

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS E INGENIERÍA**



**Evaluación de la calidad microbiológica y
físicoquímica de microorganismos probióticos en
productos lácteos fermentados expendidos en la
ciudad de Ocotlán, Jalisco.**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGO
PRESENTA**

ANNABEL IBARRA CIBRIAN

DIRECTORES DE TESIS

**MTRO. PEDRO JAVIER GUERRERO MEDINA
DRA. MARÍA EUGENIA PÉREZ MORALES**

Tijuana, B.C., Junio de 2011.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
Justificación	2
ANTECEDENTES	5
Historia	7
Flora intestinal	9
Microorganismos probióticos	13
Prebióticos	15
Uso de los probióticos en la medicina. Salud y enfermedad	18
Los probióticos y la nutrición	24
Los probióticos y la biotecnología	27
El futuro de los probióticos	29
OBJETIVOS	30
METODOLOGÍA	31
Materiales y métodos.	32
Técnicas fisicoquímicas	32
Método para la de terminación de temperatura	32
Método para la determinación de acidez	32
Método para la determinación de pH	33
Técnicas microbiológicas	33
NOM-110-SSA1-1994	33
NOM-113-SSA1-1994	34
NOM-114-SSA1-1994	35
NOM-115-SSA1-1994	35
Cuenta microscópica de bacterias acido-lácticas	37
Técnicas para análisis organoléptico	37
Prueba de perfil de sabor	38
Textura	40
Muestreo y manejo de muestras	40
Materiales y equipos	41
RESULTADOS	42
DISCUSION	45
CONCLUSIONES	47
REFERENCIAS	49

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición de las leches fermentadas (Codex Alimentarius)...	6
Tabla 2. Hitos en la historia de los alimentos fermentados.....	7
Tabla 3. Productos tradicionales y otros más modernos con cepas probióticas.....	27
Tabla 4. Parámetros fisicoquímicos y microbianos evaluados de los productos lácteos fermentados expendidos en la ciudad de Ocotlán, Jalisco.....	42
Tabla 5. Parámetros sanitarios evaluados de los productos lácteos fermentados expendidos en la ciudad de Ocotlán, Jalisco.....	43
Tabla 6. Parámetros organolépticos evaluados de los productos lácteos fermentados expendidos en la ciudad de Ocotlán, Jalisco.....	44

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. La interacción entre probiótico, prebiótico y flora intestinal.....	17
---	----

INTRODUCCIÓN

En la actualidad el consumo de microorganismos probióticos se está incrementando exponencialmente, este producto comercial ha crecido gracias al interés de los consumidores en virtud de tener propiedades de colonizar el tracto intestinal y formar parte de la flora intestinal y con ello generar beneficios en la salud de los consumidores. Bajo esta premisa resulta importante conocer las evidencias científicas que avalen estas características saludables, así como la cantidad y tipo de microorganismos que están tipificados como probióticos, que impacta el sector alimentario en la ciudad de Ocotlán. A la vez conocer los procesos de producción y condiciones de almacenamiento en vida comercial y la efectividad de que contengan estos microorganismos.

En este ámbito, es muy importante que los consumidores de estos productos tengan una información adecuada de la composición, variedad y calidad de los productos lácteos con microorganismos probióticos; así como su beneficio comprobado en la salud e implantación en la flora intestinal. Además se contribuye a impulsar el consumo de productos lácteos con probióticos. Con esto se coadyuvará, a desmitificar estos productos y dar información veraz al consumidor para que haga compras más razonadas de este alimento. Ahora bien, la importancia de este estudio, tendrá repercusiones sociales sobre la población de una región, dado que es el producto que ha crecido en el mercado de los alimentos orgánicos.

JUSTIFICACIÓN

La leche y los productos lácteos por su composición química y contenido de humedad son un excelente medio de cultivo para todos los microorganismos patógenos y productores de alteraciones, con inclusiones de mohos y levaduras, por lo cual quedan situados dentro del grupo de los alimentos más perecederos. En la actualidad los productos lácteos en los países desarrollados son elaborados en plantas con tecnología moderna, produciendo alimentos de alto valor nutritivo y sin riesgo para la salud. Sin embargo, se han presentado brotes de infección e intoxicación causados por la ingestión de lácteos. No obstante, en los países en vías de desarrollo la elaboración de productos lácteos se desarrolla en empresas, comunidades y zonas periféricas de las grandes urbes, con un deficiente control sanitario. Todo eso implica a la posibilidad de consumir alimentos con riesgo para la salud. Los alimentos fermentados forman parte de la dieta humana desde tiempos remotos. En nuestro medio son comunes los productos lácteos fermentados que incluyen muchos tipos de leches, quesos y cremas; cárnicos como diferentes tipos de salchichas y lomo embuchado; aceitunas, y menos populares los pepinos y la col agria. En el alimento fermentado las condiciones para la supervivencia y desarrollo de los microorganismos patógenos suelen ser precarias (Fernández-Escartín, 2009b).

El yogurt es uno de los productos lácteos fermentados más antiguos. Se origina al inocular en leche una mezcla simbiótica de *Streptococcus thermophyllus* y *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* (Kosikowski y Mistry, 1997, CODEXSTAN 243-2003). La producción inicial del ácido se debe principalmente a *S. thermophyllus* y el sabor característico es producido por *L. bulgaricus*. La producción tecnológica implica las etapas de estandarización, pasteurización, inoculación, fermentación, enfriamiento, adición de frutas y/o edulcorantes, envasado y la venta (Normas Oficiales Mexicanas NOM). El nombre turco yogurt se aplica a la leche de vaca, cabra, oveja o búfalo, que se fermenta con cultivo láctico. El reporte del comité de las normas alimenticias indica que el yogurt es producto de leche de vaca coagulada y acidificada que se fabrica a partir de cualquier combinación de leche, en la cual se produce

después de la pasteurización, una fermentación con ácido láctico mediante cultivos bacterianos u otras bacterias lácticas adecuadas. La fabricación del yogurt, hoy día es muy cuidadosa, lo que ha hecho, junto a la gran variedad de sabores que se han introducido en el producto, que alcance una gran popularidad. Su consistencia es bastante compacta, similar a la de la gelatina. Generalmente la vida útil del yogurt es de tres semanas, bajo refrigeración a 5°C. Durante este período continúa desarrollándose la acidez, aunque muy lentamente, hasta que el pH se reduce a un valor de 4 ó inferior. El resultado final es un sabor ácido muy pronunciado que para muchos consumidores es objetable.

El yogurt puede someterse a un tratamiento térmico tras la incubación con el objeto de destruir los lactobacilos y estreptococos; con ello se previene el desarrollo adicional de acidez. Esto último es bastante discutible pues precisamente la importancia de los alimentos probióticos, como el yogurt, es ingerir una masa de bacterias vivas para que colonicen el tubo digestivo y mejoren la digestión del consumidor. Si se pasteuriza antes de su consumo deja de ser yogurt. En España un yogurt pasteurizado es un producto que comercialmente se le denomina “Postre láctico”. El uso de un equipo apropiado y el envasado aséptico permite prolongar la vida útil del yogurt, más allá de la habitual del producto no sometido a tratamiento térmico. Las bacterias ácido-lácticas están íntimamente asociadas con los alimentos y la salud. Por esta razón se han convertido en el objeto principal de estudio de la moderna investigación biotecnológica (Lee y Wong, 1998; Van de Water y Naiyanetr, 2008).

Los cuatro enfoques que pertenecen al mismo paradigma de los probióticos son: La **salud**: es un estado completo de bienestar físico, mental y social, y no solamente la ausencia de afecciones o enfermedades (OMS). La **nutrición**: es el proceso biológico en el que los organismos asimilan los alimentos y los líquidos necesarios para el funcionamiento, el crecimiento y el mantenimiento de sus funciones vitales. La nutrición también es el estudio de la relación entre los alimentos con la salud, especialmente en la determinación de una dieta. La **alimentación** comprende un conjunto de actos voluntarios y conscientes que van dirigidos a la elección, preparación e ingestión de los alimentos, fenómenos

muy relacionados con el medio sociocultural y económico (medio ambiente) y determinan al menos en gran parte, los hábitos dietéticos y estilos de vida.

Biología. Se define como las técnicas o métodos para elaborar productos (alimenticios, farmacéuticos, químicos) utilizando entidades biológicas.

ANTECEDENTES

La Norma del Codex Alimentarius (2007) para leches fermentadas, las define como aquellos productos lácteos obtenidos mediante fermentación de la leche, que pueden haber sido elaborados a partir de productos obtenidos de la leche con o sin modificaciones en la composición, con arreglo a las limitaciones que se estipulan en la Sección 3.3 (ver tabla 1) de dicha norma, por medio de la acción de microorganismos adecuados y teniendo como resultado la reducción del pH con o sin coagulación (precipitación isoeléctrica de las proteínas). Los microorganismos serán viables, activos y abundantes en el producto hasta la fecha de duración mínima salvo si el producto es tratado térmicamente tras la fermentación, en cuyo caso no se aplica el requisito de microorganismos viables. Walstra y cols., 2001, clasifican a las leches fermentadas en función de diferentes parámetros:

A) Según el tipo de fermentación: 1. Fermentación láctica pura: realizada por cultivos iniciadores mesófilos (*Lactococcus lactis cremoris* o *Lactococcus lactis*, *Leuconostoc cremoris* o *lactis*, originando leche acidificada, mazada fermentada, nata acidificada, ymer, langfil y viili) o por iniciadores termófilos (*Lactobacillus bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus* y/o *Bifidobacterium bifidum*). 2. Fermentación láctica y alcohólica: producida por *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Lactobacillus* y *Saccharomyces* o *Candida kluyveromyces* para producir kéfir y kumiss, respectivamente.

B) Según el contenido graso: puede ser enriquecida (si se le añade nata), entera, semi-descremada o descremada.

C) Según la concentración de la leche: existen diferentes variedades de yogurt en función de la concentración de la leche que se utilice en su elaboración, llegando incluso a utilizar leche evaporada para obtener el yogurt concentrado.

D) Según el origen de la leche: la mayoría de las leches fermentadas se realizan con leche de vaca pero también se puede utilizar leche de oveja,

cabra, yegua, búfala, etc. El resultado de combinar estos diferentes parámetros y procesos es la obtención de una gran variedad de leches fermentadas.

Tabla 1. Composición de las leches fermentadas (del Codex Alimentarius, 2007)

	Leche fermentada	Yogur, yogur en base a cultivos alternativos y leche acidofila	Kéfir	Kumys
Proteína láctea ^(a) (% w/w)	Min 2,7%	Min 2,7%	Min 2,7%	
Grasa láctea (% w/w)	Menos del 10%	Menos del 15%	Menos del 10%	Menos del 10%
Acidez valorable, expresada como % de ácido láctico	Min 0,3%	Min 0,6%	Min 0,6%	Min 0,7%
Etanol (% vol./w)				Min 0,5%
Suma de microorganismos que comprenden el cultivo determinado en la sección 2.1 (ufc/g en total)	Min 10 ⁷	Min 10 ⁷	Min 10 ⁷	Min 10 ⁷
Microorganismos etiquetados^(b) (ufc/g en total)	Min 10 ⁶	Min 10 ⁶		
Levaduras (ufc/g)			Min 10 ⁴	Min 10 ⁴

(a) El contenido de proteínas es 6,38 multiplicado por el nitrógeno Kheldahl total determinado

(b) Se aplica cuando en el etiquetado se realiza una declaración de contenido que se refiere a la presencia de un microorganismo específico (aparte de aquellos especificados en la sección 2.1 para el producto en cuestión) que ha sido agrado como complemento del cultivo específico.

Rodríguez Jerez (2003) define que un yogurt es una leche fermentada que se obtiene de la transformación de la lactosa en ácido láctico, debido a la acción de dos microorganismos, *Lactobacillus bulgaricus* (responsable de la acidificación) y *Streptococcus thermophilus* (responsable de los sabores y aromas característicos), los cuales deben ser viables y estar en las cantidades determinadas por la legislación. Según Condony Salcedo (1988), e Hidalgo (2001), Las leches fermentadas se consumen desde la antigüedad. Ya en los textos bíblicos se encuentran referencias sobre estos productos que al principio se producían de manera espontánea y 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.

