reducción aproximada de 2 ciclos logarítmicos, mientras que la segunda población se conforma de una fase estacionaria de 106 horas que finaliza con una inhibición de tipo convexa a las 201 horas de almacenamiento a 4°C.





Diversos estudios como el realizado por Holzapfel, Geisen y Schillinger (1995) y más recientemente por Alakomi y colaboradores (2000) han demostrado que de los metabolitos antimicrobianos producidos por las BAL, los ácidos orgánicos, en especial el ácido láctico, es el principal responsable de la inhibición de las bacterias Gram-negativas como el caso de *E. coli*. En general, la forma no disociada del ácido láctico puede penetrar con mayor facilidad la pared celular a causa de su solubilidad en grasa<sup>50</sup>, donde el pH más alto del interior de la célula promueve la disociación de éste, dando lugar a la liberación de iones hidrógeno y su anión correspondiente reduciendo el pH; de modo que ambos iones interfieren en el metabolismo e inhiben el crecimiento<sup>92</sup>, pudiendo causar la muerte debido a que las enzimas en el citoplasma no pueden funcionar por debajo de un pH neutro<sup>51</sup>.

Estudios realizados por Ogawa y colaboradores (2001) sugieren que el mecanismo de inhibición del ácido láctico se puede dividir en dos fases, siendo la primera una fase bacteriostática y la segunda una fase bactericida, dentro de las cuales pueden ocurrir otros eventos diferentes. Sin embargo, las curvas obtenidas por el modelo de ajuste (Figura 22, página 78), difieren en un principio ya que la primer población de *E. coli* muestra un efecto bactericida debido a su sensibilidad al medio, mientras que la segunda población se adapta completamente al mecanismo propuesto por Ogawa, en el que la bacteria intenta adaptarse a las condiciones ácidas del medio y competir con las BAL por los nutrientes disponibles que dependen de la composición del yogurt en primera instancia y que después son inhibidas a través del mecanismo descrito.

Dicho lo anterior y comparando entre si las curvas de supervivencia obtenidas a 4°C se puede afirmar que a pesar de que el mecanismo de inhibición presenta similitudes en todos los casos, cada cepa de *Lactobacillus* presenta un mecanismo de acción antagónico diferente que hace a unas más eficientes que otras<sup>82,110</sup> ya sea por la producción de mayor concentración de ácido o por algún otro metabolito inhibidor como peróxido de hidrógeno, acetaldehído y acetoína<sup>31,84</sup>, por lo que para llevar a cabo un análisis cuantitativo y comparativo del efecto inhibitorio de las diferentes

combinaciones de BAL evaluadas se utilizaron los parámetros cinéticos obtenidos a partir del ajuste de datos al modelo, que son resumidos en la Tabla 23 para los yogurts A, B y C:

Tabla 23. Parámetros cinéticos de inhibición de *E. coli*.

Yogurt	Log (N <sub>0</sub> ) UFC/mL	δ <sub>1</sub> (h)	α UFC/mL	δ <sub>2</sub> (h)	p
A	8.35	7.97	2.23	151.48	6
B	8.91	0.5	2.4	42.83	2.97
C	8.63	0.45	2.01	57.46	1.89

De acuerdo con el modelo de Doble Weibull, cada uno de los parámetros cinéticos obtenidos (δ<sub>1</sub>, δ<sub>2</sub>, Log N<sub>0</sub>, α) puede ser relacionado directamente con el estado fisiológico de la células o con las condiciones ambientales dentro del sistema.

El valor asignado para Log (N<sub>0</sub>) corresponde a la concentración inicial estimada por el modelo, que presenta valores similares para la cantidad de bacterias inoculadas en los tres yogurts, por lo que se afirma que el tiempo de inhibición no se ve influenciado por ésta variable, al tener los 3 yogurts valores iniciales cercanos a 8 Log UFC/mL, siendo el de mayor concentración inicial el yogurt B con 8.91 Log UFC/mL y el de menor concentración el yogurt A con 8.35 Log UFC/mL.

Por otro lado, el tiempo para la primera reducción decimal, es decir, la inactivación de 1 ciclo logarítmico en la primera subpoblación (δ<sub>1</sub>) está directamente relacionado con la intensidad del estrés al que se ven sometidas las células de *E. coli* al contacto inmediato con el medio. La sensibilidad reflejada se debe a la adaptación a las condiciones adversas del medio, como el pH ácido (pH 4) presente en el yogurt que es descrita por Ramírez y colaboradores (2005) como una fase de transición, en la que la población más sensible de *E. coli* integrada por células jóvenes, con algún daño en la membrana o bien las células cuyo ciclo de vida estaba por terminar sufren un efecto letal por el estrés ocasionado. Por lo que los valores de δ<sub>1</sub> obtenidos para



el yogurt B y C son de 0.5 y 0.45 h respectivamente, evidenciando la falta de adaptación de las células al medio en comparación con el yogurt A en el que la tolerancia al ácido fue más prolongada, obteniéndose un valor de 7.97 h para la reducción de un logaritmo.

La cantidad total de bacterias que integran la primera subpoblación es estimada por el valor de  $\alpha$ , que como se observa en la Tabla 23, es aproximadamente de 2 ciclos logarítmicos para los tres ensayos realizados, por lo que se establece que ésta población sensible se encuentra relacionada directamente con la cepa inoculada y el pH del medio (pH 4), y no necesariamente con el tipo de BAL presente en cada yogurt.

El valor de  $p$  es un parámetro que determina la forma que sigue la curva para la inhibición del microorganismo indicador, cuando el valor asignado es  $p < 1$  la forma es cóncava, cuando  $p = 1$  la inhibición es de manera lineal, mientras que conforme el valor aumenta toma una forma convexa<sup>28</sup>; respecto a lo anterior, un valor de  $p = 6$  para el yogurt A refleja la presencia de un hombro prolongado seguido de una rápida inhibición, para el yogurt C el valor de  $p = 1.89$ , que por ser el más cercano a 1 muestra una convexidad menos prolongada, en comparación con las otras curvas, por no presentar un punto de inflexión acentuado, mostrando una inhibición relativamente constante, mientras que el yogurt B presenta un comportamiento intermedio  $p = 2.97$ , al exhibir una pequeña fase de adaptación seguida de una inhibición más acelerada en comparación con el yogurt C, lo cual se observa directamente en la Figura 22 (página 78).

El tiempo para la primera reducción decimal de la segunda subpoblación, está dada por el valor de  $\delta_2$  (Tabla 23), el cual se estima que está directamente relacionado con la combinación de BAL presentes en cada yogurt, en específico con la especie de *Lactobacillus* y con su mecanismo de acción antagónica (ya que el *Streptococcus thermophilus* se mantiene como variable constante en las tres muestras), frente a *E. coli*, debido a que durante éste periodo de tiempo es donde se presentan las diferencias más significativas en cuanto al comportamiento entre los 3 yogurts



estudiados. En la Figura 23 se hace una descripción gráfica de  $\delta_2$  para cada yogurt, donde se puede observar que éste valor es mayor para el yogurt A, seguido del C, siendo el yogurt B el que menos tiempo tarda para reducir en 1 Log UFC/mL en la segunda subpoblación.

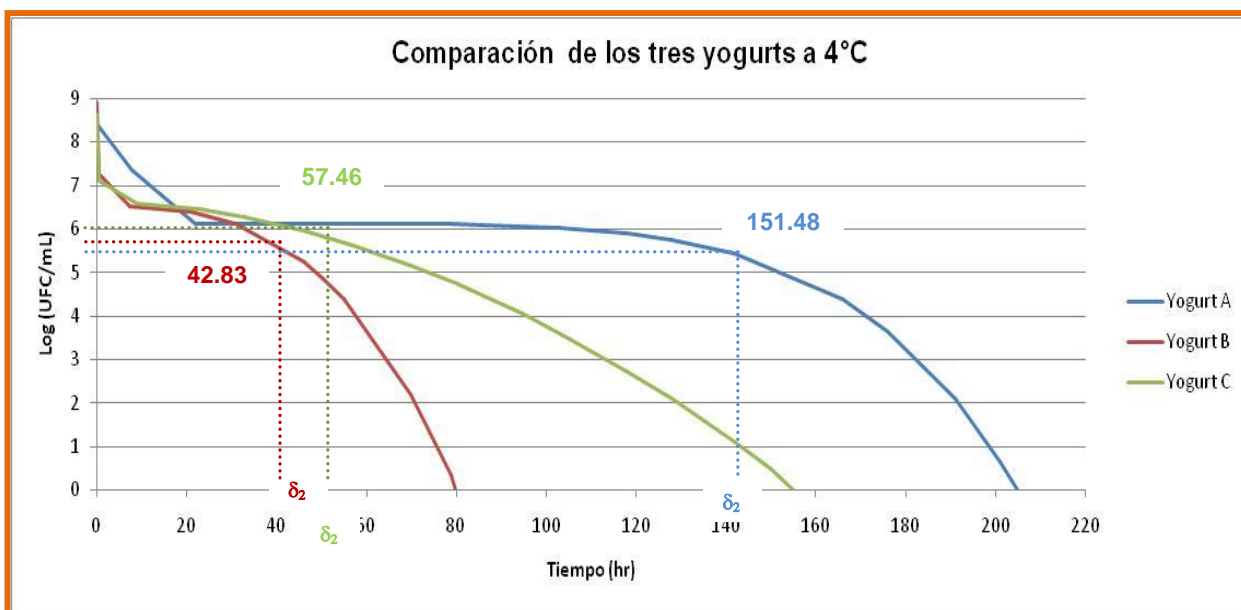


Figura 23. Comparación de los valores de  $\delta_2$  para los tres yogurts.

Como se observa en la Figura 23 que compara los valores de  $\delta_2$  y los comportamientos de inhibición, el yogurt en el que el indicador puede sobrevivir por más tiempo es el A, que presentó un valor de  $\delta_2=151.58$  h, y fue formulado con *Lactobacillus casei* Shirota y *Streptococcus thermophilus*. Estudios realizados por Ogawa y colaboradores (2001) demostraron que *L. casei* Shirota desarrolló un efecto bactericida sobre *E. coli* durante un ensayo in vitro realizado en medios de cultivo. La respuesta antibacteriana fue atribuida principalmente al efecto de los ácidos orgánicos, siendo el de mayor efecto el ácido láctico, por encontrarse en mayores concentraciones, además se ha demostrado que las bacteriocinas que produce no tienen efecto contra bacterias entéricas<sup>98</sup>, por lo que *E. coli* al tener la capacidad de desarrollar características ácido tolerantes puede adaptarse durante un tiempo considerable al medio, en el cual compete por los nutrientes disponibles con las BAL,

en especial por los azúcares fermentables que están presentes en un 9.22% de acuerdo con los valores obtenidos por AQP, de los azúcares disponibles *E. coli* únicamente fermenta lactosa, por lo que al agotarse es inhibida, mientras que LcS y *S. thermophilus* al metabolizar otros azúcares como la sacarosa sobreviven por más tiempo.

El yogurt C con un valor de  $\delta_2=57.46$  fue formulado con los cultivos iniciadores tradicionales, es decir, *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus* que como se observa en la Tabla 23 (página 81) tarda 1/3 del tiempo requerido por las cepas del yogurt A en disminuir en 1 ciclo logarítmico la presencia de *E. coli*, ésta diferencia se adjudica a que las cepas presentes en éste yogurt, producen diversos compuestos inhibidores, además del ácido láctico, tales como: peróxido de hidrógeno, acetaldehído y acetoína en diferentes concentraciones<sup>31,84,113</sup>, que permiten una inhibición más rápida de la bacteria contaminante, sin permitir que ésta se adapte, lo cual conlleva a una inhibición aproximadamente constante que se refleja en el valor de p como se mencionó anteriormente. A pesar de que *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus* produce menor concentración de ácido láctico (11-15 mg/mL) que LcS (13-19 mg/mL), debido a la presencia de almidón en el Yogurt C se favorece su supervivencia, este comportamiento es similar al reportado por Donkor y colaboradores (2007) quienes comprobaron que los yogurts que utilizan 0.5% almidón y/o pectina como prebióticos, tienen la capacidad de inhibir de forma natural a microorganismos alterantes, este porcentaje es similar a la concentración de almidón supuesta para el yogurt C.

De acuerdo con los valores reportados en la Tabla 23 el yogurt B que contiene *Lactobacillus johnsonii* La1 y *Streptococcus thermophilus*, es el que tiene una mayor eficiencia en la inhibición del microorganismo indicador por reportar un valor de  $\delta_2=42.83$  h siendo 25.46% más rápido que el yogurt C que contiene los cultivos iniciadores tradicionales, sin embargo, es importante señalar que la rápida inhibición de *E. coli* es influenciada por la presencia de sorbato de potasio en la formulación del yogurt, el cual corresponde a la forma no disociada del ácido sórbico y tiene la

capacidad de inhibir bacterias diferentes a las BAL<sup>61</sup> y actúa del mismo modo que los ácidos orgánicos producidos por la fermentación, lo cual contribuye al aumento de la concentración de éstos en el medio, impidiendo así la adaptación de *E. coli*. El efecto de los ácidos orgánicos aunado a la presencia de otros compuestos inhibidores, como la producción de una sustancia desconocida producida durante la fermentación en cantidades importantes por *Lactobacillus johnsonii*, la cual presuntamente tiene acción en contra de algunos enteropatógenos Gram-negativos<sup>13</sup>, provocan la muerte acelerada de *E. coli* en 79 horas, haciendo al yogurt B un producto más seguro para el consumo por tener una formulación que pretende favorecer la inocuidad del producto.

Durante la formulación de los yogurts se procura la adición de ingredientes que favorezcan la supervivencia de los cultivos iniciadores por lo cual la matriz del alimento podría jugar en determinado momento un papel importante en la inhibición de *E. coli* ya que de acuerdo con Vinderola y colaboradores (2000) algunos factores fisicoquímicos como la concentración de grasa pueden condicionar la supervivencia de la microflora en los productos fermentados, pues los yogurts con mayor concentración de grasa, presentan un medio más inhibitorio que los yogurts reducidos en grasa debido a la hidrólisis parcial de ésta como consecuencia de la acidez, que favorece la liberación de ácidos grasos que pueden tener un efecto bactericida. Estos datos coinciden con el comportamiento encontrado en las determinaciones de AQP ya que el yogurt A por tener únicamente 0.6% de grasa tarda más tiempo en inhibir al indicador, mientras que los yogurts B y C por tener concentraciones similares de grasa (1.32 y 1.82%) tardan menos, las diferencias encontradas en el comportamiento inhibitorio pueden atribuirse a los mecanismos antes mencionados. De la misma manera, la adición de algunas sales, que al disolverse incrementan la concentración de los ácidos orgánicos presentes de manera natural<sup>61</sup> pueden contribuir a la muerte acelerada de *E. coli*, como en el caso del yogurt B el cual presenta mayor efectividad, debido a que su porcentaje de acidez obtenido por AQP fue el más alto de 0.99% comparado con los otros dos de 0.83% y 0.46% para el yogurt A y C respectivamente. Es importante destacar que para el yogurt A, a pesar



de tener un porcentaje de acidez elevado 0.83%, es la matriz que más tiempo tarda en inhibir al indicador por su bajo contenido en grasa como se mencionó antes.

