



FACULTAD DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA

ESCUELA DE INGENIERÍA EN ALIMENTOS

Determinación de la interacción de cepas probióticas mediante diseño experimental para optimizar vida de estante y funcionalidad

Trabajo de graduación previo a la obtención del título de Ingeniera en Alimentos

Autora:

Maryori Adriana Fernández Patiño

Director:

Ing. Claudio Esteban Sánchez Jáuregui

Cuenca, Ecuador

2014

DEDICATORIA

Dedico esta tesis a mi padre y madre quienes me han dado la vida, me han brindado su apoyo incondicional, su paciencia y siempre me guían con sabios consejos y a mis hermanos, vinculo natal por siempre confiar en mí.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco profundamente al Creador por hacer posible este momento. De una manera muy especial, a mi tía Sonia y mis abuelitos María y Humberto que siempre me ha guiado por el sendero espiritual y han soportado mis aciertos y desaciertos estos años.

Por el tiempo, conocimientos compartidos y paciente seguimiento durante el desarrollo de este trabajo mis sinceros agradecimientos al Ingeniero Claudio Sánchez mi director de tesis, a la Ingeniera María Fernanda Rosales y a la Ingeniera Jhoana Tacuri.

De igual forma un eterno agradecimiento a esta prestigiosa universidad la cual abrió sus puertas de enseñanza para desarrollar mi potencial en beneficio de todos.

A los miembros del tribunal Dr. Piercosimo Tripaldi y Dra. Cecilia Palacios por su tiempo y paciencia.

Gracias por el entusiasmo, apoyo y comprensión a mis amigos más cercanos y a los que no han estado tan cerca, quienes de una u otra forma han aportado con un granito de arena a la culminación de mi trabajo, especialmente y de forma cariñosa a Diana y Diego.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
ÍNDICE DE CONTENIDOS	iv
ÍNDICE DE FIGURAS.....	vii
ÍNDICE DE TABLAS	viii
RESUMEN	ix
ABSTRACT.....	x
INTRODUCCIÓN	1

CAPÍTULO I: FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA

1.1 Probióticos: definición	4
1.1.2 Clasificación	4
1.1.3 Flora intestinal normal humana.....	5
1.1.4 Distribución en flora intestinal humana	6
1.1.4.1 Estómago.....	6
1.1.4.2 Intestino delgado	6
1.1.4.3 Intestino grueso	7
1.1.5 Importancia de la flora probiótica digestiva.....	7
1.1.6 Características de evaluación de microorganismos probióticos.....	8
1.1.7 El género <i>Bifidobacterium</i>	8
1.1.7.1 Morfología	9
1.1.7.2 Fisiología.....	10
1.1.7.3 Vitaminas producidas por <i>Bifidobacterium</i>	10
1.1.7.4 Factores que influyen la colonización.....	10
1.1.7.5 Acción probiótica de <i>Bifidum</i> en el intestino	11
1.1.8 El género <i>Lactobacillus</i> y su acción probiótica	12
1.1.8.1 Morfología	13
1.1.8.2 Fisiología.....	14
1.1.8.3 Resultado de la fermentación de <i>Lactobacillus</i>	14

1.1.9 Efectos beneficiosos de los probióticos	15
1.1.10 Bacterias patógenas.....	15
1.1.10.1 Salmonella spp	15
1.1.10.2 Staphylococcus aureus	16
1.1.10.3 E. coli	16
1.2 Probióticos usos y efectos	16
1.2.1 Aspecto nutricional de los probióticos	16
1.2.2 Relación probióticos y prebióticos.....	17
1.2.3 Inulina (prebiótico)	18
1.2.4 Efectos atribuidos al consumo de alimentos con probióticos	18
1.2.5 Fisiología de las LAB en el intestino	20
1.2.5.1 Función	20
1.2.6 Estudios realizados con probióticos.....	22
1.2.7 Beneficios planteados como hipótesis	23
1.2.8 Incorporación de los probióticos a los alimentos	24
1.2.9 Alimentos que contienen probióticos.....	25
1.2.10 Aplicaciones industriales	26
1.2.11 Aplicaciones en la industria cárnica.....	26
1.2.12 Aplicaciones en la industria de conservas vegetales y cereales	27