HISTORIA

En el libro “Handbook of Fermented Functional Foods”, editado por Edward R. Farnworth 2008, muestra la evolución histórica de los productos fermentados (ver tabla 2).

Tabla 2. Hitos en la historia de los alimentos fermentados

Hito	Desarrollo/localización
Ca. 10,000 A.C. era media	Evolución de la fermentación del rescate del excedente. Probablemente por pre-arianos
Ca. 7,000 A.C.	Practica de la elaboración del queso y el pan
Ca. 6,000 A.C.	Elaboración del vino en Este cercano
Ca. 5,000 A.C.	Descripción del valor de la nutrición y la salud de las bebidas y leches fermentadas
Ca. 3,500 A.C.	Elaboración del pan en Egipto
Ca. 1,500 A.C.	Preparación de la salchicha de carne por los antiguos Babilónicos
2,000 A.C.– 1,200 D.C.	Diferentes tipos de leches fermentadas en diferentes regiones.
Ca. 300 D.C.	Preservación de vegetales por fermentación por los Chinos
500 -1,000 D.C.	Desarrollo de alimentos fermentados basados en cereales-legumbres
1881	Publicación de la literatura de preparación sobre Koji y Sake
1907	Publicación del libro Prolongación de la Vida por Eli Metchnikoff describiendo beneficios terapéuticos de leches fermentadas.
1900- 1930	Aplicación de la microbiología para la fermentación, uso de cultivos definidos
1970- presente	Desarrollo de productos conteniendo cultivo probióticos o flora intestinal benéfica

Source: Data compiled from Joshi, V.K. and Pandey, A., Biotechnology: Food Fermentations, Vol. 1, Educational Publishers and Distributors, New Delhi, 1999, 1–24; Pederson, C.S., Microbiology of Food Fermentations, AVI, Westport, CT, 1971, 1–274; IDF, Fermented Milks, IDF Bull., No. 179, 16–32, 1984; Metchnikoff, E., The Prolongation of Life, G.P. Putnam's Sons, New York, 1908; Steinkraus, K.H., Handbook of Indigenous Fermented Foods, Marcel Dekker, Inc., New York, 1983; Padmaja, G. and George, M., in Biotechnology: Food Fermentations, Vol. II, Joshi V.K. and Pandey, A., Eds., Educational Publishers and Distributors, New Delhi, 1999, 523–582.

Elie Metchnikoff fue un científico muy respetado en los años 1900's, fue director del Instituto Louis Pasteur en París, Francia, desde 1889 hasta su muerte en 1916. El Instituto Louis Pasteur fue probablemente la institución médica más respetada en esos tiempos. Metchnikoff recibió el Premio Nobel en 1908 por sus trabajos de fagocitosis en relación a la enfermedad, inmunidad y la vida

normal saludable. Metchnikoff, 1908. A principios del siglo XX, cuando la ciencia era más filosofía que una ciencia empírica, el estudio y aislamiento de bacterias causales de enfermedad, observó y después reportó en la literatura científica que los búlgaros tenían una esperanza de vida mayor a 87 años y que cuatro de cada mil vivían más de un siglo. El se obsesionó con el estudio de la longevidad y analizó cuidadosamente su ambiente y dieta. Cuando Metchnikoff descubrió que la dieta búlgara consistía principalmente en productos lácteos cultivados, investigó para encontrar las peculiaridades de la leche fermentada que podrían ser responsable de la longevidad observada. El aisló un bacilo de los productos lácteos fermentados. Este organismo producía ácido láctico y era responsable de un sabor agrio en la leche fermentada. Metchnikoff realizó todos sus esfuerzos para estudiar los atributos de este organismo llamado *Bacillus bulgarian*, mas tarde nombrado *Lactobacillus bulgaricus*. Metchnikoff inicio las bases científicas del yogurt conocido hoy. Aunque algunas de sus teorías fueron incorrectas y más tarde modificadas, su filosofía de pensamiento estimuló considerablemente el interés en los productos lácteos agrios.

En una consulta de expertos FAO/OMS (2001) sobre la evaluación de las propiedades saludables y nutricionales de los probióticos en los alimentos, comentan que fueron Metchnikoff y Tissier los primeros en proponer la utilización de bacterias como probióticos, pero este término no se acuñó hasta 1965, cuando Lilly y Stillwell lo utilizaron para designar a las sustancias producidas por microorganismos que promueven el crecimiento de otros microorganismos. En 1989, R. Fuller los redefine como un “suplemento dietético a base de microbios vivos, que afecta de forma benéfica al animal huésped mejorando su equilibrio intestinal”. Otra definición más reciente de Guarner y Schaafsma 1998: “son microorganismos vivos que cuando se consumen en cantidades apropiadas, confieren al huésped efectos saludables”.

Flora Intestinal

Fernández-Escartín, 2009 (a), Reporta que antiguamente se creía que la mayoría de las bacterias arrojadas en las heces se encontraban muertas. El mejoramiento de las técnicas de muestreo y análisis para microorganismos anaeróbicos permitió recuperar al menos el 90% de los detectados al examen microscópico directo. También es un hecho bien conocido en la actualidad que la administración oral de antibióticos de amplio espectro altera la flora intestinal y puede inducir diarrea. Se estima que existen alrededor de 100 trillones (10^{14}) de bacterias viables en el contenido intestinal de un adulto distribuidas entre 100 especies distintas (Mitsuoka, 1996); otros anotan más de 500 especies entre 190 géneros (Wilson, 2005). Pueden distribuirse en tres grupos: 1.- Bacterias lácticas: *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* y *Streptococcus*. 2.- Anaerobios estrictos: *Bacteroidaceae*, *Eubacterium*, *Peptococcaceae*, *Veillonella*, *Ruminococcus*, *Megasphaera*, *Gemmiger*, *Clostridium* y *Treponema*. 3.- Anaerobios facultativos: *Enterobacteriaceae*, *Corynebacterium*, *Staphylococcus*, *Bacillus* y levaduras. Vinculados con la flora intestinal encontramos a un grupo especial de microorganismos (probióticos) que ofrece una potencial aplicación en la prevención contra las infecciones intestinales.

Escalante (2001), establece que el tubo digestivo del recién nacido es un medio estéril. Inmediatamente después del nacimiento las bacterias entran a través de la boca y la nariz como consecuencia del contacto con el ambiente. Muchas de estas bacterias mueren en el estómago, mientras que otras son capaces de alcanzar de manera específica ciertas partes del intestino. El intestino del recién nacido presenta una atmósfera aerobia, por lo que los primeros microorganismos en colonizarlos son aerobios tales como *Escherichia coli* y *Enterococcus*. Durante el primer día de vida, y conforme el recién nacido es alimentado, el oxígeno intestinal disminuye y *Lactobacillus* spp. y *Bifidobacterium* spp. (Microaerófilo y anaerobio estricto, respectivamente) comienzan a proliferar en proporciones dominantes. Cuando el niño finaliza la alimentación materna, la microbiota cambia progresivamente hacia una composición parecida a la de los adultos, apareciendo microorganismos como *Bacteroides* spp y otros anaerobios estrictos que se vuelven también predominantes en el intestino delgado.

Algunos productos fermentados son fuente importante de estos microorganismos. El síndrome diarreico es el principal daño que se asocia con el consumo de alimentos de deficiente calidad sanitaria. Las evidencias disponibles estimulan a numerosos investigadores hacia el desarrollo de estudios que permitan aprovechar los beneficios potenciales que estos microorganismos ofrecen en ese y otros aspectos de la salud humana. Estos incluyen entre los nutricionales (mayor digestibilidad de proteínas, disponibilidad de minerales, síntesis de vitaminas) terapéuticos (trastornos gastrointestinales, tolerancia a la lactosa, supresión de enzimas pro carcinogénicas), y profilácticas (cuadros diarreicos por diversas causas; modulación de la respuesta inmune). Se clasifican como probióticos aquellos microorganismos que administrados al hombre o animales dan lugar a efectos benéficos a través de una modificación de la actividad de la microflora nativa.

La actividad de estos microorganismos es permanente y establece una compleja, pero operativa relación, con las funciones propias de los tejidos o vísceras involucradas. Típicamente un probiótico es un habitante normal del sitio en donde se pretende establecer; de ahí que manifieste capacidad para sobrevivir y mantenerse activo. No solo no es patógeno, sino ejerce un efecto saludable en el huésped. El efecto puede ser logrado por más de una cepa de géneros distintos. El consumo de 10^{11} bacterias probióticas/día pueden disminuir la incidencia, duración y severidad de algunas enfermedades intestinales. La mayoría de los productos comerciales que contienen bacterias probióticas consisten en *Lactobacillus* (*L. acidophilus*, *L. johnsonii*, *L. casei*, *L. rhamnosus*, *L. gasseri* y *L. reuteri*), y *Bifidobacterium* (*B. bifidum*, *B. longum* y *B. infantis*). Los probióticos más estudiados incluyen especies de Bacterias ácido lácticas (BAL) como *Lactobacillus* (*acidophilus*, *casei*, *bulgaricus*), y *Bifidobacterium* (*bifidum*, *longum*, *breve*, *infantis*, *animalis*) (Fernández-Escartín, 2009b).

Actualmente se ha incrementado el interés para profundizar el conocimiento de la flora intestinal y su interacción con el huésped. Este interés surge ante la posibilidad de disponer dentro de la medicina preventiva de recursos que

contribuyan a disminuir el índice de morbilidad y mortalidad por padecimientos tan ordinarios como diarreas y tan complejos como el cáncer, que afectan de manera significativa a las diferentes poblaciones en diversas partes del mundo (Torres-Vitela, 2002).

La etiología de las diarreas infecciosas agudas es muy diversa incluye bacterias, virus y parásitos, de tal manera que una sola terapia no puede considerarse efectiva para todos los casos. Independientemente del origen, muchos de los episodios son agudos y auto limitantes por lo que es bastante difícil mostrar los efectos benéficos de un tratamiento. El recurso generalizado que se maneja para infecciones establecidas es mediante el reemplazo de fluidos y electrolitos que se pierden. Una terapia antimicrobiana específica es indicada o útil en muchos de los casos, sin embargo los antibióticos son adecuados y efectivos para reducir la duración y la severidad de la diarrea en algunas infecciones bacterianas (por ejemplo, shigelosis disintérica y salmonelosis sistémica). Sin embargo, los antibióticos comúnmente no son adecuados ni recomendados para un tratamiento empírico. (Katelaris, 1966).

Existen problemas de incrementar la resistencia a antibióticos, los costos y los efectos colaterales (que incluyen diarreas asociadas con antibióticos), que generalmente ponen fuera de lugar los beneficios potenciales de la profilaxis en muchos de los casos. Muchas preparaciones de cultivos puros o mezclas de microorganismos vivos que producen efectos beneficios al huésped son ampliamente utilizados, y se encuentran comercialmente disponibles. Los probióticos han surgido para uso como profilácticos en infecciones diarreicas agudas (tanto diarreas asociadas a los viajeros como las generadas por el uso de antibióticos) y como terapia para diarreas por infecciones establecidas. El papel que juegan las bacterias probióticas en el equilibrio de la flora intestinal y éste a su vez en el estado de salud del individuo, constituyen en la opinión de científicos en diferentes partes del mundo una alternativa para elevar el estado de salud en el hombre.

Dos de los principales géneros de bacterias involucrados en influenciar las funciones de la barrera intestinal son las bifidobacterias y bacterias ácido

lácticas. Estas pueden ser dadas con alimentos tales como yogurt y otras leches fermentadas y ciertas cepas brevemente se establecen en el intestino.

Los lactobacilos específicamente estimulan el crecimiento de bifidobacterias en el intestino y decrecen el número de clostridios y otras bacterias dañinas. Así, los componentes probióticos específicos de la dieta pueden fortalecer la barrera intestinal proveídos por la flora intestinal (Seppo Salminen, 2000).