En el momento en el que no fue posible la cuantificación de ninguna colonia de *E. coli*, se llevó a cabo un análisis de la viabilidad de ésta para determinar si se había dado la muerte celular o las células sólo habían sido inactivadas por las condiciones del medio, siguiendo el procedimiento establecido en la metodología (página 54). Los resultados confirmaron la muerte bacteriana del microorganismo indicador al no detectarse crecimiento alguno de la cepa en Agar MacConkey para todas las muestras evaluadas tanto a 4 como a 37°C en los tres yogurts, como se ilustra en la Figura 24.

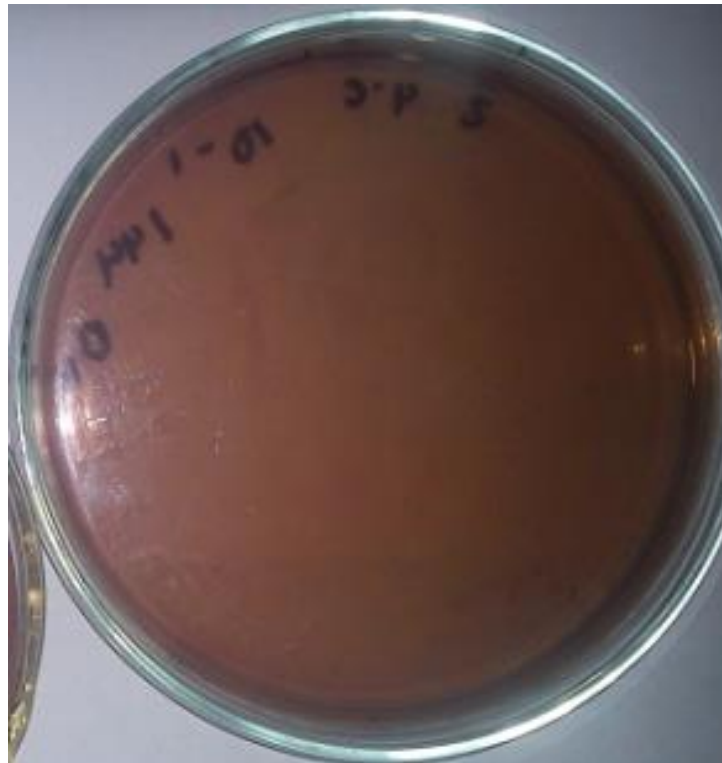


Figura 24. Verificación de la inhibición total de *Escherichia coli* en Agar MacConkey para el yogurt A.



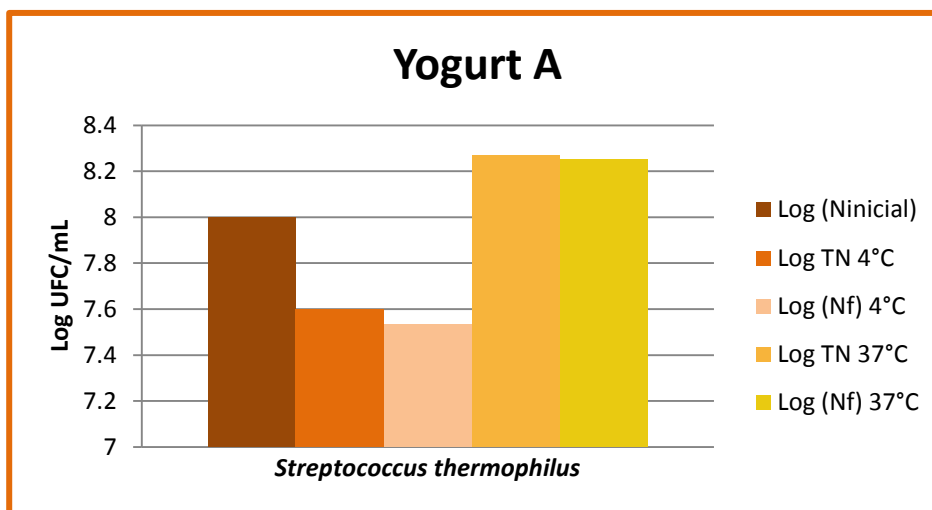
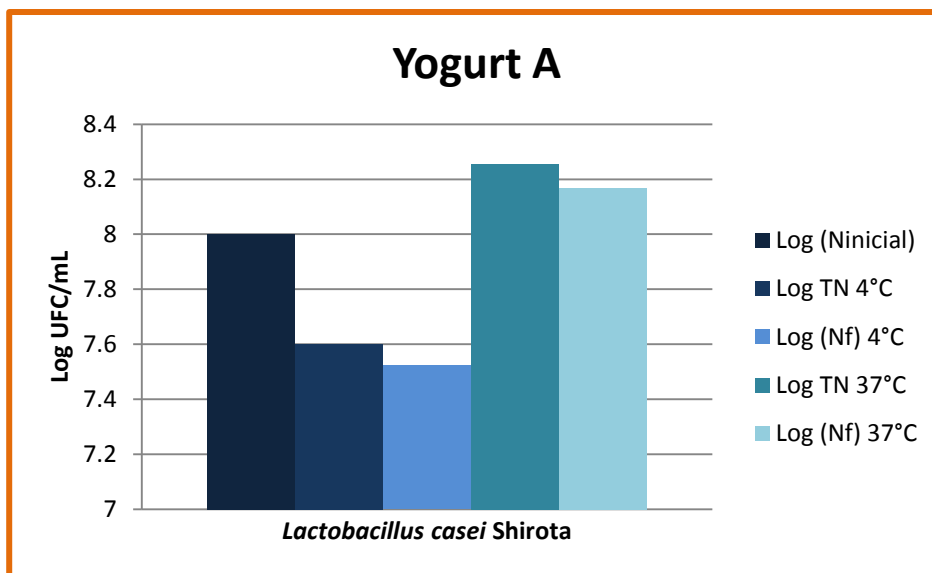
### 3.4 Objetivo Particular 4: Análisis de la viabilidad de BAL

Con el objeto de analizar el efecto de las temperaturas de almacenamiento y la presencia de *Escherichia coli* en la viabilidad de los cultivos iniciadores contenidos en cada yogurt se llevó a cabo el conteo de BAL siguiendo la metodología antes mencionada (página 54). Los resultados obtenidos muestran que algunas combinaciones de cepas tienen un comportamiento diferente dependiendo principalmente de la temperatura de almacenamiento a la que fueron sometidas, así como el cambio de pH registrado, mientras que la presencia de la cepa de *E. coli* tiene un efecto menor en la viabilidad de las mismas.

En las Figuras 25, 26 y 27 se muestran los conteos de los cultivos iniciadores (*Lactobacillus* y *Streptococcus*) presentes en cada yogurt. La primera columna indica la concentración inicial contenida en los yogurts sin previo tratamiento, la segunda y cuarta columna indican la concentración final de las BAL en el Testigo Negativo (con la finalidad de evaluar el efecto de la presencia de *E. coli*) y la tercer y quinta columna, muestran el conteo de los cultivos en las muestras inoculadas (para evaluar el efecto de la temperatura de almacenamiento). Para analizar si existió diferencia estadística en cuanto temperatura y presencia de *E. coli* se realizó un análisis ANOVA de una vía.

En la Figura 25 se observan los resultados obtenidos del conteo de *Lactobacillus casei* Shirota y *Streptococcus thermophilus* para el yogurt A, indicando la concentración inicial de la muestra, la concentración de los Testigos Negativos y de las muestras inoculadas a ambas temperaturas.





Log ( $N_{inicial}$ ). Concentración inicial de BAL

Log TN 4°C. Concentración final de BAL en el Testigo Negativo a 4°C

Log (Nf) 4°C. Concentración final de BAL en la muestra inoculada a 4°C

Log TN 37°C. Concentración final de BAL en el Testigo Negativo a 37°C

Log (Nf) 37°C. Concentración final de BAL en la muestra inoculada a 37°C

Figura 25. Comparación de la viabilidad de los cultivos lácticos (*Lactobacillus casei* Shiota y *Streptococcus thermophilus*) a las dos temperaturas de almacenamiento para el yogurt A.

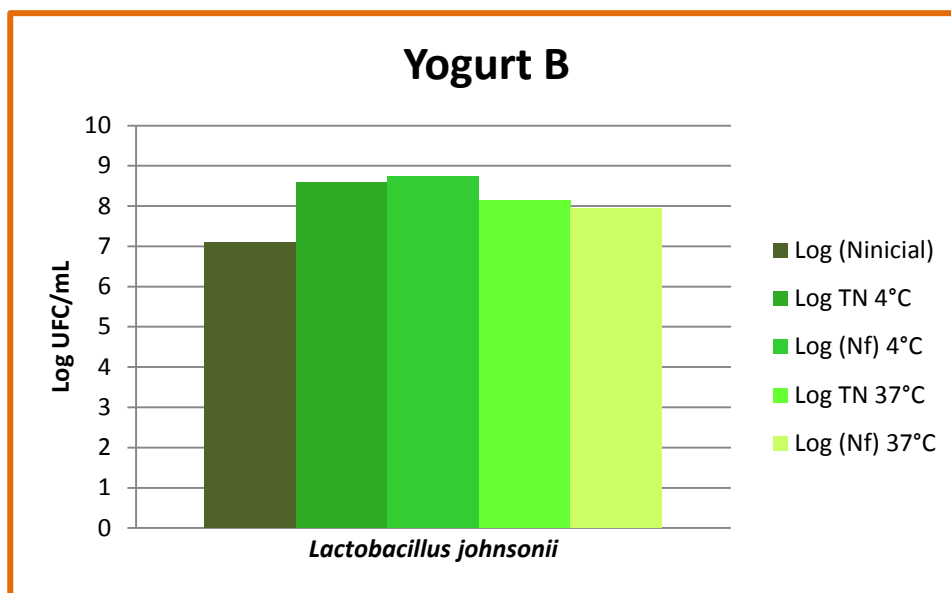


La comparación de los conteos de BAL obtenidos para el yogurt A demuestran que ambos cultivos tienen un comportamiento similar como se muestra en la Figura 25, es decir, a 4°C hay una reducción significativa ( $P \geq 0.05$ ) de la población inicial de 0.5-0.4 Log UFC/mL, mientras que a 37°C se muestra un crecimiento de 0.2 ciclos logarítmicos aproximadamente para las dos cepas ( $P \geq 0.05$ ). La presencia de *E. coli* provoca que a 4°C exista mayor muerte celular tanto de *L. casei* como de *S. thermophilus* aunque ésta diferencia no es significativa, en cambio a 37°C el indicador cesa el crecimiento de las cepas, a pesar de que no refleja una diferencia significativa ( $P \leq 0.05$ ) con la muestra evaluada sin la bacteria contaminante, es suficiente para provocar que no exista diferencia significativa ( $P \leq 0.05$ ) entre la cuenta inicial y la final de la muestra con *E. coli* únicamente para *Lactobacillus casei* Shirota que evidencia la competencia por los nutrientes del medio que se dio entre éstas dos cepas, mientras que *Streptococcus thermophilus* tiene la capacidad de continuar con su desarrollo normal.

Los resultados obtenidos en el presente estudio coinciden con los datos reportados por Farnworth (2008) que establecen que a 30°C durante las primeras 24 horas la concentración de LcS en una bebida láctea fermentada se mantiene aproximadamente constante hasta alcanzar la fase estacionaria de crecimiento, por lo que se explica que el crecimiento ilustrado en la Figura 25 sea mínimo debido a que ésta fase es alcanzada tanto para éste cultivo como para *Streptococcus thermophilus*. De igual forma los resultados obtenidos a 4°C coinciden con el mismo estudio que reporta una disminución de 0.3 ciclos logarítmicos aproximadamente después de 10 días de almacenamiento a 5°C; las variaciones encontradas con respecto a éste estudio pueden atribuirse a las variaciones de temperatura y la concentración de oxígeno disuelto en el yogurt, así como la presencia de *E. coli* que tiene un efecto de reducción menor a 0.1 Log UFC/mL.



A diferencia del yogurt A para el yogurt B sólo se muestran los conteos obtenidos para *Lactobacillus johnsonii* en la Figura 26, debido a que no fue posible cuantificar la presencia de *Streptococcus thermophilus* después del tiempo necesario para la muerte celular de *E. coli* en una dilución de  $10^6$  UFC/mL, tanto en los testigos negativos como en las muestras inoculadas, sin embargo, se confirmó su presencia en el conteo inicial encontrando una población de 7.1 Log UFC/mL por lo que se establece que la concentración final se encuentra por debajo de  $10^6$  UFC/mL por ser ésta la menor dilución evaluada y no necesariamente fue inhibida en su totalidad de acuerdo con algunos estudios que demuestran que durante el almacenamiento en refrigeración la viabilidad de éste cultivo disminuye entre 0-3 Log UFC/mL en presencia de cultivos probióticos<sup>47</sup>.



Log ( $N_{inicial}$ ). Concentración inicial de BAL

Log TN 4°C. Concentración final de BAL en el Testigo Negativo a 4°C

Log (Nf) 4°C. Concentración final de BAL en la muestra inoculada a 4°C

Log TN 37°C. Concentración final de BAL en el Testigo Negativo a 37°C

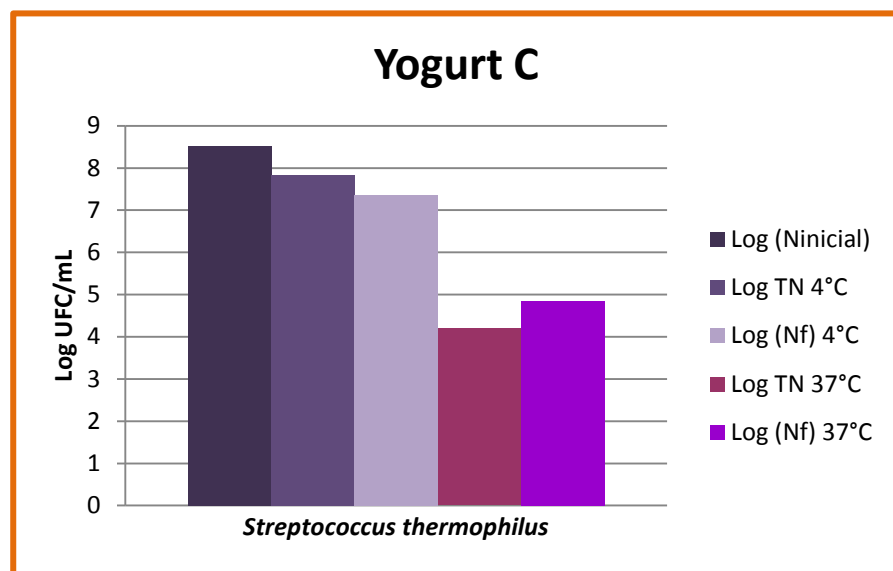
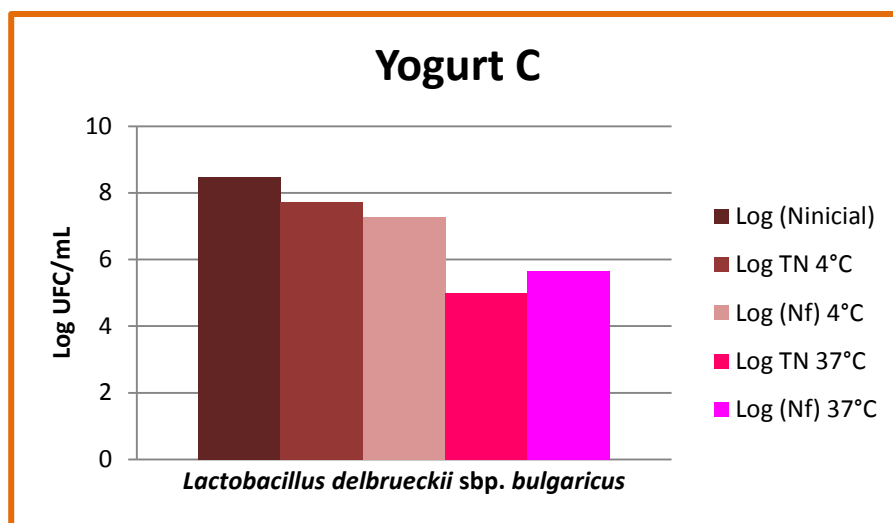
Log (Nf) 37°C. Concentración final de BAL en la muestra inoculada a 37°C

Figura 26. Comparación de la viabilidad de los cultivos lácticos (*Lactobacillus johnsonii* La1 y *Streptococcus thermophilus*) a las dos temperaturas de almacenamiento para el yogurt B



En la Figura 26 se observa un aumento significativo ( $P \geq 0.05$ ) en la población de *L. johnsonii* de 1-1.7 Log UFC/mL dependiendo de las condiciones de almacenamiento, tanto en los testigos negativos como en las muestras inoculadas. Este comportamiento inesperado en el aumento del conteo de colonias finales se atribuye a la disminución en la viabilidad de *S. thermophilus* y *E. coli* debido a que la cepa La1 presenta actividad antimicrobiana tanto en bacterias Gram-negativas como Gram-positivas por la presencia de una sustancia desconocida<sup>13</sup>, al haber menos competencia por los nutrientes, ésta tiene la capacidad de crecer libremente inclusive a 4°C por la capacidad que tiene de fermentar los azúcares disponibles en el medio, lactosa y sacarosa por igual<sup>47</sup>. Además cabe mencionar que la presencia de *Escherichia coli* no tiene un efecto significativo ( $P \leq 0.05$ ) en el crecimiento de *L. johnsonii* debido a que ésta bacteria produce una sustancia tóxica que impide la adaptación al medio de la bacteria coliforme por lo que no desarrolla la capacidad de competir por los nutrientes disponibles.

Por otro lado, el yogurt C presenta un comportamiento diferente en la viabilidad de *Lactobacillus delbrueckii* sbp. *bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus* que puede atribuirse a que éstos cultivos son menos ácido-tolerantes, esencialmente por tratarse de los cultivos lácticos tradicionales por lo que su población se ve reducida durante el almacenamiento independientemente de las condiciones como se muestra en la Figura 27.



Log ( $N_{inicial}$ ). Concentración inicial de BAL

Log TN 4°C. Concentración final de BAL en el Testigo Negativo a 4°C

Log (Nf) 4°C. Concentración final de BAL en la muestra inoculada a 4°C

Log TN 37°C. Concentración final de BAL en el Testigo Negativo a 37°C

Log (Nf) 37°C. Concentración final de BAL en la muestra inoculada a 37°C

Figura 27. Comparación de la viabilidad de los cultivos lácticos (*Lactobacillus delbrueckii sbp. bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*) a las dos temperaturas de almacenamiento para el yogurt C.

Al comparar la concentración inicial de BAL contenidas en el yogurt C con los yogurts A y B se observa que éste presenta una cantidad más elevada en cuanto a los cultivos lácticos, alcanzando para las dos cepas valores de 8.5 Log UFC/mL aproximadamente, que concuerdan con los valores de crecimiento máximo (9 Log UFC/mL) obtenidos por Aguirre y colaboradores (2008) por lo que se considera que las bacterias contenidas en éste yogurt crecieron durante la fermentación hasta alcanzar la fase estacionaria, por lo que, en el almacenamiento únicamente se aumentó la concentración de los compuestos inhibitorios en el medio desarrollando condiciones adversas tanto para *E. coli* como para los cultivos iniciadores. A 4°C se generó una disminución significativa ( $P \geq 0.05$ ) de la población bacteriana que puede atribuirse al efecto de post acidificación característico de ésta simbiosis<sup>106</sup>, tanto para *S. thermophilus* como para *L. bulgaricus* por la acumulación de ácidos orgánicos y otros compuestos inhibidores como acetaldehído, acetoína, peróxido de hidrógeno<sup>31,84</sup> que fue detectado por la disminución del pH a las 24 horas de almacenamiento. De manera similar ocurrió a 37°C para ambas bacterias pero de manera más acelerada debido a que la temperatura probablemente reactivó el metabolismo de las mismas, favoreciendo la producción de los compuestos antimicrobianos previamente mencionados en mayor proporción lo cual, tuvo como consecuencia una reducción de 3.5 y 4.3 ciclos logarítmicos para *L. bulgaricus* y *S. thermophilus* respectivamente en ausencia de *E. coli* y la inactivación total de ésta en 180 horas.

Cabe mencionar que para la combinación de cepas del yogurt C la presencia de *E. coli* tiene un efecto significativo ( $P \geq 0.05$ ) en la viabilidad de éstas a ambas temperaturas de almacenamiento, por un lado a 4°C la presencia del indicador provoca una mayor disminución en el conteo de BAL, mientras que a 37°C en el testigo negativo la supervivencia es menor debido a que los compuestos inhibidores sólo ejercen su acción antimicrobiana sobre los cultivos lácticos, mientras que se estima que en la muestra inoculada la actividad antimicrobiana se ejerce tanto en los cultivos iniciadores como en *Escherichia coli* lo cual provoca una menor letalidad sobre las BAL por ser más ácido-tolerantes.



Para garantizar la viabilidad de los cultivos iniciadores probióticos contenidos en los yogurts A y B, además de los compuestos que tienen un efecto sobre posibles bacterias contaminantes, por lo regular les son adicionados polisacáridos como la pectina y el almidón para estos yogurts en específico, o inulina más comúnmente utilizada, que pretenden tener un efecto prebiótico que favorezca la supervivencia de las BAL durante el almacenamiento y tenga un efecto protector durante su paso por el tracto gastrointestinal<sup>34</sup>. Este efecto se encontró en ambos yogurts, para *L. casei* Shirota (contenida en el yogurt A) las pequeñas variaciones no se consideran importantes, ya que la concentración final se encuentra por arriba de 7.4 Log UFC/mL, mientras que para *L. johnsonii* (contenida en el yogurt B) actuó para favorecer su crecimiento, obteniendo conteos finales de 10<sup>8</sup> UFC/mL. En contraste con el yogurt C, el cual únicamente contiene almidón y presentó disminuciones de hasta 1.5 ciclos logarítmicos a 37°C en el Testigo Negativo.

Haciendo una relación entre los resultados obtenidos de AQP y el análisis de la viabilidad de los cultivos iniciadores se encontró que el contenido de grasa, acidez y el porcentaje de azúcar podrían influir a favor o en contra en la supervivencia de éstas. En cuanto al contenido de grasa, como ya había sido mencionado, a concentraciones mayores se promueve un medio más inhibitorio<sup>108</sup>, por lo que el yogurt C con 1.82% presenta mayor pérdida de la viabilidad especialmente para *S. thermophilus*, de hasta 4 ciclos logarítmicos y para *L. bulgaricus* se redujo 3 ciclos logarítmicos, seguido del yogurt B con 1.32% y una reducción de por lo menos 2 ciclos logarítmicos, en comparación con el yogurt A, en el que la viabilidad de los cultivos se mantuvo aproximadamente constante por solo tener 0.6% de grasa.

Para el porcentaje de acidez, se cuentan con los valores obtenidos por AQP para cada muestra, que permite estimar las concentraciones iniciales de acidez en el medio, sin embargo, se espera que este valor incremente por la acción de las BAL durante el almacenamiento, siendo mayor a 37°C que a 4°C. Partiendo de las condiciones iniciales el yogurt B con 0.99% de ácido láctico, presenta un medio más inhibitorio para *S. thermophilus*, mientras que *L. johnsonii* no se ve afectado por



pertenecer al grupo *acidophilus* cuya principal característica es su ácido-tolerancia lo que en combinación con la reducción de las otras bacterias y la disponibilidad de azúcares fermentables (lactosa) en un 10.45% le permite desarrollarse (como ya se había mencionado), por otro lado, el yogurt A tiene 0.83% de acidez, por lo que se esperaba que hubiera una mayor reducción de sus cultivos lácticos, sin embargo, el lactato de calcio contenido en su formulación actúa como regulador de acidez reaccionando con el ácido láctico para impedir que pueda actuar como compuesto inhibidor tanto de *E. coli* como de las BAL presentes, mientras que para el yogurt C a pesar de tener la acidez más baja (0.46%), el contenido elevado de azúcares 11.67% favoreció el metabolismo de las BAL que desencadenó el proceso de post-acidificación provocando una mayor letalidad para las bacterias presentes.

De acuerdo con los resultados obtenidos del AQP en cuanto al porcentaje de proteína para el yogurt B, la diferencia encontrada entre el valor reportado en la tabla nutricional 2.5% y el valor real determinado 2.8% puede ser atribuido a la adición de extracto de levadura o una combinación de alanina, serina, isoleucina y cisteína necesario para que *L. Johnsonii* pueda desarrollarse en leche<sup>8,36</sup>, cuyo aporte de proteína no fue considerado al hacer el balance de la composición química final reportada en la etiqueta. Al observar la Figura 26 (página 90) se puede apreciar que *L. johnsonii* continuo con su metabolismo, desarrollándose alrededor de 1 Log UFC/mL en condiciones de refrigeración y 1.5 Log UFC/mL a temperatura óptima de crecimiento debido a una pequeña concentración residual de los aminoácidos agregados, que favorecieron la actividad proteolítica y fermentativa al tener la capacidad de degradar sacarosa incrementando así la concentración de compuestos antibacterianos en el medio como ácidos orgánicos y bacteriocinas<sup>47</sup> que tuvo como consecuencia la reducción en la viabilidad de *S. thermophilus* y *E. coli*.



**CONCLUSIONES**

**Y**

**RECOMENDACIONES**



## CONCLUSIONES

En general, los tres yogurts cumplen con los límites microbiológicos máximos establecidos en la norma NOM-243-SSA1-2010 al presentar resultados negativos para todos los microorganismos que deben ser evaluados en leches fermentadas o acidificadas, por lo que se consideran productos muy seguros para el consumo humano y que fueron manufacturados siguiendo las BPM.

De acuerdo con las normas NOM-181-SCFI-2010 y NOM-243-SSA1-2010 los tres yogurts evaluados cumplen con los límites establecidos para proteína, grasa, pH, acidez y SLNG, sin considerar la adición de otros ingredientes no lácteos.

La variación en los ingredientes de los productos evaluados explica la diferencia significativa en la composición final de cada uno, debido a que dependiendo de la funcionalidad y características específicas que se deseen, es permitida por la normatividad mexicana e internacional, la adición de una amplia gama de aditivos como: acidificantes, estabilizadores, gelificantes, conservadores, edulcorantes, potenciadores de sabor, antioxidantes etc.

A pesar de considerar que los yogurts son de buena calidad, los valores reportados en sus etiquetas difieren de los resultados obtenidos analíticamente, lo que evidencia la necesidad de un reajuste en las formulaciones o la corrección de los valores reportados en la etiqueta de cada uno, para reducir las variaciones encontradas.

Los factores que afectan principalmente la supervivencia de *E. coli* y de las BAL son: la temperatura de almacenamiento y la matriz del alimento, mientras que la presencia de BAL influye significativamente en el desarrollo de *E. coli*, pero ésta interfiere únicamente con los cultivos iniciadores tradicionales.

Se comprobó que los yogurts con microorganismos probióticos (*Lactobacillus casei* Shirota y *Lactobacillus johnsonii* La1) no necesariamente tienen un mejor efecto bioconservador en comparación con los que tienen los cultivos iniciadores tradicionales como se esperaba, debido a que su hábitat natural de crecimiento no es la leche, por lo que les cuesta adaptarse, por ésta razón le son adicionados una serie de aditivos como: prebióticos, reguladores de la acidez, ácidos orgánicos (ácido ascórbico) entre otros, para garantizar el crecimiento y supervivencia de éstas.

Durante la vida de almacenamiento bajo condiciones normales de refrigeración se encontró que *E. coli* tiene la capacidad de sobrevivir en los tres yogurts, por lo menos 4 días en el yogurt B y por más de 7 días en los yogurts A y C. Este tiempo es suficiente para representar un riesgo al consumidor, ya que si un producto de éste tipo no es elaborado siguiendo las BPM o se contamina de alguna manera durante su etapa de almacenamiento, transporte o vida de anaquel con *E. coli* u otro coliforme podría convertirse en un vehículo para la transmisión de ETA's.

## RECOMENDACIONES

En el presente estudio se encontró que incluso a condiciones de refrigeración se pueden llegar a producir compuestos inhibitorios que permiten la inhibición de *E. coli* por lo que se propone que en estudios posteriores se evalúe la degradación de los nutrientes del medio generada por la acción de las BAL bajo condiciones de refrigeración como a temperatura óptima de crecimiento que permitan predecir más acertadamente la concentración de compuestos antimicrobianos y la composición final del alimento.

Realizar estudios posteriores en los que se puedan caracterizar los péptidos inhibidores generados durante la fermentación de *L. casei* Shirota, *L. johnsonii* y otros probióticos, por medio de la precipitación de los sobrenadantes que ayuden a establecer posibles beneficios adicionales durante el almacenamiento del producto para garantizar una mayor seguridad de éstos, así como proponer el mecanismo de acción que permita establecer la efectividad en contra de ciertos microorganismos patógenos o alterantes.

Continuar con el estudio de la microbiología predictiva para desarrollar modelos matemáticos más complejos que permitan describir una amplia variedad de comportamientos, como la inhibición de tres subpoblaciones desarrolladas durante el almacenamiento a 4°C para el yogurt A u otro tipo de inactivaciones no térmicas, comunes en alimentos las cuales presentan un comportamiento no lineal, debido a que los microorganismos contaminantes o indicadores con frecuencia presentan la capacidad de sobrevivir por periodos prolongados en los alimentos.