Datos clínicos han establecidos los beneficios a la salud de los probióticos específicos. Se ha mostrado que los probióticos pueden aliviar o prevenir desordenes intestinales y reducir el riesgo de algunas enfermedades intestinales. Los probióticos son cultivos bacterianos vivos, que tienen documentado sus beneficios a la salud. Las bacterias ácido lácticas pueden modificar la microflora intestinal y sus metabolitos, incluyendo ácidos grasos de cadena corta y componentes antimicrobianos. La microflora intestinal es variable en número y composición entre el estomago, intestino delgado y el colon. En el estómago es inferior de 10^3 bacterias/gr por el bajo pH; en el intestino delgado están en un rango de 10^4 bacterias/gr a 10^6 , y 10^7 bacterias/gr en la región ileocecal (Gorbach y cols., 1967). El factor limitante de crecimiento en el intestino delgado es el transito rápido del contenido y cierta secreción como la bilis. El intestino grueso esta intensamente poblado, de 10^{11} a 10^{12} bacterias por gramo de heces, (Finegold y cols., 1983).

Las características de un microorganismo probiótico son: origen humano del género, estabilidad en medio ácido o en bilis, adhesión a la mucosa intestinal, colonización temporal en el tracto gastrointestinal de humanos, producción de componentes antimicrobianos y uso seguro para humanos (Lee y cols., 1999, Salminen y cols., 1998c).

Microorganismos Probióticos.

La Organización para la Agricultura y la Alimentación de los Naciones Unidas (FAO) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) definen probióticos como “microorganismos vivos que cuando son administrados en cantidades adecuadas confieren un beneficio a la salud del huésped”. Esta definición refleja el hecho de que los probióticos pueden ser enfocados no solamente al intestino, sino también a la cavidad bucal, la nasofaringe, el estómago, la vagina, la vejiga y la piel. No obstante no hay mucha aceptación de la comunidad científica médica (FAO/OMS, 2001).

El término “probiótico” surge en el año 1965, cuando Lilly y Stilwell lo utilizaron para describir aquellas sustancias secretadas por un microorganismo que estimula el crecimiento de otro, en contraposición al término “antibiótico”, entendido como cualquier compuesto químico utilizado para eliminar o inhibir el crecimiento de organismos que estimulan el crecimiento de organismos infecciosos. Sin embargo, el concepto, que parecía adecuado, no era totalmente correcto, ya que probióticos son todas las sustancias de carácter nutritivo y no sólo determinados microorganismos (Lilly y Stilwell, 1965). Parker, en el año 1974 fue el primero en usar “probióticos” de acuerdo con el sentido que hoy conocemos, es decir, organismos y sustancias que contribuyen al equilibrio intestinal. Fuller (1989) Intentó mejorar la definición hecha por Parker, y definió “probiótico” como cualquier suplemento alimenticio vivo que beneficia al huésped mediante la mejora de su equilibrio microbiano intestinal. Hoy se define como microorganismos vivos, principalmente bacterias, usados en forma de suplementos nutricionales que, tras ser ingeridos en cantidad suficiente, mejoran el equilibrio microbiano en el intestino de las personas o animales que los ingieren, provocando efectos beneficiosos sobre su salud, más allá de los efectos nutricionales tradicionales (Amores, 2004).

Havennaar y Huis In't Veld (1992), definen los probióticos como un cultivo mono o mixto de microorganismos vivos aplicados a animales o humanos, benefician al hospedero por mejorar las propiedades de la microflora endógena. Los parámetros para seleccionar una cepa probiótica son: cepa plenamente identificada, potencial de colonización, estabilidad del número de

células, dosis requerida, procedencia de huésped, actividad biológica, sobrevivencia in situ y eficacia demostrable (Syers, 1993).

Refugio Torres Vitela (2000a); comenta que el uso tradicional de las Bacterias Acido Lácticas (BAL) ha sido proporcionar a los productos lácteos la textura, aroma, sabor, calidad preservativa y valor nutricional, además algunos contribuyen a mejorar la salud del huésped. Esto hace que estén involucradas en la elaboración de alimentos funcionales. Las bacterias acido lácticas (BAL) se han usado en el tratamiento del sistema inmunológico, digestivo y circulatorio, en la prevención del cáncer y enfermedades transmitidas por microorganismos como diarreas, vaginitis, etc. (Ohigashi, 1996). Los resultados de estudios clínicos indican que el uso de lactobacilos en ciertos productos lácteos fermentados puede facilitar la digestión de la lactosa a los individuos intolerantes a este azúcar. También se ha visto en ciertas poblaciones, tales como niños jóvenes diarreas virales, que algunos lactobacilos pueden disminuir la duración y la severidad de las diarreas. Las BAL pueden intervenir en la disminución del colesterol. Los lactobacilos lácticos tales como: *L. acidophilus*, *L. delbrueckii*, *L. casei*, *L. gasseri* y *L. helveticus*, se cree tiene propiedades anticancerígenas los atributos antitumorales y anticancerígenos de los lactobacilos pueden resumirse de su capacidad para Inhibir los mutagénicos in vitro, el reducir enzimas productoras de carcinoma in vivo y el eliminar los tumores in vivo.

Dentro de la aplicación de probióticos para el humano podemos englobar los efectos benéficos en tres grupos: 1) Antimicrobianos, se refiere a acciones sobre microorganismos; 2) Bioquímicos, incluyen; la reducción de enzimas fecales, disminución de intolerancia a la lactosa y reducción del colesterol sérico; y 3) Fisiológicos e inmunológicos, se refiere a la influencia sobre la respuesta del huésped, estimulación del sistema inmune y reducción del riesgo de cáncer de colon.

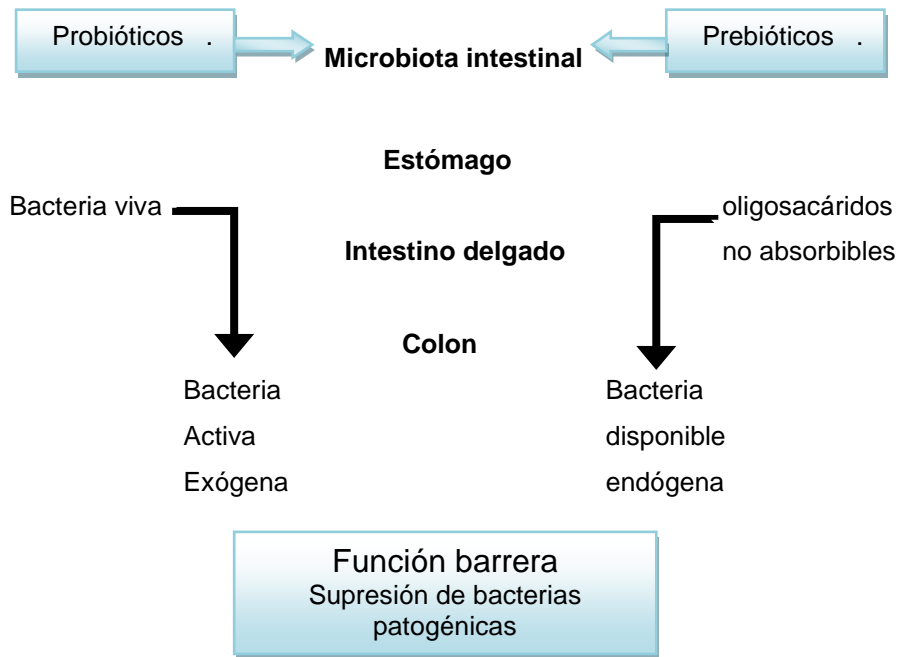
Prebióticos

Gibson y Roberfroid (1995), introdujeron el término “prebiótico” para referirse a los ingredientes no digeribles de los alimentos que afectan beneficiosamente al huésped por una estimulación selectiva del crecimiento y/o de la actividad de una o un limitado grupo de bacterias en el colon, mejorando así la salud del huésped. Los prebióticos son carbohidratos que resisten la digestión en la parte superior del tracto gastrointestinal, no se absorben en cantidades significativas, y son como consecuencia fermentados en el colon. Los ingredientes normalmente son oligosacáridos, y entre estos los de mayor interés son galactooligosacáridos y fructooligosacáridos (Crittenden y Playne, 1996, Voragen, 1998). Sanz (2003) y Silveira (2003) definen a los prebióticos: como ingredientes no digeribles por el hombre que forman parte de los alimentos y que son sustrato trófico de microorganismos. Benefician al huésped estimulando de forma selectiva el crecimiento y la actividad de bacterias intestinales. Estos ingredientes llegan al colon sin digerir y allí son fermentados por las bacterias colónicas, condicionando la selección de la flora de Bifidobacterias. Entre ellos están la lactulosa que favorece el desarrollo de los *Lactobacillus* y la inulina, galacto y fructooligosacáridos que estimulan el crecimiento de las *Bifidobacterias*. Algunos autores consideran también dentro del término a la fibra dietética. El nombre de prebiótico también se emplea para designar al alimento que contiene estos ingredientes.

Esta selectividad fue demostrada para *Bifidobacterium*, que puede ser promovido por la ingestión de sustancias tales como fructooligosacáridos (Scherezenmeir, 2001).

Una parte fundamental de la funcionalidad de las bacterias probióticas, consiste en estimular su sobrevivencia y permanencia prolongada en el tracto gastrointestinal; por esa razón, conjuntamente con el interés existente por los probióticos, también se ha desarrollado el interés por los prebióticos (Mariano García-Garibay, 2000). Silveira (2003) da el concepto de Simbióticos: como aquellos alimentos que contienen un ingrediente probiótico y un prebiótico, aportando el efecto de ambos. Harish, (2006), establece la interacción entre probiótico, prebiótico y flora intestinal (figura no.1):

Figura 1. La interacción entre probiótico, prebiótico y flora intestinal



Los prebióticos, oligosacáridos indigeribles fermentables por la flora colónica con características probióticas, han generado un interés científico y comercial creciente en los últimos años. Tanto su obtención de fuentes naturales como su producción a través de tecnología enzimática no han sido exploradas aún con suficiente profundidad. Explorar fuentes de leguminosas o los agaves puede tener impacto importante a corto plazo en la comercialización de estos carbohidratos; y por otro lado, la exploración de nuevas enzimas con mejores capacidades transglicosídicas, y el desarrollo de la ingeniería del medio enzimático, pueden resultar en tecnologías más eficientes para la síntesis de oligosacáridos. Al mismo tiempo, es indispensable intensificar los estudios del efecto de los prebióticos en la flora colónica y los resultados que esto genera en beneficio de la salud del huésped.

Uso de los probióticos en la medicina. Salud y enfermedad

Álvarez-Olmos, (2001) comenta entre los muchos factores implicados en el aumento de determinadas enfermedades, que el estilo de vida es sin duda uno de los que más impacto produce por cambios en los hábitos alimenticios. Si la ingesta no es adecuada, la nutrición será incompleta y la flora intestinal se verá alterada. Otros factores que intervienen, disminuyendo nuestra resistencia a las enfermedades y predisponiéndonos a procesos morbosos, son el uso de antibióticos y la terapia inmunosupresora utilizados como tratamiento, por la alteración de nuestra microbiota intestinal.

La estabilidad de la flora microbiana intestinal normal es imprescindible para que se lleven a cabo todas las funciones metabólicas del individuo. La demostración de que la microbiota intestinal es un importante componente de barrera en la mucosa ha introducido el concepto de “terapia probiótica” con la administración de microorganismos potencialmente beneficioso. Durante estos últimos años, el interés por los efectos terapéuticos benéficos de los probióticos ha crecido enormemente. Se ha descrito que ciertos microorganismos específicos, administrados regularmente, son capaces de mantener el equilibrio de la flora intestinal. No obstante, otros autores han observado que algunos microorganismos empleados como probiótico pueden estar relacionados con varias enfermedades infecciosas, especialmente en el caso de pacientes con el sistema inmunitario seriamente debilitado. Es necesario un mayor conocimiento de los efectos de los probióticos en las poblaciones de alto riesgo, sobre todo en personas inmunodeficientes, de edad avanzada, embarazadas, etc., para recomendar su uso seguro. Igualmente, debe investigarse más a fondo el papel que pueden tener los probióticos sobre la resistencia a los antibióticos, especialmente cuando se administran de manera conjunta. Y por supuesto, es necesario profundizar en el conocimiento de los mecanismos que intervienen en el efecto de los probióticos sobre la salud.

El Huésped y su microflora autóctona, forman conjuntamente un sistema ecológico complejo cuyo modelo de desarrollo y balance/desbalance bajo varias influencias son bastante difícil de entender. Los bebés neonatos sirven como un modelo natural útil para revelar el impacto ecológico sobre el

desarrollo y estabilidad de la microflora humana. Los recién nacidos rápidamente son expuestos a múltiples microorganismos, tan pronto como nace con un sistema de defensa poco desarrollado. Los humanos son hospederos individualmente de microflora ácido láctica específica en varios sistemas de órganos, especialmente en el tracto gastrointestinal y genital. Esta lactoflora consiste de varias combinaciones de especies típicas para cada individuo y su cantidad es relativamente estable durante largos periodos.

El uso de preparaciones de bacterias ácido lácticas para tratamiento de varias infecciones de adultos primero requiere un sustento teórico (Salminen, 1998b).

Los nutrientes están presentes en cantidad limitada en el intestino; si las bacterias beneficiosas consumen estos nutrientes necesarios para desarrollo de agentes patógenos, limitan así su proliferación. También pueden llegar a producir una disminución en la concentración de lactosa en la leche fermentada por la actividad de la lactasa bacteriana durante la fermentación (Famuralo, 1999).

Los microorganismos probióticos compiten con los patógenos no sólo por los nutrientes sino también por el espacio físico. Algunas bacterias pueden inhibir la adherencia de los agentes patógenos a los sitios receptores por un mecanismo de obstrucción entérica o de bloqueo específico del receptor, con lo que se produce una prevención de la colonización de microorganismos patógenos por inhibición competitiva en los lugares de adhesión. Estos, mecanismos han sido estudiados en un modelo que recurre al cultivo de células intestinales humanas (Chauviere, 1992).

Trapp (1993), suponía que el consumo de grandes cantidades de alimentos ricos en bacterias lácticas eliminaba las bacterias formadoras de toxinas, mientras que elevaba la proporción de bacterias lácticas y la flora intestinal mejoraba la salud, incrementando expectativas de vida. Desde entonces, y a lo largo de casi cien años de estudio, diversos autores se han esforzado en conocer las distintas funciones de los microorganismos beneficiosos para la

salud que pueblan el tracto digestivo, y más concretamente de los productos lácteos fermentados.

Diversas pruebas realizadas con animales y estudios in vitro han demostrado que las cepas probiótica ejercen una acción protectora contra la adherencia, la colonización, la reproducción y la acción patógena de agentes enteropatógenos específicos mediante distintos mecanismos de acción que aún no han sido completamente esclarecidos (Brook, 1999 y Fons 2000).

Ha sido mucho el interés reciente en el uso de varias cepas de bacterias ácido lácticas como probióticos, ejemplo: alimentos con preparaciones viables o suplementos dietéticos para la salud de animales y humanos. Las bacterias ácido lácticas fueron originalmente definidas como ciertas especies de *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus* y *Pediococcus*. Hammes and Tichaczec, (1994). Sin embargo recientemente estudios de taxonomía, generaron nuevos géneros, las bacterias ácido lácticas ahora incluyen *Aerococcus*, *Alloiococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus* y *Vagococcus*. Estos géneros consisten de bacilos y cocos gram positivos que fermentan carbohidratos, produciendo ácido láctico como el mayor producto final (cepas homofermentativas) o como un componente importante en la mezcla de productos finales (cepas heterofermentativas). Algunos autores consideran las especies de *Bifidobacterium spp.* como miembro de bacterias ácido lácticas, aunque ellos son distintos filogenéticamente de otros miembros del grupo. En esta revisión *Bifidobacterium spp* puede ser incluida como bacteria ácido láctica porque tienen similitudes ecológicas y funcionales (Salminen, 1998a).

Las bacterias ácido lácticas parecen tener algún efecto benéfico documentado sobre disturbios gastrointestinales incluyendo algunas formas de diarreas y síntomas relacionados con disbiosis intestinal. En muchas de estas enfermedades el rasgo común está relacionado con la alteración de las funciones de la barrera mucosa del intestino. Los probióticos ofrecen nuevas alternativas dietéticas para el manejo de esas condiciones, a través de la

estabilización de la microflora intestinal, promoviendo la resistencia a la colonización. Las propiedades inmunomodulatorias de los probióticos indican que ellos pueden también tener un rol en el manejo de la dieta de alimentos alérgicos. Sin embargo, mucho trabajo está aún por hacerse antes de que las bacterias probióticas ganen una gran aceptación para el manejo de esas enfermedades gastrointestinales. Es necesario más cuidado en la planeación y control de estudios clínicos para confirmar y extender los datos experimentales.

Otros usos clínicos de los probióticos podrían ser investigados, tales como el control de la enfermedad de ulcera péptica. Estudios deben de emprenderse para elucidar mecanismos por los cuales las bacterias probióticas ejercen sus efectos, porque el conocimiento en esta área es escaso. Finalmente, es bueno que nuevas cepas de bacterias probióticas puedan ser investigadas para su introducción dentro del campo clínico y alimentos dietéticos especiales. Es importante definir cuidadosamente esas cepas de bacterias antes de su uso en estudios humanos y animales. Una era excitante y nueva está iniciando con la posibilidad de bacterias ácido lácticas como parte del manejo de un rango de desordenes intestinales, incluyendo alimentos alérgicos.

Entre los alimentos funcionales se encuentran los probióticos, microorganismos vivos añadidos a un alimento que ejercen un efecto beneficioso sobre la salud humana. Los efectos más destacables se pueden resumir en: a) la mejora de la respuesta inmunitaria; b) el mantenimiento de la microbiota del colon, reduciendo la cantidad de diversas enzimas procarcinógenas en las heces; c) el tratamiento de la diarrea del viajero y la secundaria a la terapia antibiótica; d) el control de los rotavirus y de la colitis inducida por *Clostridium difficile*; y e) la prevención de las úlceras relacionadas con *Helicobacter pylori*. Otros aspectos más controvertidos incluyen la reducción de la absorción del colesterol, la prevención de las caries, y la prevención y el tratamiento de las infecciones del tracto urinario.

En los últimos años ha sido interesante cambiar en la prevención de enfermedades y promover la salud usando bacterias probióticas para combatir con bacterias nocivas en el tracto intestinal (Salminen, 1998c, Saavedra, 1995). Nuevas y más específicas cepas de bacterias probióticas son encontradas. Hay

un riesgo potencial asociado con la introducción de microorganismos probióticos nuevos en alimentos de consumo humano. Antes de incorporar en productos nuevas cepas debe tenerse cuidado para asegurar y probar la seguridad y eficacia del uso propuesto (Huis In't Veld y cols., 1994).

Las siguientes sugerencias y recomendaciones han sido propuestas para crear un modelo apropiado y unos métodos de pruebas de seguridad para las bacterias probióticas (Donohue and Salminen, 1996a; Adams and Marteau, 1995; Jonas y cols., 1996):

1. Determinar las propiedades intrínsecas de bacterias y cepas seleccionadas para uso probiótico, ejemplo: factores de adhesión, degradación de mucosa intestinal, resistencia a antibióticos, transferencia de resistencia a anticuerpos, transferencia potencial de plásmidos, perfil enzimático.
2. Evaluar el efecto de los productos metabólicos de las bacterias.
3. Evaluar la toxicidad aguda o subaguda de la ingestión extrema de gran cantidad de bacterias.
4. Estimar las propiedades in vitro de bacterias probióticas usando líneas de células y degradación de mucosa intestinal. Evaluar ineffectividad en modelos de animales, ejemplo animales inmunocomprometidos o animales irradiados letalmente.
5. Determinar la eficacia de ingestión de bacterias probióticas con medida de dosis-respuesta (estudios de farmacocinética, dosis mínimas y máximas requeridas, efectos consecuentes con la salud); evaluar los efectos de dosis de probióticas masivas sobre la composición de la microflora intestinal humana.
6. Evaluar cuidadosamente sus efectos en estudios con humanos voluntarios y estudios clínicos en varios estados específicos- enfermedad.
7. Conducir vigilancia epidemiológica de personas que ingestan grandes cantidades de nuevos probióticos introducidos para infecciones y vigilancia en el uso de cepas tradicionales.
8. Empezar pruebas de seguridad más rigurosas entre cepas de líneas genéticamente modificadas y cepas derivadas de animales.

Los Probióticos y la Nutrición

La fuente de la juventud ha sido un sueño durante mucho tiempo, tan antiguo como los registros humanos de sus pensamientos sobre piedra o papel (David B. Hughes y Dallas G. Hoover 1991).

Los alimentos funcionales como un término de marketing fue iniciado en Japón en los 80's y este uso describe alimentos fortificados con ingredientes capaces de producir beneficios a la salud. Este concepto ha incrementado su popularidad con consumidores porque la conciencia ha aumentado de la relación salud, nutrición y dieta. Los fabricantes de alimentos son entusiastas acerca del desarrollo de tales productos porque la adición de ingredientes da un incremento en el valor del alimento. El mercado global para alimentos funcionales en los siguientes años está pronosticado un crecimiento rápido. Aunque Japón actualmente cuenta con cerca de la mitad de este mercado, el rango de crecimiento rápido puede ser esperado en Estados Unidos. Los productos probióticos representan un área de crecimiento fuerte dentro del grupo de alimentos funcionales y son un esfuerzo en investigación para desarrollar productos lácteos con organismos probióticos tales como, especies de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*. Tales alimentos probióticos pueden modular la composición de la microbiología intestinal, en consecuencia llegan a promover la salud intestinal, por ejemplo, provee completa tolerancia a la lactosa en individuos intolerantes a la lactosa o provee resistencia a bacterias patógenas. Gran número de microorganismos viables pueden ser requeridos en los productos alimenticios, los cuales podrían ser consumidos regularmente para experimentar efectos en la salud. El mercado de probióticos, especialmente en productos lácteos tales como yogurt y leches fermentadas, han experimentado un rápido crecimiento en Europa. La explotación del gran término probióticos como promotor de la salud es dependiente de varios factores, incluyendo evidencia clínica científica, de la actividad promotora de salud; información exacta al consumidor; estrategias efectivas de mercado; y sobre todo, un producto de calidad, que cumpla todas las expectativas del consumidor (Catherine Stanton y cols., 2001).

El consumo de probióticos es una práctica habitual mantenida a lo largo del tiempo por diferentes grupos poblacionales, que ha aumentado considerablemente. Las pruebas científicas para su uso en determinados cuadros clínicos, especialmente aquellos relacionados con enfermedad gastrointestinal, son lo suficientemente importantes para considerarlos en el tratamiento de estos cuadros; no obstante, son necesarios futuros ensayos clínicos que corroboren los resultados positivos obtenidos y que confirmen o desmientan la utilidad de los probióticos en otras enfermedades en que también se han probado. Los resultados de estos trabajos aprobarían el uso de los probióticos en otros campos y les otorgarían un lugar dentro de la quimioterapia como alternativa al tratamiento convencional de las infecciones (López-Brea y Domingo, 2007).

El término “alimentos funcionales” comprende cepas de algunas bacterias y productos de origen animal o plantas conteniendo componentes fisiológicamente activos que benefician la salud humana y reducen el riesgo de enfermedades crónicas. Entre los componentes funcionales mejor conocidos los probióticos, prebióticos y antioxidantes naturales podrían ser como ejemplo. Estas sustancias pueden ser obtenidas por métodos biotecnológicos y por extracción de tejidos animales o vegetales (Grajek, y cols., 2005).