Evaluar el efecto inhibitorio de las bacteriocinas producidas por cepas probióticas sobre bacterias Gram-positivas en alimentos lácteos fermentados, inoculando alguna de las siguientes bacterias: *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Streptococcus faecalis*, entre otros patógenos o indicadores de éstos que pudieran estar presentes por un mal manejo, que permitan establecer si las BAL producen la cantidad suficiente de bacteriocinas y otros compuestos para inhibirlos, así como su efectividad en contra de éstas.

Debido a que actualmente la mayoría de los estudios de inhibición de BAL sobre otras bacterias se realizan en medios de cultivos donde se simulan las condiciones de un alimento se recomienda que éstos retos se lleven a cabo en diferentes alimentos para contar con datos más reales y específicos que sirvan como referencia para modelar el comportamiento y no presentar desviaciones tan elevadas como las encontradas al compararlos con estudios en medios de cultivo.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Aguirre García, J.S. (2013). *Variabilidad de la inactivación microbiana y de la fase de latencia de los microorganismos supervivientes a diferentes tratamientos conservantes de alimentos*. (Tesis Doctoral). Universidad Complutense de Madrid, Madrid, España.
2. Aguirre, E., Galarza, M.G., Uribe, A.I., Ríos, M., López, F., Hernández, C.M. & Álvarez, M.M. (2008). Effect of mixing during fermentation in yogurt manufacturing. *Journal of Dairy Science*, 91(12), 4454-4465.
3. Alakomi, H.L., Skytta, E., Saarela, M., Mattila-Sanholm, T., Latva-Kala, K. & Helander, I.M. (2000). Lactic Acid Permeabilizes Gram-Negative Bacteria by Disrupting the Outer Membrane. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(5), 2001-2005.
4. Albert, I. & Mafart, P. (2005). A modified Weibull model for bacterial inactivation. *International Journal of Food Microbiology*, 100, 197-211.
5. Ananou, S., Maqueteda, M., Martínez-Bueno, M. & Valdivia, G. (2007). *Biopreservation an ecological approach to improve the safety and shelf-life of foods*. Consultada el 23 de Julio de 2013 de la Universidad de Granada, Departamento de Microbiología. Recuperado de <http://www.formatex.org/microbio/pdf/Pages475-486.pdf>
6. Archivo de Manuales y Documentos. (2013). *Microorganismos indicadores*. Consultada el 13 de Agosto de 2013 de la Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Química. Recuperado de [http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/2Indicadores\\_6422.pdf](http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/2Indicadores_6422.pdf)
7. ANTAD Asociación Nacional de Tiendas de Autoservicio y Departamentales, A.C. (2012). Suben 8% ventas de yogurt en 2011. Consultada el 16 de agosto de 2013 de [http://www.antad.net/?option=com\\_k2&view=item&id=3997:suben-8-ventas-de-yogurt-en-2011](http://www.antad.net/?option=com_k2&view=item&id=3997:suben-8-ventas-de-yogurt-en-2011)
8. Avonts, L., Van Uytuen, E. & De Vuyst, L. (2004). Cell growth and bacteriocin production of probiotic *Lactobacillus* strains in different media. *International Dairy Journal*, 14, 947-955.

9. Baranyi, J. & Roberts, T.A. (1994). A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. *International Journal Food Microbiology*, 23, 277-294.
10. Barrantes, X., Railey, D., Arias, M.L. & Chaves, C. (2004). Evaluación del efecto de cultivos probióticos adicionados a yogurt comercial, sobre poblaciones conocidas de *Listeria monocytogenes* y *Escherichia coli* O157:H5. *ALAN Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 54(3), 293-297.
11. Bautista de León, H., Castro, J. & Fernández, J.L. (2009). Comportamiento de *E. coli* O157:H7 y *E. coli* genérica en caldo de cultivo a pH's ácidos a 35°C. En III Simposio de Tecnología Avanzada, D.F., México.
12. Belitz, H.D., Grosch, W. & Schieberle, P. (2011). *Química de los alimentos* (4ta ed.). España: Acribia.
13. Bernet-Camard, M.F., Liévin, V., Brassart, D., Neeser, J.R., Servin, A.L. & Hudault, S. (1997). The human *L. acidophilus* strain LA1 secretes a non bacteriocin antibacterial substance(s) active in vitro and in vivo. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(7), 2747-2753.
14. Bhaduri, S., Smith, P.W., Palumbo, S.A., Turner-Jones C.O., Smith, J.L., Marmer, B.S., Buchanan, R.L., Zaika, L.L. & Williams, A.C. (1991). Thermal destruction of *Listeria monocytogenes* in liver sausage slurry. *Food Microbiology*, 8, 75-78.
15. Bigelow, W.D. & Esty, J.R. (1920). The thermal death point in relation to typical thermophilic organisms. *Journal of Infectious Diseases*, 27, 602.
16. Brul, S. & Coote, P. (1999). Preservative agents in foods mode of action and microbial resistance mechanisms. *International Journal of Food Microbiology*, 50, 1-17.
17. Caballero, A.E. (2008). *Temas de Higiene de los alimentos*. La Habana, Cuba: Ciencias Médicas.
18. Calderón, O., Padilla, C., Chaves C., Villalobos, L. & Arias, M.L. (2007). Evaluación del efecto del cultivo probiótico *Lactobacillus rhamnosus* adicionado a yogurt natural y con probióticos comerciales sobre poblaciones de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* y

- Salmonella enteritidis*. *ALAN Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 57(1), 51-55.
19. Campos, J.A. (2002). Cultivos Probióticos y Protectores, Propiedades Funcionales (Nutracéuticas) de Valor Agregado en los Derivados Lácteos. *Lácteos y Cárnicos Mexicanos*, 26-37.
20. Carey, F.A. (2006). *Química Orgánica* (6ta ed.). México: McGraw-Hill.
21. CESNID Centro de Enseñanza Superior de Nutrición y Dietética (2008). *Tablas de composición de alimentos por medidas caseras de consume habitual en España*. McGraw-Hill: España.
22. Cerf, O. (1977). A review. Tailing of survival curves of bacterial spores. *Journal of Applied Microbiology*, 42, 1-19.
23. Chikindas, M.L., García, M.J., Driesessen, A.J., Ledebor, A.M., Nissen, J., Nes, I.F., Abee, T., Konings, W.N. & Venema, G. (1993). PediocinPA-1, a bacteriocin from *Pediococcus acidilactici* PAC1.0 forms hydrophilic pores in the cytoplasmic membrane of target cells. *Applied and Environmental Microbiology*, 59, 3577-3584.
24. Chopra, H.K. & Panesar, P.S. (2010). *Food Chemistry*. India: Alpha Science International LTD.
25. CODEX STAN 192-1995. Norma General del CODEX para los Aditivos Alimentarios.
26. CODEX STAN 243-2003. Norma del CODEX para Leches Fermentadas.
27. Condon, R., Mariné, A. & Rafecas, M. (1988). *Yogur: Elaboración y Valor Nutritivo*. Consultada el 14 de agosto de 2013 de la Universidad de Barcelona, Departamento de Ciencias Fisiológicas Humanas y de la Nutrición. Recuperada de <http://www.fen.org.es/imgPublicaciones/33-Yogur-elaboraci%C3%B3n.pdf>
28. Coroller, L., Leguerinel, I., Mettler, E., Savy, N. & Mafart, P. (2006). General Model, Based in Two Mixed Weibull Distributions of Bacterial Resistance, for Describing Various Shapes of Inactivation Curves. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(10), 6493-6502.



29. Coronel, C.P., Jiménez, M.T. & López, A. (2009). *Modelos para la descripción de curvas de supervivencia microbiana en alimentos*. Consultada el 05 de Noviembre de 2013 de la Universidad de las Américas Puebla, Departamento de Ingeniería Química y Alimentos. Recuperado de [http://www.udlap.mx/WP/tsia/files/No3-Vol-1/TSIA-3\(1\)-Coronel-Aguilera-et-al-2009.pdf](http://www.udlap.mx/WP/tsia/files/No3-Vol-1/TSIA-3(1)-Coronel-Aguilera-et-al-2009.pdf)
30. Cui, S.W. (2005). *Food Carbohydrates. Chemistry, Physical Properties, and Applications*. USA: Taylor & Francis Group.
31. Dave, R. & Shah, N. (1996). Viability of yoghurt and probiotic bacteria in yoghurts made from commercial starter cultures. *International Dairy Journal*, 7, 31-41.
32. DICA Dirección de Innovación y Calidad. (2013). *Microbiología predictiva para la gestión de la seguridad alimentaria*. Consultada el 16 de octubre de 2013 de [http://www.innovacion.gob.sv/inventa/index.php?option=com\\_content&view=article&id=146:microbiologia](http://www.innovacion.gob.sv/inventa/index.php?option=com_content&view=article&id=146:microbiologia)
33. Documentos Técnicos de Salud Pública. (2003). *Leches Fermentadas en la Comunidad de Madrid*. Consultada el 14 de agosto de 2013 de <http://www.madrid.org/cs/Satellite?blobcol=urldata&blobheader=application%2Fpdf&blobheadertype=Content-Disposition&blobheadervalue1=filename%3DLeches+fermentadas.+Diagn%C3%B3stico+de+situaci%C3%B3n+mercado+y+etiquetado106.pdf&blobkey=id&blobtable=MungoBlobs&blobwhere=1220529265726&ssbinary=true>
34. Donkor, O.N., Nilmini, S.L., Stolic, P., Vasiljevic, T. & Shah, N.P. (2007). Survival and activity of selected probiotic organism in set-type yoghurt during cold storage. *International Dairy Journal*, 17, 657-665.
35. Doyle, M., Beuchat, L. & Montville, T. (1997). *Microbiología de los alimentos. Fundamentos y fronteras*. Zaragoza, España: Acriba.
36. Elli, M., Zink, R., Raniero, R. & Morelli, L. (1999). Growth requirements of *Lactobacillus johnsonii* in skim and UHT milk. *International Dairy Journal*, 9, 507-513.

37. Farnworth, E. (2008). *Handbook of Fermented Functional Foods* (2nd ed.). USA: CRC Press Taylor & Francis Group.
38. FSIS & ARS. Food Safety and Inspection Service & Agricultural Research Service (2013). *Overview of Predictive Microbiology*. USA: United States Department of Agriculture (USDA)
39. Forsythe, S. (2010). *The Microbiology of Safe Food* (2nd ed.). Malaysia: Ed Wiley-Blackwell.
40. Garrido, D., Suau, A., Pochart, P., Cruchet, S. & Gotteland, M. (2005). Modulation of the fecal microbiota by the intake of a *Lactobacillus johnsonii* La1-containing product in human volunteers. *FEMS Microbiology Letters*, (248), 249-256.
41. Geeraerd, A.H., Herremans, C.H. & Van Impe, J.F. (2000). Structural model requirements to describe microbial inactivation during a mild heat treatment. *International Journal of Food Microbiology*, 59, 185-209.
42. Geeraerd, A.H., Valdramidis, V.P. & Van Impe, J.F. (2005). GlnaFIT, a freeware tool to assess non-log-linear microbial survivor curves. *International Journal Food Microbiology*, (102), 95-105.
43. Gersther, G. (2002). El desafío de la fortificación. Bebidas enriquecidas con calcio. *Énfasis en Alimentación*, (4), 62-65.
44. González, B.E., Gómez M. & Jiménez, Z. (2003). Bacteriocinas de Probióticos. *RESPYN Revista de salud pública y nutrición*, 4(2). Recuperado de <http://www.respyn.uanl.mx/iv/2/ensayos/bacteriocinas.htm>
45. González, B.E., Gómez M. & Jiménez, Z. (2005). Bacteriocinas de Probióticos, características, propiedades antibacterianas y modos de acción. *Mundo Alimentario*, 14-19.
46. Grima, P., Almagro, L. M. & Tort-Martorell, J. (2004). *Estadística Práctica con MINITAB*. España: Pearson Prentice Hall.
47. Gueimonde, M., Delgado, S., Mayo, B., Rivas-Madiedo, P., Margolles, A. & de los Reyes-Gavilán, C. (2004). Viability and diversity of probiotic

- Lactobacillus* and *Bifidobacterium* populations included in commercial fermented milks. *Food Research International*, 37(9), 839-850.
48. Hernández, A., Alfaro, I. & Arrieta, R. (2003). *Microbiología Industrial*. Costa Rica: AUNAD.
49. Hidalgo, J.R. (2009) *La seguridad de llamarse yogur*. Consultada el 14 de agosto de 2013, de <http://www.consumer.es/seguridad-alimentaria/normativa-legal/2001/06/05/197.php>
50. Holzapfel, W.H., Geisen, R. & Schillinger, U. (1995). Biological preservation of food with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes. *International Journal of Food Microbiology*, 24, 343-362.
51. Hosein, A.M., Breidt, F. & Smith, C.E. (2011). Modeling the Effects of Chloride, Acetic Acid, and Intracellular pH on Survival of *Escherichia coli* O157:H7. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(3), 889-895.
52. INEGI Instituto Nacional de Estadística y Geografía. (2013). Boletín de Información Oportuna del Sector Alimentario. México: Autor.
53. INTI Instituto Nacional de Tecnología Industrial. Centro de Investigación en Tecnología de Industrialización de Alimentos. Ensayos y Análisis. Argentina: Autor. Consultada el 2 de octubre de 2013 de [www.inti.gov.ar/oferta/ceial.pdf](http://www.inti.gov.ar/oferta/ceial.pdf)
54. Jay, J.M., Loessner, M.J. & Golden, D.A. (2005). *Modern Food Microbiology* (7th ed.). USA: Springer.
55. Kirk, R. (1991). *Pearson's Composition and analysis of food* (9th ed.). Singapore: Longman Scientific and technical.
56. Labuza, T.P. (1984). Application of chemical kinetics to deterioration of Foods. *Journal of chemical education*, 61(4), 348-358.
57. Lactobex. (2013). *Las bacterias "buenas" en el Lactobex*. Consultada el 16 de Noviembre de 2013 de <http://www.lactobex.lv/ru/content/khoroshie-bakterii-v-sostave-lactobex>
58. MacFaddin, J.F. (2004). *Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica*. (3ra ed.). Argentina: Médica Panamericana.

59. Mafart, P., Couvert, O., Gaillard, S. & Leguerinel, I. (2002). On calculating sterility in thermal preservation methods: application of the Weibull frequency distribution model. *International Journal of Food Microbiology*, 72, 107-113.
60. Magnusson, J. (2003). *Antifungal activity of lactic acid bacteria*. (Tesis Doctoral). University of Minnesota, Minneapolis, USA.
61. Mahmoud, M. & Elmer, H.M. (1991). Mechanisms in the inhibition of *Listeria monocytogenes* by potassium sorbate. *Food microbiology*, 8(3), 249-256.
62. Man, D. (2004). *La caducidad de los alimentos*, España: Acriba.
63. Manzilla Arellano, M.L. (2011). Formulación y determinación de la vida de anaquel de un yogurt funcional. (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Autónoma de México, Distrito Federal, México.
64. Massa, S., Altier, C., Quaranta, V. & De Pace, R. (1997). Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in yoghurt during preparation and storage at 4°C. *Applied Microbiology*, 24, 342-350.
65. McMeekin, T.A., Olley, J., Ratkowsky, D.A. & Ross, T. (2002). Predictive microbiology: towards the interface and beyond. *International Journal of Food Microbiology*, (73), 395-407.
66. Membré, J.-M. & Lambert, R.J.W. (2008). Application of predictive modeling techniques in industry: From food design up to risk assessment. *International Journal of Food Microbiology*, (128), 10-15.
67. Montville, T.J. & Chen, Y. (1998). Mechanistic action of pediocin and nisin: recent progress and unresolved questions. *Applied Microbiology & Biotechnology*, 50(5), 511-519.
68. Morgan, D., Newman, C.P., Hutchinson, D.N., Walker, A.M., Rowe, B. & Majid, F. (1993). Verotoxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 infections associated with the consumption of yoghurt. *Epidemiology Infection*, 111, 181-187.
69. Mota Flores, M. (1997). Elaboración de un yogurt elaborado a partir de combinaciones de leche de vaca y cabra. (Tesis de Licenciatura). Universidad Autónoma de Chapingo, Chapingo, México.

70. Mudili, J. (2007). *Introductory Practical Microbiology*. India: Alpha Science International Ltd.
71. Nielsen, S.S. (2003). *Análisis de los alimentos*. España: Acribia.
72. Nollet, L.M.L. (2004). *Handbook of Food Analysis, Physical Characterization and Nutrient Analysis. Volume 1*. (2nd ed.). USA: Marcel Dekker.
73. NOM-051-SCFI/SSA1-2010. Especificaciones generales de etiquetado para alimentos y bebidas no alcohólicas preenvasados. Información comercial y sanitaria. Norma Oficial Mexicana.
74. NOM-086-SSA1-1994. Bienes y servicios. Alimentos y bebidas no alcohólicas con modificaciones en su composición. Especificaciones nutrimentales. Norma Oficial Mexicana.
75. NOM-110-SSA1-1994. Bienes y servicios. Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico. Norma Oficial Mexicana.
76. NOM-113-SSA1-1994. Bienes y servicios. Método para la cuenta de microorganismos coliformes en placa. Norma Oficial Mexicana.
77. NOM-114-SSA1-1994. Bienes y servicios. Método para la determinación de *Salmonella* en alimentos. Norma Oficial Mexicana.
78. NOM-115-SSA1-1994. Bienes y servicios. Método para la determinación de *Staphylococcus aureus* en alimentos. Norma Oficial Mexicana.
79. NOM-155-SCFI-2012. Leche-Denominaciones, especificaciones fisicoquímicas, información comercial y métodos de prueba. Norma Oficial Mexicana.
80. NOM-181-SCFI-2010. Yogurt-Denominación, especificaciones fisicoquímicas y microbiológicas, información comercial y métodos de prueba. Norma Oficial Mexicana.
81. NOM-243-SSA1-2010. Productos y servicios. Leche, fórmula láctea, producto lácteo combinado y derivado lácteo. Disposiciones y especificaciones sanitarias. Métodos de prueba. Norma Oficial Mexicana.
82. Ogawa, M., Shimizu, K., Nomoto, K., Tanaka, R., Hamabata, T., Yamasaki, S., Takeda, T. & Takeda Y. (2001). Inhibition of in vitro growth of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 by probiotic *Lactobacillus* strains due to

- production of lactic acid. *International Journal of Food Microbiology*, 68, 135-140.
83. Olagnier, G., Abad, A., Bendersky, S., Genevois, C., Granzella, L. & Montonati, M. (2007). Alimentos Funcionales: Fibra, Prebióticos, Probióticos y Simbióticos. *Dieta*, 52(121), 20-30.
84. Oliveira de Souza, R., Rivas, B., Perego, P., Nogueira, M. & Converti, A. (2012). Co-metabolic models of *Streptococcus thermophilus* in co-culture with *Lactobacillus bulgaricus* or *Lactobacillus acidophilus*. *Biochemical Engineering Journal*, 62, 62-69.
85. OMGE Organización Mundial de Gastroenterología. (2008). *Probióticos y Prebióticos*. Consultada el 23 de Septiembre de 2013 de [http://www.worldgastroenterology.org/assets/downloads/es/pdf/guidelines/19\\_probioticos\\_prebioticos\\_es.pdf](http://www.worldgastroenterology.org/assets/downloads/es/pdf/guidelines/19_probioticos_prebioticos_es.pdf)
86. Patil, S., Valdramidis, V.P., Cullen, P.J., Frias, J. & Bourke, P. (2010). Inactivation of *Escherichia coli* by ozone treatment of apple juice at different pH levels. *Food Microbiology*, 27, 835-840.
87. Peleg, M. & Cole, M.B. (1998). Reinterpretation of microbial survival curves. *Critical Reviews in Food Science*, 38, 353-380.
88. Pragalaki, T., Bloukas, J.G. & Kotzekidou, P. (2013). Inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 in liquid broth medium and during processing of fermented sausage using autochthonous starter cultures. *Meat Science*, 95, 458-464.
89. PROFECO Procuraduría Federal del Consumidor. (2002). Yogurt. *Revista del consumidor*, 304. Consultada el 11 de septiembre de 2013 de <http://revistadelconsumidor.gob.mx/?p=2228>
90. Ramírez Cuenca, M.S. (2005). *Actividad inhibitoria de cepas de bacterias ácido lácticas frente a bacterias patógenas y deterioradoras de alimentos*. (Tesis de Licenciatura). Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Hidalgo, México.

91. Ramírez, J., Contreras, G. & Gómez, M.C. (2005). La fase estacionaria en la bacteria *Escherichia coli*. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 47(3), 92-101.
92. Ramírez, J.C., Rosas, P., Velázquez, M.Y., Ulloa, J.A. & Arce, F. (2011). Bacterias Lácticas: Importancia en alimentos y sus efectos en la salud. *Fuente*, 7, 1-16.
93. Ray, B. & Bhunia, A. (2010). *Fundamentos de Microbiología de los Alimentos*. México: McGraw-Hill.
94. Revista Mundo Lácteo y Cárnico. (2009). Lácteos Funcionales: Haciendo más fácil una sana alimentación. *Mundo Lácteo y Cárnico*: Autor. Consultada el 16 de Noviembre de 2013 de [http://www.alimentariaonline.com/media/MLC028\\_FUNC1.pdf](http://www.alimentariaonline.com/media/MLC028_FUNC1.pdf)
95. Rivas, F. (2006). *Preparación de Cultivos Iniciadores. Optimización del Sustrato de Crecimiento*. Consultada el 14 de agosto de 2013 de la Universidad Nacional del Nordeste, Facultad de Agroindustrias. Recuperada de <http://www.unne.edu.ar/unnevieja/Web/cyt/cyt2006/08-Exactas/2006-E-060.pdf>
96. Robinson, R. K. (2002). *Dairy Microbiology Handbook* (3rd ed.). USA: Wiley-Interscience.
97. Rodríguez, J.J. (2003). *La esencia del yogur pasteurizado*. Consultada el 14 de agosto de 2013, de <http://www.consumer.es/seguridad-alimentaria/sociedad-y-consumo/2003/03/05/5394.php>
98. Rojas, R., Cruz, A., Flores, A., Rodríguez, G., Gómez, L., Reyes, J.P., Jiménez, J. & García, M. (2012). Antithrombotic and angiotensin-converting enzyme inhibitory properties of peptides released from bovine casein by *Lactobacillus casei* Shirota. *International Dairy Journal*, 26, 147-154.
99. Salminen, S., von Wright, A. & Ouwehand, A. (2004). *Lactic Acid Bacteria. Microbiological and Functional Aspects* (3rd ed.). USA: Marcel Dekker Inc.
100. SAGARPA Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Industrial, Pesca y Alimentación. (2013). *Boletín de Leche*. México: Autor.

101. Shadbolt, C.T., Ross, T. & McMeekin, T.A. (1999). Nonthermal death of *Escherichia coli*. *International Journal of Food Microbiology*, 49, 129-138.
102. Singleton, P. & Sainsbury, D. (2006). *Dictionary of Microbiology and Molecular Biology* (3rd ed.). Grand Britain: John Wiley & Sons.
103. Soria, M., Rougier, V. & Bueno, J. (2011). Aplicación de un modelo no lineal para curvas de inactivación térmica de *Salmonella spp.* En: Jornadas Argentinas de Microbiología, Argentina. Consultada el 15 de octubre de 2013 de [http://www.conicet.gov.ar/new\\_scp/detalle.php?keywords=glifosato&id=37185&congresos=yes&detalles=yes&congr\\_id=1355173](http://www.conicet.gov.ar/new_scp/detalle.php?keywords=glifosato&id=37185&congresos=yes&detalles=yes&congr_id=1355173)
104. Stephen, A.M., Phillips, G.O. & Williams, P.A. (2006). *Food Polysaccharides and Their Applications* (2nd ed.). United States of America: Taylor & Francis Group.
105. Stiles, M.E. (1996). *Biopreservation by lactic acid bacteria*. Consultada el 16 de agosto de 2013 de la Universidad de Alberta, Canadá, Departamento de Ciencias de Agricultura, Alimentos y Nutrición. Recuperada de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8879414>
106. Tamime, A.Y. (2005). *Probiotic Dairy Products*. Singapore: Blackwell Publishing.
107. Tamime, A.Y. & Robinson, R.K. (2004). *Yoghurt*. USA: Woodhead Publishing Limited.
108. Van Boekel, M.A.J.S. (2002). On the use of the Weibull model to describe thermal inactivation of microbial vegetative cells. *International Journal of Food Microbiology*, 74, 139-159.
109. Villarruel Parra, L. (2011). *Evaluación de la viabilidad de Probióticos durante la vida de anaquel de un yogurt funcional*. (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Autónoma de México, Distrito Federal, México.
110. Vinderola, C.G., Bailo, N. & Reinheimer, J.A. (2000). Survival of probiotic microflora in Argentinian yogurts during refrigerated storage. *Food Research International*, 33, 97-102.



111. Weagan, S.D., Bryant, J.L. & Bark, D.H. (1994). Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in mayonnaise and mayonnaise-based sauce at room and refrigerated temperatures. *Journal Food Protection*, 57, 629-631.
112. Whiting, R.C. (1993). Modeling bacterial survival in unfavorable environments. *Journal Industrial Microbiology*, 12, 240-246.
113. Xanthopoulos, V., Petridis, D. & Tzanetakis, N. (2001). Characterization and Classification of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* Subsp. *bulgaricus* strains isolated from traditional Greek yoghurts. *Journal of Food Science*, 66(5), 747-752.
114. Yildiz, F. (2010). *Development and manufacture of yogurt and other functional dairy products*. USA: CRC Press.
115. Yousef, A. & Juneja, V. (2003). *Microbial Stress Adaptation and Food Safety*. USA: CRC Press.
116. Yakult. (2013). ¿Qué es e *Lactobacillus casi Shirota (Lcs)*?. Consultada el 5 de octubre de 2013 de <http://www.yakult.com.mx>

# ANEXO A

## DATOS EXPERIMENTALES OBTENIDOS PARA LAS CURVAS DE SUPERVIVENCIA Y AJUSTE A MODELOS MATEMÁTICOS

### YOGURT A

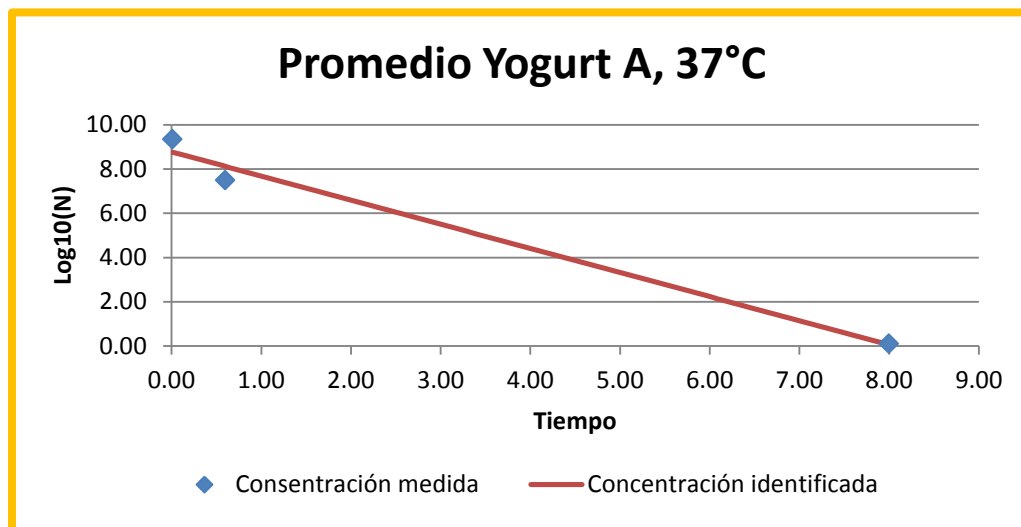
Ajuste al Modelo Lineal para el promedio a 37°C para el Yogurt A.