La ingestión de probióticos puede ser recomendada como un probado preventivo para el mantenimiento del balance de la microflora intestinal y en consecuencia “sentirse bien”. Investigaciones del uso de probióticos interviniendo específicamente en enfermedad y desordenes han identificado ciertas poblaciones de pacientes que pueden beneficiarse de este enfoque. Indudablemente, los probióticos pueden variar su eficacia y puede no tener en todos los casos los mismos resultados con todas las especies. Las de más eficiencia parecen ser cepas que son bastante robustas para sobrevivir las condiciones físico-químicas presentes en el tracto intestinal. Estas incluyen ácido gástrico, secreciones biliares y competencia con la microflora residente.

En teoría, incrementando el nivel de probióticos puede inducir una barrera que influya contra patógenos comunes. Los mecanismos para afectar incluyen

excreción de ácido (lactato, acetato), competencia por nutrientes y sitios receptores en el intestino, inmunomodulación y la formación de agentes antimicrobianos específicos. Tales personas como las susceptibles a infecciones diarreicas pueden beneficiarse enormemente por la toma de probióticos. O en situaciones crónicas, ha sido sugerido que algunos probióticos pueden ayudar a mantener disminuidas las condiciones inflamatorias, colitis ulcerativa y pouchitis. Ellos también han sido sugeridos para reprimir enzimas responsables de formación de genotoxinas. Más aún, estudios sugieren que probióticos son efectivos como drogas antispasmodicas en el alivio del síndrome de intestino irritable. El enfoque de modulación de la flora intestinal para proveer salud tiene mucha relevancia para el manejo de esos desordenes agudos y crónicos. Otro grupo objetivo podría incluir esas infecciones nosocomiales. Como bien es conocido en los ancianos que tienen alterada la microflora, con una disminución del número de especies microbianas benéficas. Para el futuro, es imperativo que los mecanismos de interacción involucren suplementos bien identificados con probióticos. Además, la sobrevivencia asociada con su establecimiento en el ecosistema competitivo intestinal podría ser direccionada. Aquí el uso de prebióticos en asociación con probióticos útiles puede ser el enfoque global.

Los Probióticos son ampliamente usados para preparar productos lácteos fermentados, tales como yogurt o cultivos desecados-congelados. En el futuro, ellos pueden también ser encontrados en vegetales y carnes fermentadas. Algunas evidencias sugieren un rol de los probióticos en la reducción del riesgo de diarrea inducida por rotavirus y cáncer de colon. El trabajo con prebióticos ha sido limitado y solamente un estudio involucrando un fructano tipo-inulina ha generado datos suficientes para una evaluación completa considerando su posible uso como un ingrediente de alimentos funcionales. La combinación de probióticos y prebióticos en una simbiosis no han sido estudiados. La combinación puede proveer la sobrevivencia de las bacterias al cruzar la parte alta del tracto intestinal, en consecuencia engrandecer sus efectos en el intestino grueso. Adicionalmente su efecto podría ser aditivo o aún sinérgico (Marcel B. Roberfroid 2000).

Los probióticos y la Biotecnología

El uso de microorganismos con base científicas es reciente e inicia en el siglo XX, no obstante, haberse utilizado en la antigüedad al elaborar vino y pan. Actualmente se consumen los probióticos, sin tener las bases científicas que sustenten el beneficio externado.

Los productos lácteos fermentados, los cuales incluyen queso, crema agria, mantequilla y yogurt, juegan un papel si no dominante, importante en cualquier discusión de alimentos fermentados. Los productos fermentados son de las más importantes contribuciones naturales a la civilización, históricamente, estos alimentos son viables en periodos de sobrevivencia, hambre, nutricionalmente, ellos proveen elementos vitales para la buena salud, por lo cual son deseables en la dieta del hombre; y geográficamente, ellos dan una producción real en cualquier País desarrollado. Los quesos y alimentos relacionados son hechos rápidamente de materia cruda. Los procesos básicos son fácilmente asimilables y el producto obtenido tiene gran vida y son usualmente seguros. En el mundo se consumen 9 billones de libras de queso (Kosikowski, 1997).

Spanhaak, y cols., 1998 documentan una relación de productos tradicionales y modernos con probióticos (ver tabla 3).

Tabla 3. Productos tradicionales y otros más modernos con cepas probióticas

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

Spanhaak, S., Havenaar, R. Schaafsma, G. (1998)

Respecto de los alimentos funcionales Farjas, (2003) y Silveira, (2003), refieren que Metchnikoff observó que el yogurt poseía unas propiedades benéficas para el organismo. Esto tuvo una repercusión no solo científico–médica sino también comercial. Aún así, como se ha comentado anteriormente, el yogurt y otras leches fermentadas no se han introducido con fuerza en el mercado de la alimentación hasta hace unos 15 años. A lo largo de los años, los hábitos de consumo y las preocupaciones de la sociedad han cambiado, priorizando la seguridad alimentaria. Hoy en día el consumidor se preocupa por lo que come, por lo que contienen los alimentos y por los beneficios que puedan conllevar para su salud.

Un número de beneficios a la salud se han encontrado en bacterias probióticas tales como *Lactobacillus acidophilus*, *bifidobacterium spp.*, y *Lactobacillus casei*. Por el potencial de beneficios a la salud, de estos microorganismos, se ha incrementado su adición en productos lácteos. No obstante, estudios de los probióticos demuestran que tienen una baja viabilidad en productos comerciales. Para mantener la viabilidad de bacterias probióticas, es importante contar con un método de trabajo, para el recuento selectivo de esas bacterias probióticas. La viabilidad de estas es importante para proveer los beneficios a la salud. Y puede ser provista por la selección de cepas resistentes al ácido, la bilis, el uso de contenedores impermeables al oxígeno, fermentación de dos etapas, micro-encapsulación, adaptación al estrés, incorporación de micronutrientes tales como péptidos y aminoácidos y por zonificación de bacterias de yogurt. Esta investigación cubre recuento selectivo y sobrevivencia de bacterias probióticas en productos lácteos (Shah, 2000).

Para resumir, la inclusión afortunada de un cultivo probiótico en un producto lácteo tal como, el yogurt, se requiere que: 1) Tenga características necesarias para producir el efecto deseable al consumidor, 2) Crecer bien en leche, al menos añadir en suficiente cantidad en el producto final, 3) Ser estable, mantener viabilidad en el producto lácteo hasta que se consuma (Gilliland, 2000).

El Futuro de los probióticos

Implicaciones futuras. Hay un considerable potencial de beneficios del consume de probióticos sobre un amplio rango de condiciones clínicas. Se debe de continuar identificando y caracterizando cepas probióticas, determinar su dosis optima para garantizar resultados. Barry Goldin, Ph.D., profesor de Tufts University School of Medicine, *“El potencial total de los probióticos puede solamente ser realizada cuando sus beneficios puedan ser establecidos científicamente. Es altamente deseable que los beneficios actuales y futuros de los probióticos sean no conocidos y por lo tanto no se ha llegado a la utilización total”* (Dairy Council of California, 2000).

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la calidad microbiológica, fisicoquímica y organoléptica de los microorganismos probióticos en productos lácteos fermentados comerciales en la ciudad de Ocotlán, Jalisco.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Valorar la calidad microbiológica de productos lácteos fermentados comerciales en la ciudad de Ocotlán, Jalisco.
2. Determinar los parámetros fisicoquímicos de productos lácteos fermentados comerciales en la ciudad de Ocotlán, Jalisco.
3. Cuantificar los microorganismos probióticos en productos lácteos fermentados comerciales en la ciudad de Ocotlán, Jalisco.

METODOLOGÍA

El universo de estudio fue la ciudad de Ocotlán, Jalisco, los expendios de venta del producto fueron los supermercados. El muestreo fue estratificado y al azar, en la mañana al inicio de semana, transportándose en una hielera portátil, realizando el análisis dentro del transcurso de las dos horas siguientes. Las muestras analizadas corresponden a cuatro marcas comerciales de leches fermentadas, Yakult, Activia, Lalacult y Chamyto, siendo todas de sabor natural, o el único existente. El muestreo se realizó durante el 2009-10 con 60 muestras. Los parámetros evaluados fueron:

- **Características fisicoquímicas:** temperatura, ph, acidez.
- **Características microbiológicas:** coliformes totales (NOM-112-SSA1-1994), *Staphylococcus aureus* (NOM-115-SSA1-1994), y *Salmonella* (NOM-114-SSA1-1994).
- **Características organolépticas:** color, olor, sabor y textura.
- **Cuenta microscópica de bacterias acido-lácticas:** en medio MRS y APT.

Todos los análisis se efectuaron de acuerdo a las técnicas y procedimientos autorizados y reglamentados por la Secretaria de Salud.

MATERIALES Y METODOS

Técnicas fisicoquímicas (Richardson, 1985)

Método para determinación de temperatura.

En el punto de muestreo se verificó la temperatura del termómetro del refrigerador donde estaba la muestra recolectada.

1. Crear un área estéril, agitar la muestra y flamear el cuello
2. Introducir un termómetro al interior del recipiente.
3. Tomar la lectura.
4. Reportar en °C.

Método para determinación de Acidez.

Por titulación con una solución 0.1 N de álcali multiplicado por 0.009 dará el número de gramos de ácido láctico.

El resultado es dividido por el número total de gramos de muestra y multiplicado por 100 se obtiene el % de ácido láctico.

$$\% \text{ de acidez titulable} = \frac{\text{ml. de 0.1 N NaOH} \times 0.009}{\text{gramos de muestra}} \times 100$$

Técnica:

Medir 20 ml de muestra. Añadir 2 ml de fenolftaleína y titular con hidróxido de sodio 0.1 N hasta la aparición de un color rosado persistente cuando menos un minuto.

Método para determinación de pH.

La escala de pH es una serie de números que expresan el grado de acidez (o alcalinidad) de una solución, en comparación con la cantidad total de ácido o base de algún material.

Técnica:

Se utilizó un potenciómetro calibrado inicialmente con solución buffer a pH 7 y conforme el valor se aproximaba a 4 se calibraba nuevamente a pH 4.

Para la toma de la lectura de la muestra se tomó una alícuota de 50 ml (gr) previamente homogeneizada, introduciéndose los electrodos correspondientes a pH y Temperatura dando el valor automáticamente.

Técnicas Microbiológicas

Método para la Preparación y Dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico. Norma Oficial Mexicana NOM-110-SSA1-1994.

- a) Para muestras líquidas no viscosas (agua, leche, refrescos, etc.) en las cuales la distribución de microorganismos es homogénea o fácilmente homogeneizable por medios mecánicos (agitación. etc.).

- b) Agitar la muestra manualmente con 25 movimientos de arriba a abajo en un arco de 30 cm. efectuados en un tiempo de 7 segundos. Tomar 1 ml de la muestra y diluir con 9 ml del diluyente el cual debe encontrarse a una temperatura similar a ésta, evitando el contacto entre la pipeta y el diluyente, posteriormente tomar 1.0 ml de la primera dilución y agregarla a 9 ml de diluyente.

Método para la cuenta de microorganismos coliformes totales en placa.
NOM-113-SSA1-1994.

El método permite determinar el número de microorganismos coliformes, utilizando agar rojo violeta bilis en el que se desarrollan bacterias a 35°C en aproximadamente 24 hrs. dando como resultado la producción de gas y ácidos orgánicos, los cuales viran el indicador de pH y precipitan las sales biliares.

Procedimiento

1. Preparación de la muestra.
2. Método de "preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico. NOM-110-SSA1-1994.
3. Colocar en cajas Petri 1 ml de la muestra o de dilución deseada.
4. Verter de 15 a 20 ml del Agar bilis rojo violeta ABRV fundido y mantenido a $45 \pm 1.0^\circ\text{C}$ en BM, no debe exceder de 20 minutos.
5. Mezclar mediante 6 movimientos de derecha a izquierda, 6 en el sentido de las manecillas del reloj, 6 en sentido contrario y 6 de atrás a adelante, sobre una superficie lisa y horizontal hasta lograr una completa incorporación del inóculo en el medio; cuidar que el medio no moje la cubierta de las cajas. Dejar solidificar. Preparar una caja control con 15 ml de medio para verificar esterilidad.
6. Después de que está solidificado, verter aprox. 4 ml del medio ABRV.
7. Incluir una caja sin inóculo por cada lote de medio y diluyente preparado como testigo de esterilidad
8. Invertir las placas incubación a 35°C durante 24 ± 2 horas.
9. Recuento. Seleccionar las placas entre 15 y 150 colonias.