Tiempo	Concentración Medida Log10(N)	Concentración Estimada Log10(N)	Diferencia de Cuadrados
0.01	9.34	8.76	0.34
0.60	7.49	8.12	0.39
8.00	0.10	0.05	0.00
<b>Suma del Error Cuadrático</b>			0.73

Parámetros	Valores de Parámetros	Error Estándar
$k_{max}$	2.51	0.31
LOG 10(N0)	8.77	0.63

Promedio de Cuadrados del Error (MSE)	0.7329
Raíz del Error Cuadrático Medio (RMSE)	0.8561
$R^2$	0.9847
$R^2$ ajustado	0.9694
Tiempo de Reducción Equivalente a 4D	$\pm 3.69h$

W.D. Bigelow and J.R. Esty 1920. The thermal death point in relation to typical thermophylic organisms. Journal of Infectious Diseases, 27, 602





**Ajuste al Modelo de Doble Weibull para la muestra 1 a 4°C para el Yogurt A.**

Tiempo	Concentración Medida Log10(N)	Concentración Estimada Log10(N)	Diferencia de Cuadrados
0.01	9.34	8.36	0.96
0.60	7.38	8.36	0.96
8.00	7.23	7.23	0.00
22.00	7.39	6.17	1.48
32.00	6.66	6.17	0.24
46.00	5.92	6.17	0.06
55.00	5.68	6.17	0.24
69.00	5.67	6.16	0.25
79.00	5.06	6.15	1.19
94.00	6.20	6.12	0.01
103.00	5.93	6.08	0.02
118.00	5.92	5.95	0.00
128.00	5.99	5.82	0.03
142.00	5.19	5.51	0.10
166.00	5.01	4.47	0.29
176.00	4.44	3.75	0.47
191.00	2.57	2.22	0.12
201.00	0.10	0.81	0.50
<b>Suma del Error Cuadrático</b>			6.93

Parámetros	Valores de Parámetros	Error Estándar
$\alpha$	2.19	0.58
$\delta_1$	7.80	1.06
$p$	6.00	1.72
<b>LOG10(N0)</b>	8.36	0.52
$\delta_2$	151.90	11.59

<b>Promedio de Cuadrados del Error (MSE)</b>	0.4953
<b>Raíz del Error Cuadrático Medio (RMSE)</b>	0.7038
<b>R<sup>2</sup></b>	0.8957
<b>R<sup>2</sup> ajustado</b>	0.8734
<b>Tiempo de Reducción Equivalente a 4D</b>	±168.85h

Coroller et al. 2006. General Model Based on Two Mixed Weibull Distributions of Bacterial Resistance for Describing Various Shapes of Inactivation Curves. Applied and Environmental Microbiology, 72, 6493-6502

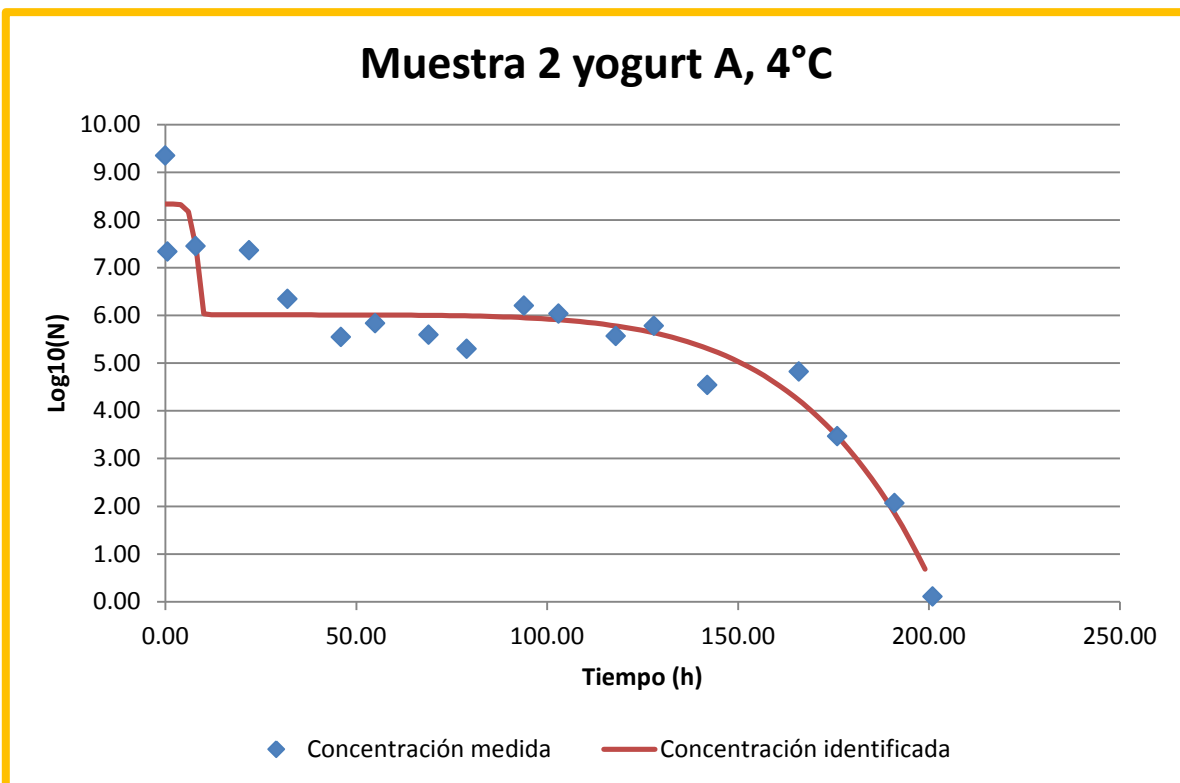
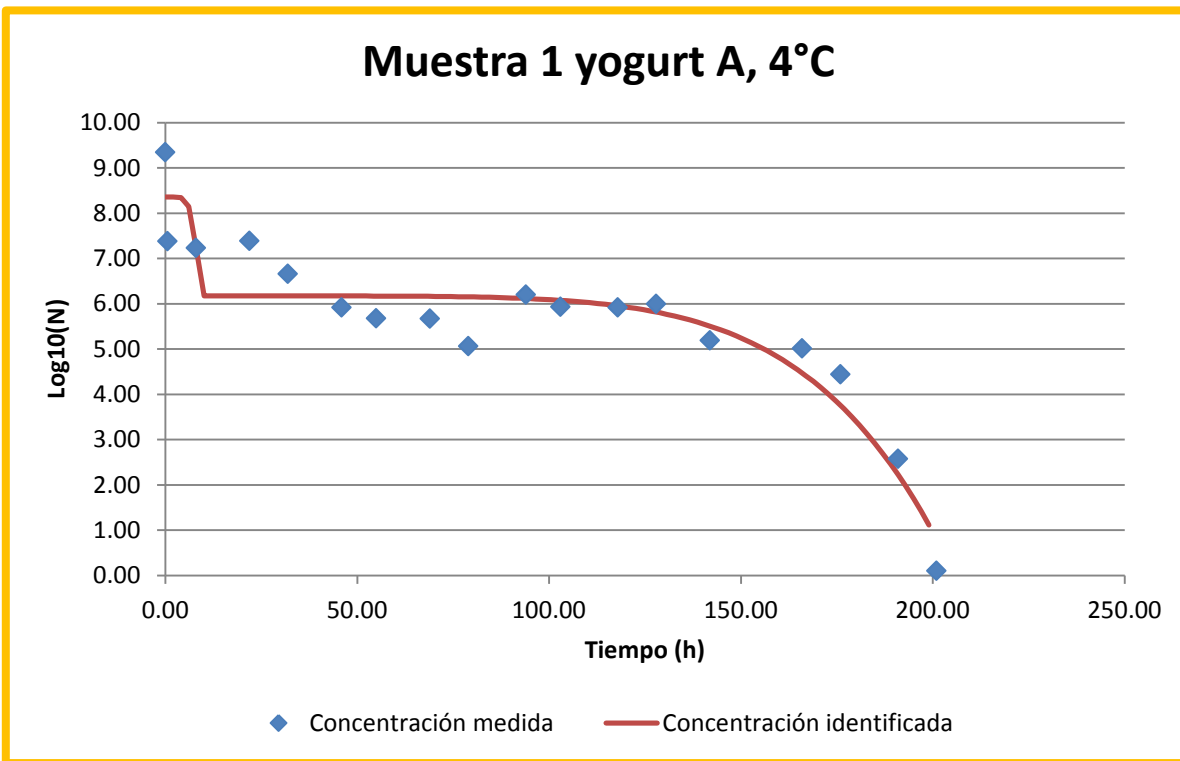
**Ajuste al Modelo de Doble Weibull para la muestra 2 a 4°C para el Yogurt A.**

Tiempo	Concentración Medida LOG10(N)	Concentración Estimada Log10(N)	Diferencia de Cuadrados
0.01	9.34	8.34	1.01
0.60	7.33	8.34	1.01
8.00	7.45	7.45	0.00
22.00	7.36	6.01	1.82
32.00	6.34	6.01	0.11
46.00	5.54	6.01	0.22
55.00	5.83	6.01	0.03
69.00	5.59	6.00	0.17
79.00	5.29	5.99	0.49
94.00	6.20	5.95	0.06
103.00	6.03	5.91	0.01
118.00	5.56	5.78	0.05
128.00	5.77	5.63	0.02
142.00	4.54	5.31	0.59
166.00	4.82	4.22	0.36
176.00	3.46	3.46	0.00
191.00	2.06	1.85	0.05
201.00	0.10	0.36	0.07
<b>Suma del Error Cuadrático</b>			6.08

Parámetros	Valores de Parámetros	Error Estándar
$\alpha$	2.32	0.54
$\delta_1$	8.14	1.29
$p$	6.00	1.53
LOG10(N0)	8.34	0.48
$\delta_2$	150.58	10.53

<b>Promedio de Cuadrados del Error (MSE)</b>	0.4340
<b>Raíz del Error Cuadrático Medio (RMSE)</b>	0.6588
<b>R<sup>2</sup></b>	0.9175
<b>R<sup>2</sup> ajustado</b>	0.8998
<b>Tiempo de Reducción Equivalente a 4D</b>	±164.83h

Coroller et al. 2006. General Model Based on Two Mixed Weibull Distributions of Bacterial Resistance for Describing Various Shapes of Inactivation Curves. Applied and Environmental Microbiology, 72, 6493-6502



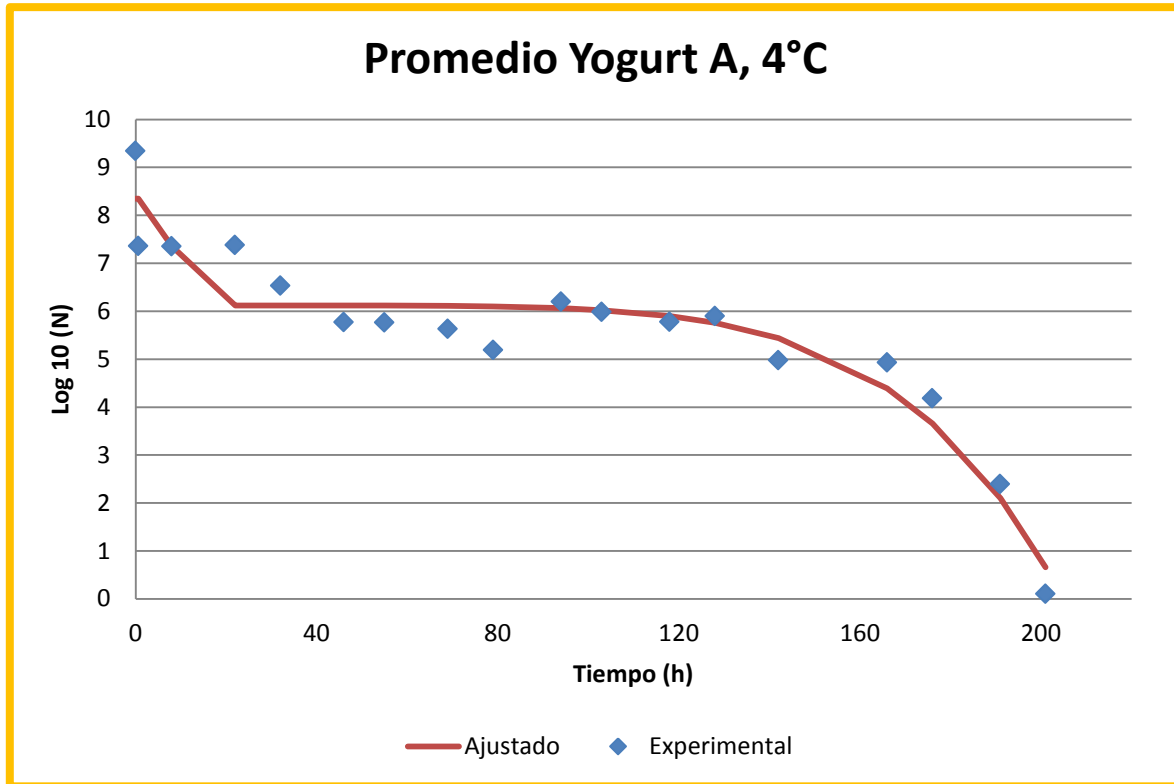
**Ajuste al Modelo de Doble Weibull para el promedio a 4°C para el Yogurt A.**

Tiempo	Concentración Medida LOG10(N)	Concentración Estimada Log10(N)	Diferencia de Cuadrados
0.01	9.34	8.35	0.99
0.60	7.36	8.35	0.99
8.00	7.35	7.35	0.00
22.00	7.38	6.12	1.58
32.00	6.53	6.12	0.17
46.00	5.77	6.12	0.12
55.00	5.76	6.12	0.13
69.00	5.63	6.11	0.23
79.00	5.19	6.10	0.83
94.00	6.20	6.06	0.02
103.00	5.98	6.02	0.00
118.00	5.77	5.90	0.01
128.00	5.90	5.76	0.02
142.00	4.98	5.44	0.22
166.00	4.93	4.39	0.29
176.00	4.18	3.66	0.27
191.00	2.39	2.10	0.08
201.00	0.10	0.66	0.32
<b>Suma del Error Cuadrático</b>			6.26

Parámetros	Valores de Parámetros	Error Estándar
$\alpha$	2.23	0.55
$\delta_1$	7.97	1.15
$p$	6.00	1.61
LOG10(N0)	8.35	0.49
$\delta_2$	151.48	10.91

<b>Promedio de Cuadrados del Error (MSE)</b>	0.4468
<b>Raíz del Error Cuadrático Medio (RMSE)</b>	0.6684
<b>R<sup>2</sup></b>	0.9086
<b>R<sup>2</sup> ajustado</b>	0.8890
<b>Tiempo de Reducción Equivalente a 4D</b>	±166.84h

Coroller et al. 2006. General Model Based on Two Mixed Weibull Distributions of Bacterial Resistance for Describing Various Shapes of Inactivation Curves. Applied and Environmental Microbiology, 72, 6493-6502





## YOGURT B

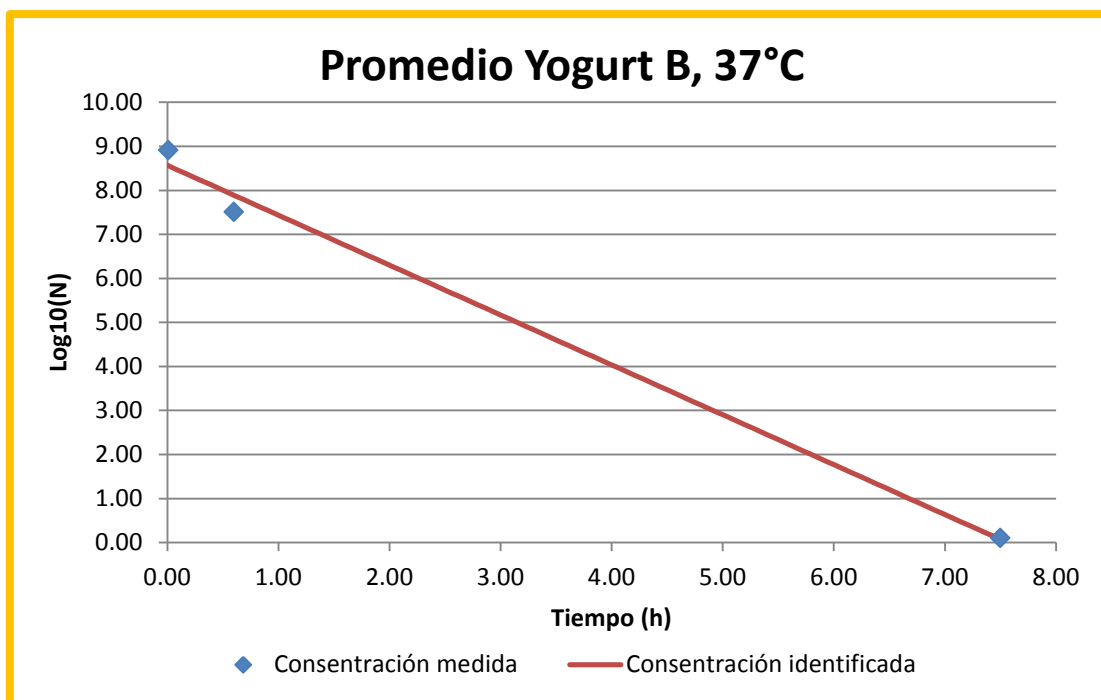
Ajuste al Modelo Lineal para el promedio a 37°C para el Yogurt B.

Tiempo	Concentración Medida Log10(N)	Concentración Estimada Log10(N)	Diferencia de Cuadrados
0.01	8.91	8.56	0.12
0.60	7.51	7.89	0.14
7.50	0.10	0.07	0.00
<b>Suma del Error Cuadrático</b>			0.27

Parámetros	Valores de Parámetros	Error Estándar
$k_{max}$	2.61	0.20
LOG10(N0)	8.57	0.38

Promedio de Cuadrados del Error (MSE)	0.2669
Raíz del Error Cuadrático Medio (RMSE)	0.5166
$R^2$	0.9940
$R^2$ ajustado	0.9881
Tiempo de Reducción Equivalente a 4D	±3.54 h

W.D. Bigelow and J.R. Esty 1920. The thermal death point in relation to typical thermophylic organisms. Journal of Infectious Diseases, 27, 602







**Ajuste al Modelo de Doble Weibull para la muestra 1 a 4°C para el Yogurt B.**

Tiempo	Concentración Medida Log10(N)	Concentración Identificada Log10(N)	Diferencia de Cuadrados
0.01	8.91	8.91	0.00
0.60	7.29	7.29	0.00
7.50	7.04	6.61	0.19
21.00	6.40	6.53	0.02
31.00	6.00	6.32	0.11
46.00	5.59	5.55	0.00
50.50	5.07	5.17	0.01
55.00	4.56	4.71	0.02
70.00	2.88	2.40	0.23
79.00	0.10	0.34	0.06
<b>Promedio del Error Cuadrático</b>			0.63

Parámetros	Valores de Parámetros	Error Estándar
$\alpha$	2.29	0.43
$\delta_1$	0.51	0.05
$p$	3.29	0.47
<b>LOG10(N0)</b>	8.91	0.36
$\delta_2$	45.21	3.72

<b>Promedio de Cuadrados del Error (MSE)</b>	0.1054
<b>Raíz del Error Cuadrático Medio (RMSE)</b>	0.3246
<b>R<sup>2</sup></b>	0.9885
<b>R<sup>2</sup> ajustado</b>	0.9828
<b>Tiempo de Reducción Equivalente a 4D</b>	±53.73 h

Coroller et al. 2006. General Model Based on Two Mixed Weibull Distributions of Bacterial Resistance for Describing Various Shapes of Inactivation Curves. Applied and Environmental Microbiology, 72, 6493-6502

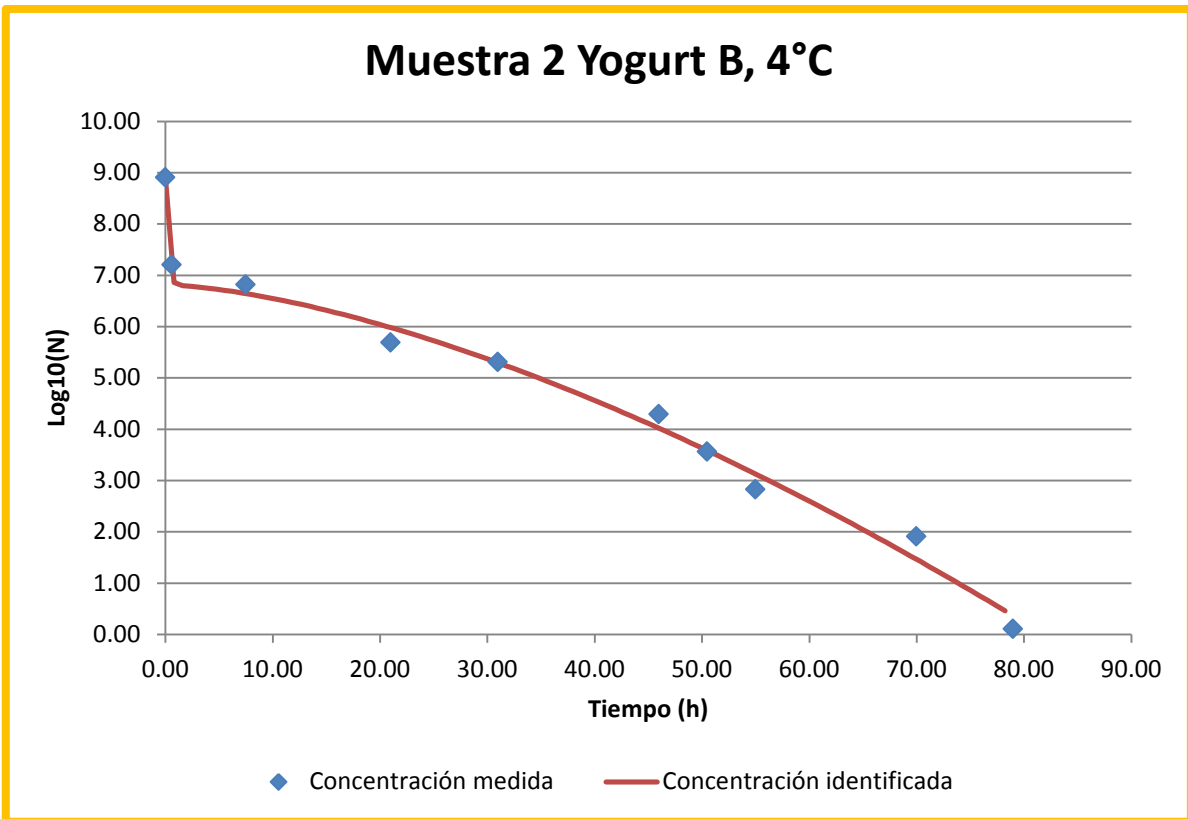
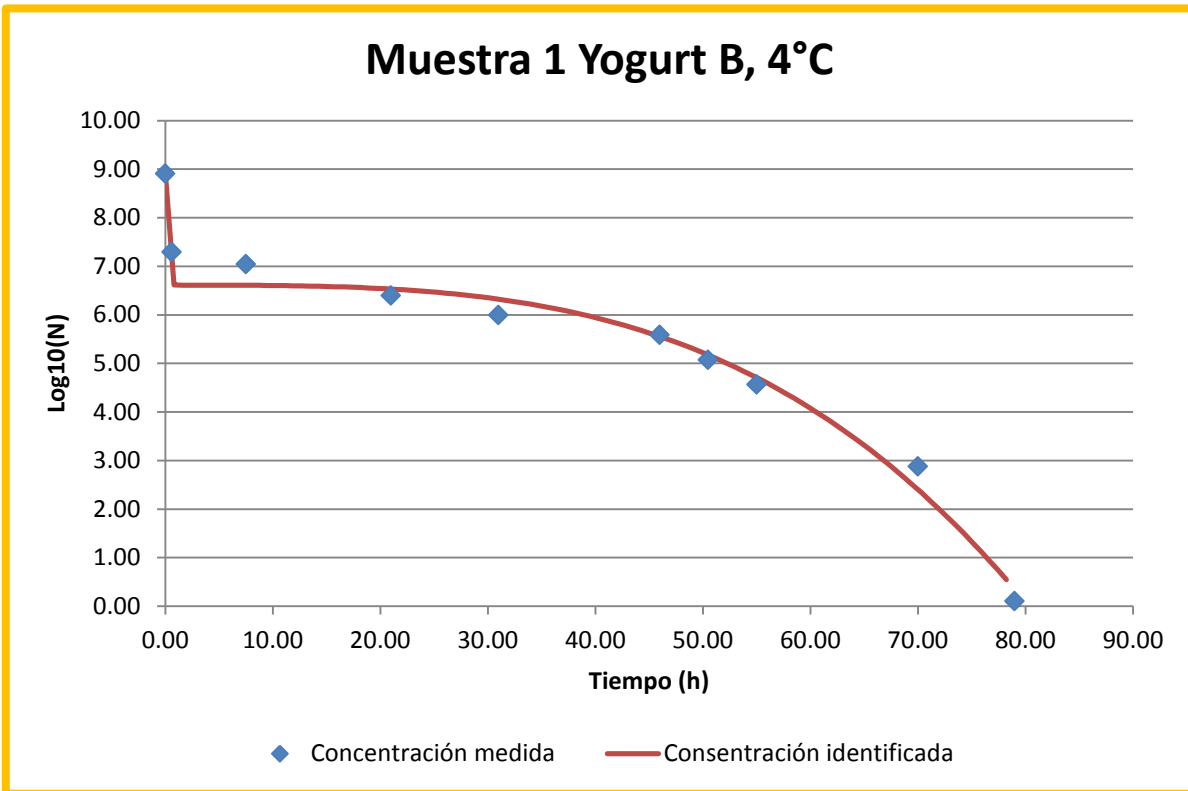
**Ajuste al Modelo de Doble Weibull para la muestra 2 a 4°C para el Yogurt B.**

Tiempo	Concentración Medida Log10(N)	Concentración Estimada Log10(N)	Diferencia de Cuadrados
0.01	8.91	8.91	0.00
0.60	7.20	7.20	0.00
7.50	6.82	6.64	0.03
21.00	5.69	5.98	0.09
31.00	5.30	5.29	0.00
46.00	4.29	4.02	0.07
50.50	3.55	3.58	0.00
55.00	2.82	3.13	0.09
70.00	1.90	1.46	0.19
79.00	0.10	0.36	0.07
<b>Suma del Error Cuadrático</b>			0.55

Parámetros	Valores de Parámetros	Error Estándar
$\alpha$	2.09	0.50
$\delta_1$	0.39	0.10
$p$	1.55	0.24
LOG10(N0)	8.91	0.33
$\delta_2$	23.65	4.84

Promedio de Cuadrados del Error (MSE)	0.0917
Raíz del Error Cuadrático Medio (RMSE)	0.3028
$R^2$	0.9914
$R^2$ ajustado	0.9871
Tiempo de Reducción Equivalente a 4D	$\pm 36.35$

Coroller et al. 2006. General Model Based on Two Mixed Weibull Distributions of Bacterial Resistance for Describing Various Shapes of Inactivation Curves. Applied and Environmental Microbiology, 72, 6493-6502





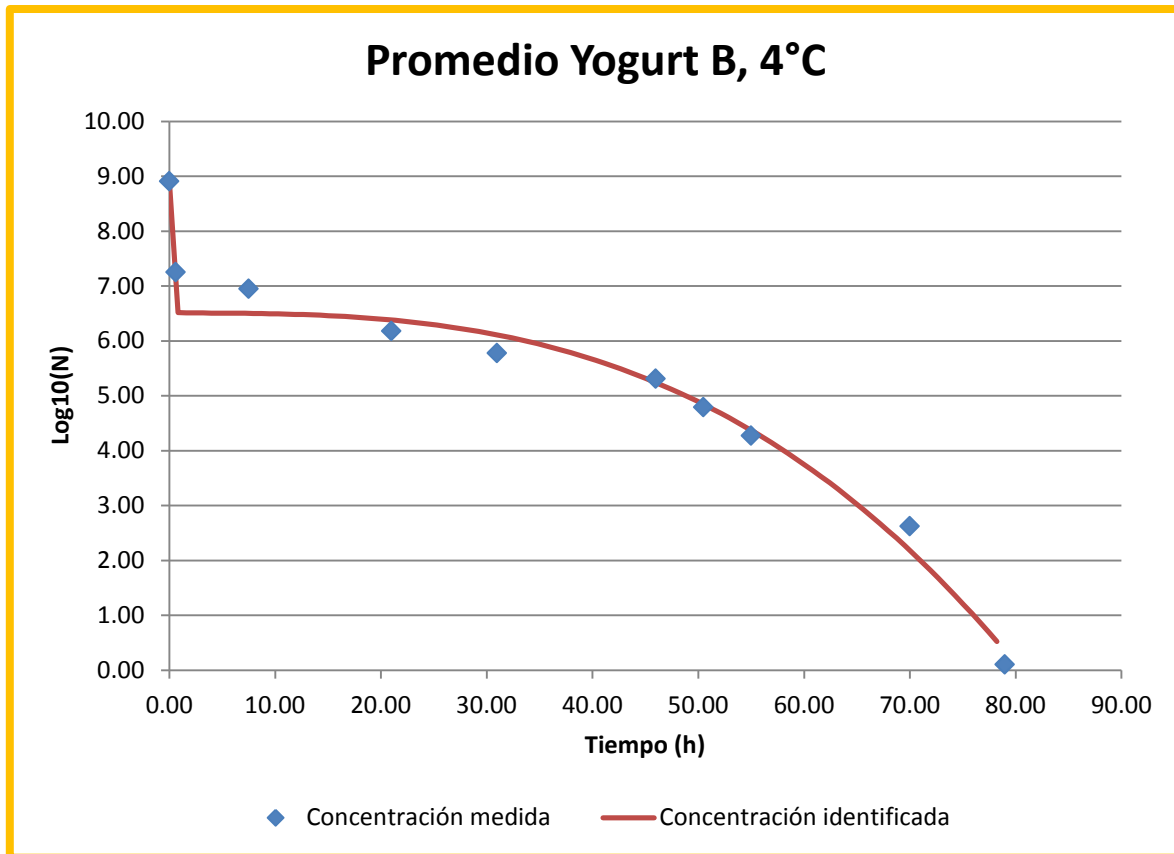
Ajuste al Modelo de Doble Weibull para el promedio a 4°C para el Yogurt B.