Las colonias típicas son de color rojo oscuro, generalmente se encuentran rodeadas de un halo de precipitación debido a las sales biliares, el cual es de color rojo claro o rosa, la morfología colonial es semejante a lentes biconvexos con un diámetro de 0.5 a 2.0 mm.

Método para la determinación de *Salmonella* en alimentos. NOM-114-SSA1-1994

1. Procedimiento general para la preparación de muestras. Pesar asépticamente 25 g de la muestra. Adicionar 225 ml de solución verde brillante al 0.1%.
2. Incubar 24 hr \pm 2 hr a 35°C.
3. Aislamiento de *Salmonella*. Transferir respectivamente 1 ml de la mezcla a 10 ml de caldo tetrionato (CT) y a 10 ml de caldo selenito cistina (CSC).
4. Incubar de 18 a 24 hr a 35°C.
5. Mezclar el tubo con CT y CSC y estriar en agar xilosa lisina desoxicolato (XLD), agar verde brillante (VB) y agar sulfito de bismuto.
6. Incubar las placas 24 hr \pm 2 hr a 35°C. Colonias típicas de *Salmonella*:
Agar XLD: colonias rosas o rojas que pueden ser transparentes con o sin centro negro. En algunos casos las colonias pueden aparecer completamente negras.
Agar VB: colonias rojas o rosas que pueden ser transparentes rodeadas por medio enrojecido; las bacterias fermentadoras de la lactosa dan colonias amarillas.
Agar Sulfito de Bismuto: las colonias típicas de *Salmonella* pueden ser cafés, grises o negras; con o sin brillo metálico. Generalmente el medio circundante (halo) es café, tornándose posteriormente negro. Algunas cepas producen colonias verdes sin la formación del halo oscuro. Si las placas no muestran colonias típicas o no se observa crecimiento, incubar 24 hr adicionales.
7. Identificación bioquímica. Seleccionar al menos dos colonias típicas de cada medio selectivo y sembrar por estría en la superficie inclinada y por punción en el fondo, dos tubos, uno con agar triple azúcar hierro (TSI) y otro con agar hierro lisina (LIA).
8. Incubar por 18 a 24 hr a 35°C
Agar TSI: en fondo del tubo vire del indicador; en la superficie del medio se observa un color rojo más intenso. En la mayoría de los casos coloración negra a lo largo de la punción produce H₂S.

Agar LIA, se observa intensificación del color púrpura en todo el tubo. La mayoría de las Salmonellas producen ácido sulfhídrico.

Método para la determinación de *Staphylococcus aureus* en alimentos.
NOM-115-SSA1-1994

- 1.-Preparación de la muestra. NOM-110-SSA1-1994.
- 2.-Depositar 0.1 ml sobre la superficie de las placas de agar Baird-Parker. Distribuir el inóculo sobre la superficie del agar con varillas estériles de vidrio en ángulo recto.
- 3.- Invertir las placas e incubar de 45 a 48 hr. a 35°C.
- 4.-Seleccionar las placas que tengan las colonias típicas son negras, circulares, brillantes, convexas, lisas, de diámetro de 1 a 2 mm y muestran una zona opaca y un halo claro alrededor de la colonia.

Un número de colonias sospechosas en placa número de colonias por probar

Menos de 50	3
51 a 100	5
101 a 150 o más	7

- 5.-Sembrar cada una en tubos con 0.5 ml de caldo de infusión cerebro-corazón.
- 6.-Incubar a 35°C durante 24 hr.
- 7.-Pasar con una pipeta de 1 ml, 0.3 ml de cada cultivo a otro tubo y conservarlo para prueba de termonucleasa. El resto para la prueba de coagulasa.
- 8.-Prueba de coagulasa. Agregar a los 0.2 ml del cultivo anterior, 0.2 ml de plasma de conejo diluido volumen a volumen con solución salina estéril.
- 9.-Incubar en BM 35 a 37°C y observar durante 6 h a intervalos de 1 hr; si no hay formación de coágulo, observar a las 24 hrs Positiva si hay coágulo.
Para comprobar la coagulabilidad del plasma de conejo se añade una gota de cloruro de calcio al 5% a 0.5 ml de plasma reconstituido empleado, formándose un coágulo en 10-15 seg.

10.-Prueba de termonucleasa. Calentar durante 15 min., 0.3 ml de cultivo en caldo de infusión cerebro-corazón en baño de agua hirviendo. Pasar una gota de c/cultivo con pipeta Pasteur a un orificio del medio.

11.-Incubar a 35°C en cámara húmeda de 4 a 24 hr. La aparición de un halo color rosa extendido de por lo menos 1 mm se califica como positiva.

Cuenta microscópica de bacterias acido-lácticas

1. Preparación de la muestra. NOM-110-SSA1-1994.

Con una ligera modificación, la primera dilución se hace 10 ml de muestra en 90 ml de diluyente de peptona y las otras cinco diluciones de 1 ml de muestra en 9 ml de diluyente.

2. Depositar 0.1 ml sobre la superficie de las placas de agar MRS. Distribuir el inóculo sobre la superficie del agar con varillas estériles de vidrio en ángulo recto.

3. Invertir las placas e incubar de 45 a 48 hr. a 35°C.

4. Depositar 0.1 ml sobre la superficie de las placas de agar APT. Distribuir el inóculo sobre la superficie del agar con varillas estériles de vidrio en ángulo recto.

5. Invertir las placas e incubar de 45 a 48 hr. a 35°C.

6. Recuento. Seleccionar las placas entre 15 y 150 colonias.

Las colonias típicas son de color beige, generalmente se encuentran rodeadas de un halo mucoso, la morfología colonial es semejante a lentes ligeramente biconvexas con un diámetro de 0.5 a 2.0 mm, dependiendo de la dilución.

Técnicas para análisis organolépticos

Las muestras deben ser representativas del material, lote o proceso de estudio. Durante la preparación de la muestra no se deberán introducir sabores, olores, cambios en la apariencia o colores ajenos al producto. Se debe mantener uniformidad en la presentación de las muestras que se ofrecen al juez. Esto incluye cantidad servida, forma o apariencia de la porción entregada,

temperatura, recipientes y utensilios para la toma de muestras. Es importante considerar el orden de presentación de las muestras, ya que los individuos responden de una forma diferente sólo por la posición que guarda una muestra con respecto a otra. Los utensilios (platos, cucharas, recipientes, etc.) deberán uniformarse. Es importante tener presente que el enjuague bucal es el proceso por medio del cual el juez elimina materiales residuales luego de una degustación. Para esta eliminación generalmente se emplea agua destilada, la cual se expectora, no se traga. El material de enjuague depende del tipo de muestra que se analiza; por ejemplo para aceite y grasas se emplea agua caliente; para carnes y especias, pan y agua. Pueden elegirse varios materiales de enjuague. Lo que se recomienda es que sean los más sencillos y que a su vez no introduzcan otras variables al estudio o influyan en futuras evaluaciones. Por eso el agua destilada es lo más efectivo y conveniente. Los instrumentos principales para efectuar la evaluación sensorial son los órganos sensores y la capacidad integradora de los jueces. Se llama juez al individuo que está dispuesto a participar en una prueba para evaluar un producto valiéndose de la capacidad perceptiva de uno o varios de sus sentidos. Se distinguen dos tipos de jueces:

- Analítico u objetivo, para evaluar diferencias, intensidades y calidades de muestras.
- Afectivo o consumidor, para evaluar aceptación, preferencia o nivel de agrado.

Prueba de perfil del sabor

(“Flavor Profile Taste”) (Pedrero y Pangborn, 1997)

La prueba se genera de tal manera que se genera el mayor contenido de información posible acerca del producto. Esta prueba de análisis del sabor incluye varias dimensiones:

- Aroma perceptible, gusto, sabor y atributos táctiles (también llamados “notas de carácter”)

- Grado de intensidad de cada factor, calificado según la siguiente escala:
X= Suave
XX= Ligeramente ácido
XXX= Ácido
XXXX= Muy ácido
- Orden de aparición de estos factores
- Resabio
- Amplitud o impresión global del sabor.

El desarrollo de esta técnica requiere, en primer lugar, sesiones de orientación en las cuales el coordinador del grupo desglose los objetivos del proyecto y presente muestras del producto. Se establecen los lineamientos del análisis (manejo de muestra, requerimientos de referencias), así como el vocabulario de términos descriptivos. Se efectúan varias sesiones con el producto problema, hasta llegar a un consenso grupal, definiendo el perfil del sabor de dicho producto. Se realizan sesiones individuales para calificar al producto con base en la terminología o el perfil acordado. Dependiendo del producto en estudio, se proveerán muestras referencia para identificar a éstas en la muestras problema. La presentación de las muestras se hará de tal manera que se puedan apreciar todos sus atributos (bajo luz blanca, a la temperatura propicia y en un recipiente adecuado, etc.). Se seleccionan entre 6 y 10 individuos que deben entrenarse exclusivamente en la técnica, tienen que mostrar interés en participar, así como una habilidad para identificar sabores básicos, reconocer e identificar olores y discriminar intensidades de sabores.

Textura:

Es el análisis sensorial de la complejidad de la textura en un alimento en términos de sus características mecánicas, geométricas y de la intensidad de su presencia, así como el orden en el cual éstos se presentan desde la primera mordida y a través de la masticación hasta consumir el producto. La prueba de perfil de textura, basada en la prueba de perfil de sabor, comprende los siguientes parámetros:

- **Características mecánicas:** relativo a la reacción del alimento ante el esfuerzo. Se subdivide en los siguientes parámetros:
 - Primarios: dureza, cohesión, viscosidad, reconstrucción y adhesividad.
 - Secundarios: quebradizo, correoso, gomoso

- **Características geométricas:** Relativo a la percepción de la forma del alimento. Se subdivide en dos parámetros:
 - Aquellas relacionadas con el tamaño y la forma de las partículas, como arenoso y granuloso.
 - Aquellas relacionadas con la forma y la orientación, tal como fibroso y hojueloso.

- **Otras características:** Relativo a la sensación que provoca la presencia de la humedad y de lípidos.

La prueba de perfil de textura requiere que primero se defina la terminología y se estructuren las escalas que han de utilizarse, y más tarde se evalúe, de acuerdo con dicha terminología y escalas, al producto problema.

Muestreos y manejo de muestras.

El universo de estudio comprende la ciudad de Ocotlán, Jalisco, los expendios de venta del producto al público son supermercados. El muestreo fue estratificado y al azar, en la mañana al inicio de semana, de diferente lote, transportándose en una hielera portátil, realizando el análisis dentro del transcurso de las dos horas siguientes.

Materiales

- a. Cajas Petri
- b. Porta cajas de acero inoxidable
- c. Pipetas de 1, 5, 10 y 25 ml.
- d. Porta pipetas de acero inoxidable
- e. Frascos de cristal de 250, 500 y 1000 ml.
- f. Tubos de cristal de 16X150, 15X100
- g. Termómetro
- h. Matraces de 100, 500 y 1000 ml.
- i. Asa de nicromo
- j. Mecheros Bunsen y Fisher
- k. Manguera de plástico
- l. Medios de cultivo
- m. Kit de tinción de Gram

Equipos

- a. Autoclave
- b. Horno eléctrico
- c. Incubadora
- d. Refrigerador
- e. Potenciómetro
- f. Bureta automática
- g. Microscopio óptico
- h. Estereoscopio
- i. Baño maría

RESULTADOS

Después de 8 meses de trabajo, recolectando 60 muestras diferentes de leches fermentadas de marcas: Yacult, Activia, Chamyto y Lalacult, todas de diferente lote y elegidas al azar, obtuvimos resultados variantes referentes a la cuenta de bacterias ácido lácticas (BAL) tanto en el medio Man, Rogosa y Sharpe (MRS), como en medio All Purpose Tween Agar (APT), (ver tabla 4), la tabla, arroja la temperatura promedio obtenida en °C, los g/l de acidez y el pH, obtenidos entre noviembre del 2009 y julio del 2010. Haciendo una comparación de los resultados obtenidos con la NOM-185-SSA1-2000 y el CODEX STAN 243-2003.