Tiempo	Concentración Medida LOG10(N)	Concentración Estimada Log10(N)	Diferencia de Cuadrados
0.01	8.91	8.91	0.00
0.60	7.25	7.25	0.00
7.50	6.94	6.50	0.19
21.00	6.17	6.38	0.04
31.00	5.77	6.11	0.11
46.00	5.31	5.24	0.00
50.50	4.79	4.84	0.00
55.00	4.27	4.37	0.01
70.00	2.62	2.18	0.19
79.00	0.10	0.35	0.06
<b>Suma del Error Cuadrático</b>			0.62

Parámetros	Valores de Parámetros	Error Estándar
$\alpha$	2.39	0.44
$\delta_1$	0.50	0.06
$p$	2.92	0.42
LOG10(N0)	8.91	0.35
$\delta_2$	42.41	3.94

Promedio de Cuadrados del Error (MSE)	0.1035
Raíz del Error Cuadrático Medio (RMSE)	0.3217
$R^2$	0.9889
$R^2$ ajustado	0.9834
Tiempo de Reducción Equivalente a 4D	$\pm 50.57$ h

Coroller et al. 2006. General Model Based on Two Mixed Weibull Distributions of Bacterial Resistance for Describing Various Shapes of Inactivation Curves. Applied and Environmental Microbiology, 72, 6493-6502





## YOGURT C

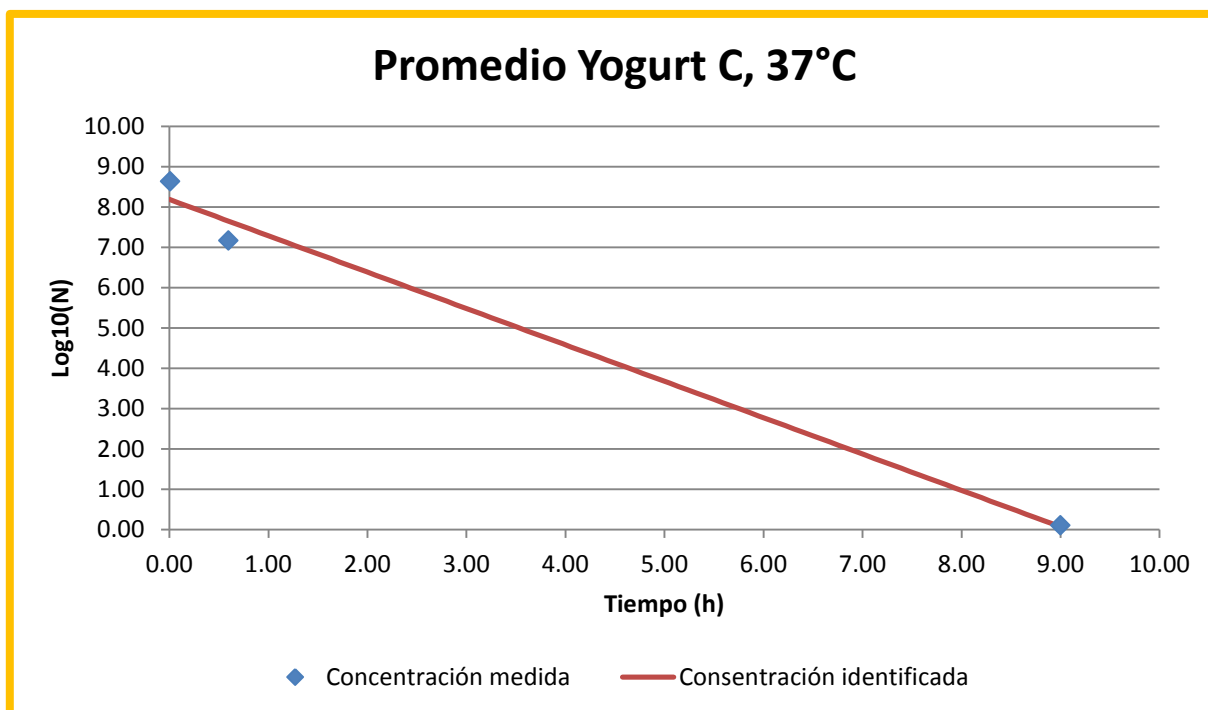
Ajuste al Modelo Lineal para el promedio a 37°C para el Yogurt C.

Tiempo	Concentración Medida Log10(N)	Concentración Estimada Log10(N)	Diferencia de Cuadrados
0.01	8.63	8.18	0.20
0.60	7.16	7.65	0.23
9.00	0.10	0.07	0.00
<b>Suma del Error Cuadrático</b>			0.44

Parámetros	Valores de Parámetros	Error Estándar
$k_{max}$	2.08	0.21
LOG10(N0)	8.19	0.48

Promedio de Cuadrados del Error (MSE)	0.4371
Raíz del Error Cuadrático Medio (RMSE)	0.6611
$R^2$	0.9895
$R^2$ ajustado	0.9790
Tiempo de Reducción Equivalente a 4D	±4.51 h

W.D. Bigelow and J.R. Esty 1920. The thermal death point in relation to typical thermophylic organisms. Journal of Infectious Diseases, 27, 602



**Ajuste al Modelo de Doble Weibull para la muestra 1 a 4°C para el Yogurt C.**

Tiempo	Concentración Medida Log10(N)	Concentración Estimada Log10(N)	Diferencia de Cuadrados
0.01	8.63	8.63	0.00
0.60	7.09	7.09	0.00
9.00	6.92	6.59	0.11
23.00	6.31	6.47	0.03
33.00	6.33	6.33	0.00
46.00	6.00	6.06	0.00
57.00	5.57	5.76	0.04
70.00	5.23	5.33	0.01
80.00	5.03	4.93	0.01
95.00	4.31	4.24	0.01
105.50	3.32	3.68	0.13
118.00	2.69	2.94	0.06
128.00	3.23	2.28	0.90
142.00	1.48	1.27	0.04
150.00	0.10	0.65	0.30
<b>Suma del Error Cuadrático</b>			1.63

Parámetros	Valores de Parámetros	Error Estándar
$\alpha$	2.02	0.49
$\delta_1$	0.46	0.10
$p$	2.02	0.30
LOG10(N0)	8.63	0.40
$\delta_2$	61.98	8.60

<b>Promedio de Cuadrados del Error (MSE)</b>	0.1483
<b>Raíz del Error Cuadrático Medio (RMSE)</b>	0.3850
<b>R<sup>2</sup></b>	0.9779
<b>R<sup>2</sup> ajustado</b>	0.9719
<b>Tiempo de Reducción Equivalente a 4D</b>	±87.01 h

Coroller et al. 2006. General Model Based on Two Mixed Weibull Distributions of Bacterial Resistance for Describing Various Shapes of Inactivation Curves. Applied and Environmental Microbiology, 72, 6493-6502

**Ajuste al Modelo de Doble Weibull para la muestra 2 a 4°C para el Yogurt C.**

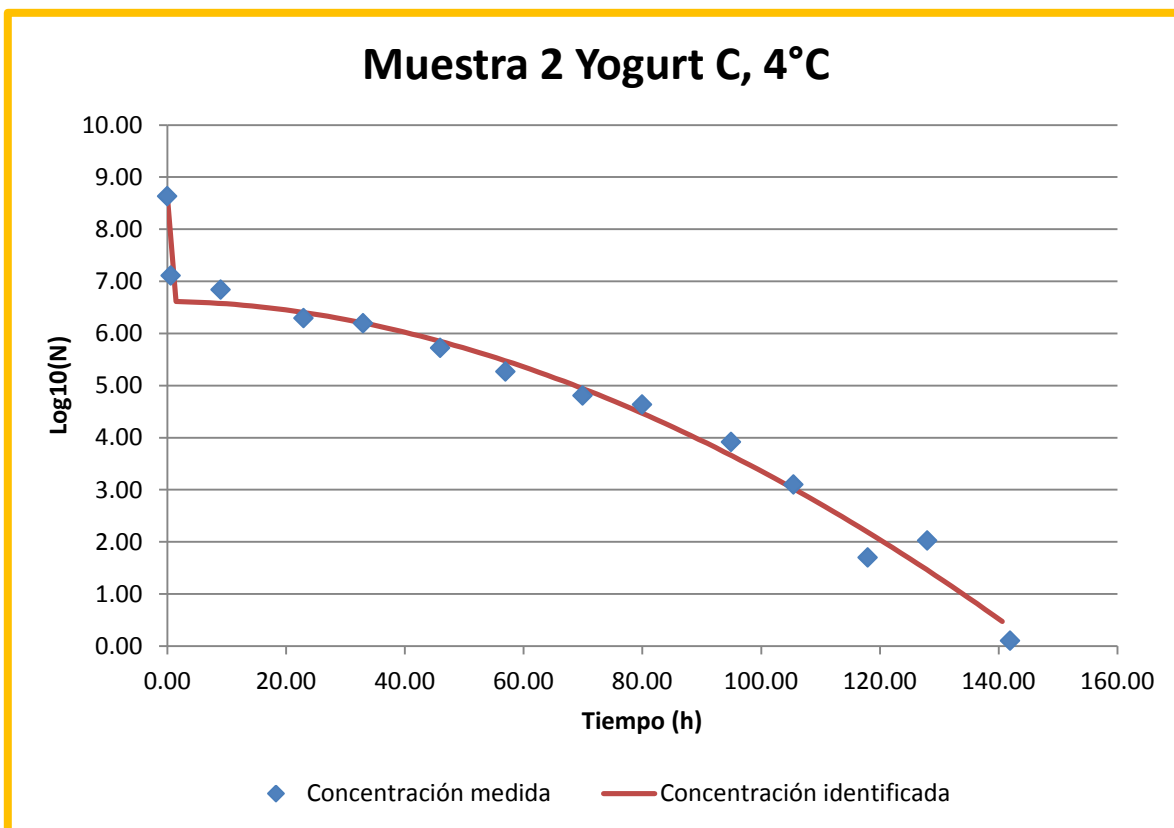
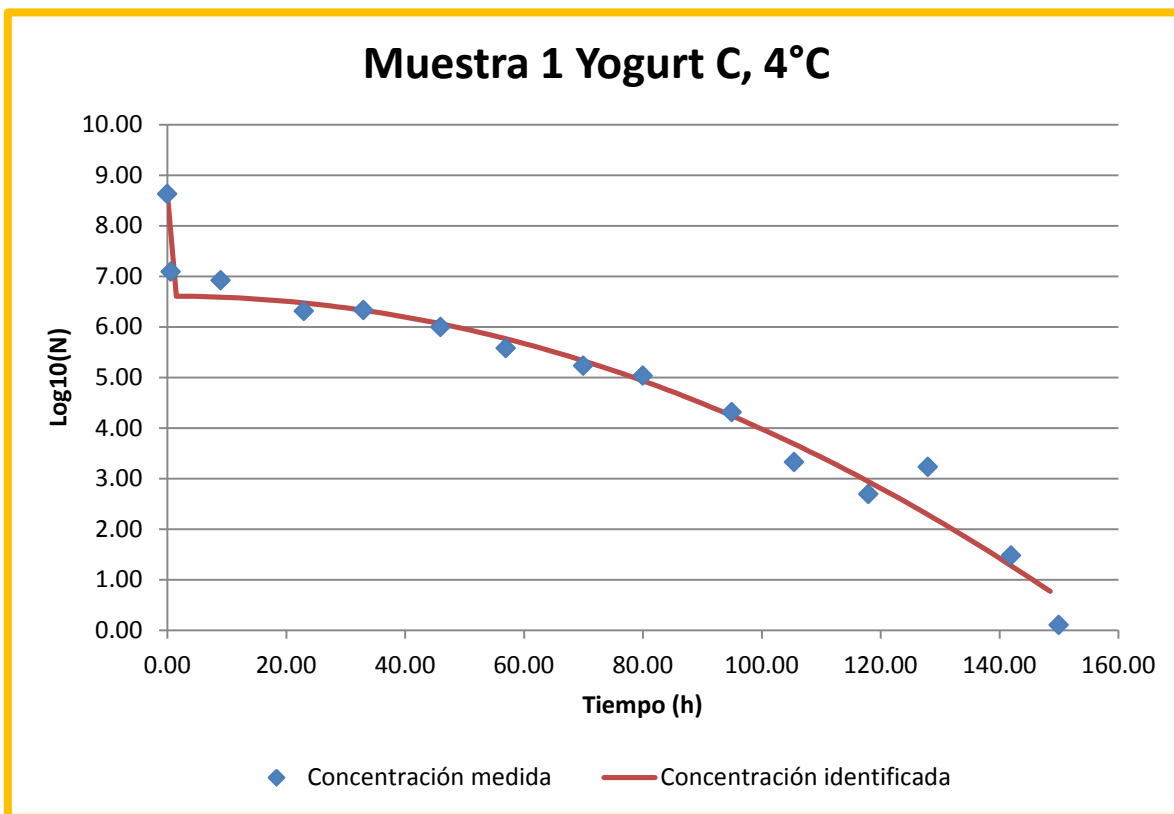
Tiempo	Concentración Medida LOG10(N)	Concentración Estimada Log10(N)	Diferencia de Cuadrados
0.01	8.63	8.63	0.00
0.60	7.11	7.11	0.00
9.00	6.84	6.58	0.07
23.00	6.29	6.40	0.01
33.00	6.19	6.20	0.00
46.00	5.72	5.85	0.02
57.00	5.27	5.47	0.04
70.00	4.81	4.94	0.02
80.00	4.63	4.47	0.03
95.00	3.92	3.66	0.07
105.50	3.10	3.02	0.01
118.00	1.70	2.18	0.23
128.00	2.02	1.46	0.32
142.00	0.10	0.36	0.07
<b>Suma del Error Cuadrático</b>			0.88

Parámetros	Valores de Parámetros	Error Estándar
$\alpha$	2.01	0.39
$\delta_1$	0.45	0.09
$p$	1.86	0.22
LOG10(N0)	8.63	0.31
$\delta_2$	53.12	6.49

<b>Promedio de Cuadrados del Error (MSE)</b>	0.0876
<b>Raíz del Error Cuadrático Medio (RMSE)</b>	0.2960
<b>R<sup>2</sup></b>	0.9879
<b>R<sup>2</sup> ajustado</b>	0.9843
<b>Tiempo de Reducción Equivalente a 4D</b>	±76.69 h

Coroller et al. 2006. General Model Based on Two Mixed Weibull Distributions of Bacterial Resistance for Describing Various Shapes of Inactivation Curves. Applied and Environmental Microbiology, 72, 6493-6502







Ajuste al Modelo de Doble Weibull para el promedio a 4°C para el Yogurt C.

Tiempo	Concentración Medida LOG10(N)	Concentración Estimada Log10(N)	Diferencia de Cuadrados
0.01	8.63	8.63	0.00
0.60	7.10	7.10	0.00
9.00	6.88	6.59	0.08
23.00	6.30	6.44	0.02
33.00	6.27	6.27	0.00
46.00	5.88	5.96	0.01
57.00	5.45	5.63	0.04
70.00	5.07	5.17	0.01
80.00	4.88	4.75	0.02
95.00	4.16	4.04	0.01
105.50	3.22	3.47	0.06
118.00	2.43	2.73	0.09
128.00	2.96	2.09	0.75
142.00	1.18	1.11	0.00
150.00	0.10	0.51	0.17
<b>Suma del Error Cuadrático</b>			1.26

Parámetros	Valores de Parámetros	Error Estándar
$\alpha$	2.01	0.44
$\delta_1$	0.45	0.10
$p$	1.89	0.25
LOG10(N0)	8.63	0.36
$\delta_2$	57.46	7.63

Promedio de Cuadrados del Error (MSE)	0.1147
Raíz del Error Cuadrático Medio (RMSE)	0.3386
$R^2$	0.9837
$R^2$ ajustado	0.9792
Tiempo de Reducción Equivalente a 4D	$\pm 84.01$ h

Coroller et al. 2006. General Model Based on Two Mixed Weibull Distributions of Bacterial Resistance for Describing Various Shapes of Inactivation Curves. Applied and Environmental Microbiology, 72, 6493-6502