Tabla 4. Parámetros fisicoquímicos y microbianos evaluados de los productos lácteos fermentados expendidos en la ciudad de Ocotlán, Jalisco

Marca	Parámetro	T en °C	Acidez g/l	pH	BAL(APT)	BAL(MRS)
1	Promedio	7.88	7.56	4.17	1.63E+07	1.63E+07
	D.E.	4.22	0.86	0.10	7.23E+06	9.78E+06
	Máximo	10	8.5	4.1	2.44E+07	1.90E+07
	Mínimo	2	6	4.29	5.60E+05	2.60E+06
2	Promedio	9.50	9.65	3.75	1.94E+06	3.83E+06
	D.E.	2.02	0.19	0.12	2.83E+06	4.65E+06
	Máximo	14	10	4.02	3.00E+06	1.19E+07
	Mínimo	7	9.4	3.69	2.99E+04	9.00E+04
3	Promedio	6.31	6.70	3.95	1.34E+07	5.44E+06
	D.E.	2.63	1.00	0.24	1.17E+07	3.88E+06
	Máximo	9	9.13	4.4	3.60E+07	1.00E+07
	Mínimo	-2	6	3.7	3.60E+06	1.62E+06
4	Promedio	9.94	6.38	4.07	5.25E+07	5.94E+07
	D.E.	4.68	0.68	0.73	7.96E+07	8.00E+07
	Máximo	11	6.4	5.7	2.41E+08	2.10E+08
	Mínimo	4	5.8	3.6	4.20E+06	1.00E+07
NOM-185-SSA1-2000		max7°C	>0.5%	max4.4	NE	NE
CODEX STAN 243-2003			>0.6%		>10 ⁷ ufc/g	

NE*: no especificado

D.E.: Desviación estándar

En la siguiente tabla (ver tabla 5) podemos observar los resultados de las pruebas microbiológicas que se realizaron a cada lote de productos de acuerdo con las especificaciones de la NOM-185-SSA1-2002, que dice que los productos lácteos fermentados y acidificados no deben exceder las 10 UFC/g de coliformes totales, <100 UFC/g de *Staphylococcus aureus* y ser ausente en 25 g para *Salmonella*.

Tabla 5. Parámetros sanitarios evaluados de los productos lácteos fermentados expendidos en la ciudad de Ocotlán, Jalisco.

Marca	Parámetro	Coliformes	<i>S. aureus</i>	<i>Salmonella</i>
1	Promedio	0 ufc/g*	0 ufc/g*	Ausente/25g
	D.E.	0 ufc/g	0 ufc/g	Ausente/25g
	Máximo	0 ufc/g	0 ufc/g	Ausente/25g
	Mínimo	0 ufc/g	0 ufc/g	Ausente/25g
2	Promedio	0 ufc/g	0 ufc/g	Ausente/25g
	D.E.	0 ufc/g	0 ufc/g	Ausente/25g
	Máximo	0 ufc/g	0 ufc/g	Ausente/25g
	Mínimo	0 ufc/g	0 ufc/g	Ausente/25g
3	Promedio	0 ufc/g	0 ufc/g	Ausente/25g
	D.E.	0 ufc/g	0 ufc/g	Ausente/25g
	Máximo	0 ufc/g	0 ufc/g	Ausente/25g
	Mínimo	0 ufc/g	0 ufc/g	Ausente/25g
4	Promedio	0 ufc/g	0 ufc/g	Ausente/25g
	D.E.	0 ufc/g	0 ufc/g	Ausente/25g
	Máximo	0 ufc/g	0 ufc/g	Ausente/25g
	Mínimo	0 ufc/g	0 ufc/g	Ausente/25g
NOM-185-SSA1-2002		10 ufc/g	<100 ufc/g	Ausente/25g

*0 ufc/g: 0 unidades formadoras de colonias /g (directa)

D.E.: Desviación estándar

Y para finalizar observamos (ver tabla 6), los resultados de las pruebas organolépticas que se les realizó a cada lote de productos específicos, analizando textura, color, olor y sabor basándonos en los parámetros establecidos en el “Flavor Profile Taste”.

Tabla 6. Parámetros organolépticos evaluados de los productos lácteos fermentados expendidos en la ciudad de Ocotlán, Jalisco.

Marca	Parámetro	Color	Olor	Sabor	Textura
1	Promedio	Blanquecino	x	x	1
	D.E.	Blanquecino	x	x	1
	Máximo	Blanquecino	xx	xx	1
	Mínimo	Blanquecino	x	x	1
2	Promedio	Blanquecino	x	x	1
	D. E.	Blanquecino	x	x	1
	Máximo	Blanquecino	xx	xx	1
	Mínimo	Blanquecino	x	x	1
3	Promedio	Blanquecino	x	x	1
	D. E.	blanquecino	x	x	1
	Máximo	Blanquecino	xx	xx	1
	Mínimo	Blanquecino	x	x	1
4	Promedio	Blanquecino	x	x	1
	D.E.	Blanquecino	x	x	1
	Máximo	Blanquecino	xx	xx	1
	Mínimo	blanquecino	x	x	1
NOM-185-SSA1-2002		NE	NE	NE	NE

NE*: no especificado; Olor /sabor: X- suave; XX- ligeramente ácido; XXX- ácido; XXXX- muy ácido.

Textura: 1- aceptable; 2- ligeramente grumoso; 3- grumosa; 4- muy grumosa

D.E.: Desviación estándar

DISCUSIÓN

Se muestra un análisis comparativo de los resultados de los recuentos de las BAL, con respecto a la norma del CODEX STAN243-2003, (ver tabla 4) que pide un mínimo de 10^7 ufc/g, donde encontramos que las marcas antes mencionadas no cubren con los límites de la norma, a excepción de la marca 4 en medio MRS, donde el máximo excede el rango con 10^8 ufc/g.

Los valores detectados a lo largo del estudio fueron de un rango de 2.99×10^4 a 2.41×10^8 ufc/g, obteniendo mayor número de microorganismos en el medio MRS, respecto del APT.

Se eligieron dichos medios de cultivo basándonos en estudios de Fernández-Escartín, (2009), quien manifiesta los medios de cultivo y condiciones para el cultivo y recuento de algunas bacterias lácticas como: *S. lactis*, *L. bulgaricus*, *L. helveticus*, *L. acidophilus* y respecto de las técnicas de aislamiento y recuento Shah, (2000), concluye, que los medios de cultivo para probióticos usados son: Agar MRS (pH 5.2) p/*L. delbrueckii subsp. bulgaricus*, 45°C/72h., entre otros.

La NOM-185-SSA1-2002, no establece una cantidad mínima de microorganismos en los productos fermentados.

También podemos observar que la temperatura de las marcas 1,2 y 4 rebasan los límites permitidos por la NOM-185-SSA1-2002 que especifica una temperatura no mayor a los 7°C para productos lácteos fermentados, resultando un valor no adecuado para mantener su calidad en la vida comercial. Aunque hay que tener en cuenta que la temperatura al momento de comprar los productos fue de -0.8°C en promedio, pero la temperatura que fue registrada en la tabla 1 fue de el momento antes de su análisis o en el transcurso de este.

En cuanto a la acidez tenemos datos de entre 0.58 y 1.0% de ácido láctico mostrando conformidad en la norma mexicana, sin embargo, la marca 4 no cumple con la del CODEX ALIMENTARIUS.

Respecto al pH todas las marcas tienen valores por debajo de 4.4 a excepción de la marca 4 que excede el límite permitido de la norma oficial mexicana.

En tanto a la Norma Oficial Mexicana (NOM-185-SSA1-2002), de las cuentas de organismos coliformes, *Staphylococcus aureus* y *Salmonella*, los recuentos microbianos obtenidos contra los límites de la Norma Oficial Mexicana (NOM-185-SSA1-2000), fueron negativos o insignificantes, por lo tanto dentro de la norma, Y para finalizar, en la tabla 3 de las características organolépticas registradas muestran un color blanquecino a excepción de una que su color es rosáceo pero no se especifica dado que se trata de mantener anonimidad para evitar conflictos o preferencias con las marcas antes mencionadas; el olor y sabor de suave a ligeramente ácido en las cuatro marcas y la textura aceptable en todos los casos, aún que la norma mexicana no lo requiera nos basamos en el test de sabor antes mencionado.

CONCLUSIONES

Las Técnicas de recuento e identificación de microorganismos constituyen un sistema de parámetros requeridos para garantizar que un producto o cepa sea llamado probiótico. No hay norma mexicana que especifique la cantidad de microorganismos requerida por ml de producto lácteo fermentado.

Aun así, todas las marcas contienen bacterias lácticas que fermentan el producto.

Todas las muestras estudiadas presentaron recuentos microbianos de coliformes totales y de *Staphylococcus aureus* negativos, tampoco se observaron colonias aparentes de *Salmonella spp.*

En cuanto al perfil organoléptico define los productos de un olor y sabor suave, con una textura aceptable.

En México se debería de legislar y normar técnicas para evaluar alimentos con probióticos desde cinco ópticas:

- 1.- Tipo de microorganismo
- 2.- Tipo de alimento
- 3.- Valor nutricional
- 4.- Perfil biotecnológico y
- 5.- Aporte a la salud con dos variantes benéficos y toxicidad

Se debe de continuar identificando y caracterizando cepas probióticas, determinar su dosis optima para garantizar resultados.

Al principio, estos estándares pueden parecer excesivamente rigurosos, pero implementándolos se podrán tener acceso al enorme mercado médico para ventas probióticas, con ello expandir sus utilidad y ventas.

Hay un considerable potencial de beneficios del consumo de probióticos sobre un amplio rango de condiciones clínicas, lo que hace que el mercado potencial de los probióticos sea enorme.

REFERENCIAS

- Adams, M.R., Marteau, P. 1995. On the safety of lactic acid bacteria from food. *Int. J. Food Microbiol*; 27: 263-264.
- Álvarez-Olmos, M.I. Oberhelman, R.A. 2001. Probiotic agents and infectious diseases: A modern perspective on a traditional therapy. *Clin Infect Dis*; 32:1567-1576.
- Amores, R., Calvo, A., Maestre J.R. y Martínez-Hernández, D. 2004. Probióticos. *Rev Esp Quimioterap*; 17(2):131-139.
- Benno, Y., Sawada, K. and Mitsuoka, T. 1984. The intestinal microflora of infants: composition of fecal flora in breast-fed and bottle-fed infants. *Microbiol. Inmunol*; 28:975-986
- Brook, I. 1999. Bacterial interferente. *Crit Rev Microbiol*; 25:155-172.
- Chauviere, G., Coconnier, M.H., Kerneis, S., Darfeuille-Michaud, A., Joly, B., Servin, A.I. 1992. Competitive exclusion of diarrheagenic *Escherichia coli* (ETEC) from human enterocyte-like Caco-2 cells by heat killed *Lactobacillus*. *FEMS Microbiol Lett*; 70:213-217.
- Condon y Salcedo R, Mariné Font A, Rafecas Martínez M. 1988. Yogur: elaboración y valor nutritivo. Fundación Española de la Nutrición. Publicaciones: serie "Divulgación", nº 10. Madrid.
- Crittenden, R.G. y Playne, M.J. 1996. Production, properties and applications of food-grade oligosaccharides. *Trends in Food Science and Technology*; 7:353-361.
- Dairy Council of California. 2000. Probiotics – Friendly Bacteria with a Host of Benefits. Copyright © 2009 Dairy Council of California. All Rights Reserved. <http://www.dairycouncilofca.org/About/Dairy-Industry.aspx>
- Donohue, D.C. and Salminen, S. 1996a. Safety of probiotic bacteria. *Asia Pac. J. Clin. Nutr*; 5:25-28
- Elie Metchnikoff and P. Chalmers Mitchell. 1908. *The Prolongation of Life. Optimistic studies.* New York: G. P. Putnam's Sons, The Knickerbocker Press. Edited by P. Chalmers Mitchell
- Escalante Lozada, A. 2001. El potencial de la manipulación de la flora intestinal por medios dietéticos sobre la salud humana. *Enferm Infecc Microb Clin*; 21:106-114.

- Famuralo, G., De Simone, C., Mateeuzzi, D., Pirovano, F. 1999. Traditional and high potency probiotic for oral bacteriotherapy. *Bio-Drugs*; 12:455-470.
- FAO/OMS. 2001. Consulta de expertos FAO/OMS sobre la evaluación de las propiedades saludables y nutricionales de los probióticos en los alimentos, incluida la leche en polvo con bacterias vivas ácido lácticas. Argentina, 1-4 de Octubre de 2001.
- FAO/WHO. 2002. Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food, <ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/wgreport2.pdf>
- Farjas Abadía P. Sobre los alimentos funcionales. 2003. *Rev Esp Sal Pub*; 77:313-316.
- Farnworth, R.E. Editor. 2008. *Handbook of Fermented Functional Foods. Second Edition.* CRC Press Taylor & Francis Group.
- Fernández-Escartín, E. 2009 (a). Introducción a las enfermedades microbianas transmisibles por los alimentos (ETA's) Pp 99-122. En *Microbiología e Inocuidad de los Alimentos. 2º Edición*, Universidad Autónoma de Alimentos.
- Fernández-Escartín E. 2009 (b). Alimentos fermentados, desecados y congelados Pp. 685-700. En: *Microbiología e Inocuidad de los Alimentos. 2º Edición*, Universidad Autónoma de Alimentos.
- Fons, M., Gómez, A., Karjalainen, T. 2000. Mechanisms of colonization and colonization resistance of the digestive tract. *Microbiol Ecol Health Dis*; (Suppl. 2):240-246.
- Fooks, L.J. and Gibson, G.R. 2002. Probiotics as modulators of the gut flora. *British J. Nutr*; 88 (suppl 1) S39-S49.
- Finegold SM, Sutter VL, Mathisen GE. 1983. Normal indigenous intestinal flora, Chap. I In: Hentges DJ, ed. *Human Intestinal Microflora in Health and Disease.* New York: Academic Press, p. 3-31.
- Fuller, R. 1989. Probiotics in man and animals. *J. Appl Bacteriol*; 66: 365-378
- García-Garibay, M. 2000. Prebióticos. Memorias en. 2º Simposio Mexicano de Probióticos. 8y9 junio, Guadalajara, Jal., Méx.
- Gibson, F., Robertfroid, M. 1995. Dietary modulation of the human colonic microbiota: Introducing the concept of prebiotics. *J. Nutr*; 125:1401-1412.
- Gilliland, S.E. 2000. Fermented milks and probiotics. Memorias. 2º Simposio Mexicano de Probióticos. 8y9 junio, Guadalajara, Jal., Méx.

- Gorbach, S. L., A. G. Plaut, L. Nahas, L. Weinstein, G. Spanknebel, and R. Levitan. 1967. Studies of intestinal microflora. II. Microorganisms of the small intestine and their relations to oral and fecal flora. *Gastroenterology*; 53:856-867.
- Grajek, W., Olejnik, A. and Sip, A. 2005. Probiotics, prebiotics and antioxidants as functional food. *Avta Biochimica Polonica*. 52 (3): 665-671. Presented at the International Review Conference on Biotechnology, Vienna, Austria, Nov 2004.
- Guarner, F. and Schaafsma, G.I. 1998. Probiotics. *Int J. Food Microbiol.* 39: 2337-238
- Harish, K. and Varghese T. 2006. Probiotics in humans- evidence based review. *Cal Med J*; 4(4):3.
- Havenaar, R. y J.H.J. Huis In't Veld. 1992. Probiotics: A general view. Pp 151 – 170. In: *The Lactic Bacteria Vol. I, The Lactic Bacteria in Health and Disease*. B.J.B. Wood (ed.) Elsevier Applied Science, London.
- Heller, K.J. 2001. Probiotics bacteria in fermented foods: product characteristics and starter organisms. *Am j Clin Nutr*; 73(suppl)374S-379S.
- Huis in't Veld, J.H.J., Havannar, R., and Marteau, P. 1994. Establishing the basis for probiotic R&D. *Trends Biotechn.* 12:6-8
- Hughes, D.B. and Hoover, D.G. 1991. BIFIDOBACTERIA. Their potential for use in American dairy products. *Food Techn*; Abril.74-81.
- Jonas, D.A., Antignac, E., Antoine, J.M., Classen, H.G., Huggett, A., Knudsen, L., Mahler, J., Ockuizen, T., Smith, M., Teuber, M., Walker, R. and De Vogel, D. 1996. The safety assessment of novel foods. Guidelines prepared by ILSI Europe novel foods task force. *Food Chem. Toxicol.* 34:931-940
- Katellaris PH. 1966. Probiotic control of diarrhoeal disease. *Asia Pacific J Clin*; 5:39-43.
- Kosikowski, Frank V., Mistry Vikram V. 1997, *Cheese and Fermentd Milk Foods*. 3th ed. United States of America Edwards Brothers.
- Lee, Y.K and Wong, S. F. 1998. Stability of lactic acid bacteria in fermented milk Pp103-114. En: *Lactic Acid Bacteria*. Edited by Seppo Salminen and Atte von Wright. Marcel Dekker, Inc.
- Lee, Y.K, Gorbach, S.L., Nomoto, N., and Salminen, S, 1999. *Handbook of Probiotics*. John Wiley & Sons Ltd, New York,

- Lilly, D.N., Stillwell, R.H. 1965. Probiotics: Growth promoting factors produced by microorganisms. *Science*; 147:747-748.
- López-Brea, M y Domingo, D.2007. Antibioticoterapia con probióticos. *Rev Esp Quimioterap*; 20 (Nº 2): 170-181.
- Mitsuoka, T. 1996. Intestinal flora and human health. *Asia Pacif, J. Clin. Nutr.* 5:2-9
- Norma del CODEX para Leches Fermentadas. CODEXSTAN 243-2003.
- Normas Oficiales mexicanas en materia de salud NOM. 2009. Secretaria de Salud. www.salud.gob.mx
- Ohigashi, H. 1996. An approach to functional food: cancer preventive potential of vegetables and fruits and their active constituents. *Nutr. Rev*; 54(11).
- Parker, R.B. 1974. Probiotics: The other half of the antibiotic story. *AN Nut Health*; 29:4-8.
- Pedrero F. D. y Pangborn, R.M. 1997. Evaluación Sensorial de los Alimentos Métodos Analíticos. 2ª. ed. Ed. Alhambra Mexicana
- Richardson, G. H. 1985. Standard methods for examination of dairy products. 15a. edición. American public association
- Roberfroid, M.B. 2000. Prebiotics and probiotics: are they functional. *Am J Clin Nutr.* 71(suppl):1682S-1687S.
- Rodríguez Jerez J.J. 2003. La esencia del yogur pasteurizado. www.consumaseguridad.com Fundación Grupo Erosky.
- Salminen, S. 2000. Clinical applications of probiotics and intestinal microflora modification. *Memorias. 2º Simposio Mexicano de Probióticos. 8y9 junio, Guadalajara, Jal., Méx.*
- Salminen, S., Bouley, C., Boutron-Ruault, M.C. 1998. Functional food science and gastrointestinal physiology and function. *Br J Nutr*; 80 (Suppl.):147S-171
- Salminen, S. And Wright, A.V. editores. 1998 (a). Lactic Acid Bacteria in Health and Disease pag 211- 253 en *Lactic Acid Bacteria: Microbiology and Functional Aspects. 2a. Ed. Marcel Dekker, Inc.*
- Salminen, S. And Wright, A.V. editores. 1998 (b). Lactic Acid Bacteria in the Human Microbial Ecosystem and Its Development pag 279- 342 en *Lactic Acid Bacteria: Microbiology and Functional Aspects. 2a. Ed. Marcel Dekker, Inc.*

- Salminen, S. And Wright, A.V. ed. 1998 (c). Safety of Probiotic Bacteria pag 369 – 384 en Lactic Acid Bacteria: Microbiology and Functional Aspects. 2a. Ed. Marcel Dekker, Inc.
- Sanz Y, Collado M.C, Dalmau J. 2003. Probióticos: criterios de calidad y orientaciones para el consumo. Acta Ped Esp; 61(9): 476-482.
- Saavedra, J.M. 1995. Microbes to fight microbes: a not so novel approach to controlling disease. J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr; 21:125-129.
- Scherezzenmeir, J., De Vrese, M. 2001. Probiotics, prebiotics and approaching a definition. Am J Clin Nutr; 73(suppl.2):361S-364S.
- Shah, N. P. 2000. SYMPOSIUM: PROBIOTIC BACTERIA. Probiotic Bacteria: Selective Enumeration and Survival in Dairy Foods. J Dairy Sci; 83:894–907.
- Silveira Rodríguez M.B, Monereo Megías S, Molina Baena B. 2003. Alimentos funcionales y nutrición óptima, ¿Cerca o lejos? Rev Esp Sal Púb; 77: 317-331.
- Spanhaak, S., Havenaar, R. Schaafsma, G. 1998. The effect of consumption of milk fermented by *Lactobacillus casei* strain Shirota on the intestine microbiota and immune parameters in humans- Eur J Clin Nutr; 52:899-907.
- Stanton, C., Gardiner, G., Meehan, H., Collins, K., Fitzgerald, G., Brendan Lynch, P. and Ross, P. 2001. Market potencial for probiotics. Am j Clin Nutr. 73(suppl) 476S-483S.
- Syers, M. E. 1993. Effect of consumption of lactic cultures on human health. Pp. 67 – 130. In: Advances in Food Nutrition Research. J. E. Kinsella (ed.). Academic Press, San Diego.
- Torres Vitela, M.R. 2000(a). Microbiología de las bacterias con características probióticas. Memorias. 2º Simposio Mexicano de Probióticos. 8 y 9 junio, Guadalajara, Jal., Méx.
- Torres-Vitela, M.R., Garay-Martínez, L.E., Peregrina-Gómez, E., Macías-Rodríguez, E. y Trías-Flores, M.L. 2000(b). Recuento de bacterias lácticas en materia fecal en humanos asociado al consumo de leche fermentada con lactobacilos probióticos. Memorias. 2º Simposio Mexicano de Probióticos. 8 y 9 de junio, Guadalajara, Jalisco, México
- Torres Vitela, M.R. 2002. Flora intestinal, probióticos y salud. Editorial Grafica Nueva. 2ª. Edición © D.R. Distribuidora Yakult Guadalajara.

- Trapp, C.L., Chang, C.C., Halpen, G.M, Keen, C.L., Gerschim, M.E. 1993. The influence of chronic yogurt consumption on populations of young and elderly adults. *Int. Immunotherapy*; IX:53-64.
- Van de Water, J. and Naiyanetr, P. 2008. Yogurt and Immunity. The health benefits of fermented milk products that contain lactic acid bacteria Pp139-164. En: *Handbook of fermented functional foods*. 2^a Edited by Ed. Edward R. Farnworth. CRC press
- Voragen, A.G.J. 1998. Technological aspects of functional food-related carbohydrates. *Trends in Food Sc and Techn* 9, 328 -335.
- Walstra P, Geurts T.J, Normen A, Jellema A, Van Boekel M.A.J.S. 2001. *Ciencia de la leche y tecnología de los productos lácteos*. Editorial Acribia S.A. España.
- Helferich, W. & Westhof, D. 1980. *All about yogurt*. Prentice Hall, Inc., Englewood Cliffs, New Jersey
- Wilson, M. 2005. *Microbial Inhabitants of Humans. Their ecology and role in health and disease*. Cambridge Univ. Press