CAPÍTULO II: MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 MATERIALES	28
2.1.1 Materiales de laboratorio	28
2.1.2 Equipos de laboratorio	28
2.1.3 Insumos para laboratorio.....	29
2.2 MÉTODOS	30
2.2.1 Obtención de cultivos iniciadores	30
2.2.1.1 Aislamiento y propagación del cultivo	30
2.2.2 Inoculación de leche (obtención del starter)	32
2.2.3 Cuantificación o recuento en placa	33
2.2.4 Desarrollo del diseño experimental de mezclas	33
2.2.5 Aceptabilidad, análisis organolépticos.....	36
2.2.6 Pruebas <i>in vitro</i> funcionalidad de un producto	38

2.2.6.1 Tolerancia al ácido	39
2.2.6.2 Tolerancia a la bilis	39
2.2.6.3 Capacidad de inhibición de patógenos.....	40
2.2.7 Acidez durante vida de estante.....	40
2.2.8 Identificación de bacterias beneficiosas en el microscopio	40

CAPÍTULO III: RESULTADOS

3.1 Obtención de cultivos iniciadores	41
3.1.1 Aislamiento y propagación del cultivo	41
3.1.2 Inoculación de leche (obtención del starter)	42
3.1.3 Cuantificación o recuento en placa	43
3.2 Diseño experimental de mezclas.....	44
3.5 Aceptabilidad, pruebas sensoriales	44
3.5 Pruebas <i>in vitro</i> funcionalidad de un producto	46
3.5.1 Tolerancia al ácido.....	46
3.5.2 Tolerancia a la bilis	49
3.5.3 Capacidad de inhibición de patógenos.....	50
3.5.4 Acidez durante vida de estante.....	52
3.6 Identificación de bacterias beneficiosas en el microscopio	53
DISCUSIÓN	55
CONCLUSIONES.....	57
RECOMENDACIONES.....	58
BIBLIOGRAFÍA.....	59

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Aislamiento y propagación de los cultivos	30
Figura 2: Caldo estándar número 10 de Mc Farland	32
Figura 3: Diseño simplex con diez puntos aumentados para tres componentes	33
Figura 4: Ficha de catación	36
Figura 5: Comparación estándares (a) Cultivo estándar. (b) estándar de Mc Farland	42
Figura 6: Cultivos base. (a) Starter de Lb. acidophilus. (b) Starter de Lb. rhamnosus. (c) Starter de B. breve	43
Figura 7: Cataciones. (a) Evaluación del catador. (b) Muestras de catación	46
Figura 8: Representación gráfica de la tolerancia al ácido clorhídrico 6M.....	48
Figura 9: Representación gráfica de la tolerancia a la bilis.....	50
Figura 10: Representación gráfica de halos de inhibición contra patógenos	51
Figura 11: Acidez Vs Tiempo experimento 10	52
Figura 12: Acidez Vs Tiempo experimento 5	52
Figura 13: células de Lb. acidophilus vistas al microscopio.....	53
Figura 14: Células de Bifidobacterium vistas en el microscopio.....	53
Figura 15: Células de Lb. rhamnosus vistas en el microscopio	54

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Distribución de las especies de Bifidobacterium en el colón humano según la edad ...	11
Tabla 2: Agares sometidos a pruebas de aislamiento.....	31
Tabla 3: Variables del diseño experimental.....	34
Tabla 4: Número y proporciones de experimentos	34
Tabla 5: Cantidades de starter según límite inferior y superior	35
Tabla 6: Cantidad de microorganismos específicos en leche fermentada sin tratamiento térmico posterior a la fermentación.....	38
Tabla 7: Agares de desarrollo aptos para cada bacteria	41
Tabla 8: Recuento en placa de cada starter	43
Tabla 9: Rendimiento (recuento en placa) de cada experimento	44
Tabla 10: Experimentos mejor aceptados por los panelistas	45
Tabla 11: Recuento en placa de los cultivos base	47
Tabla 12: Tolerancia a diferentes concentraciones de ácido clorhídrico	48
Tabla 13: Tolerancia a la bilis 2 porcentajes	49
Tabla 14: Halos de inhibición de capacidad contra patógenos	50

“Determinación de la interacción de cepas probióticas mediante diseño experimental para optimizar vida de estante y funcionalidad”

RESUMEN

Con la finalidad de mejorar la funcionalidad probiótica de un alimento, se identificaron según el método de tinción de Gram tres bacterias beneficiosas: *Lb. acidophilus*, *Lb. rhamnosus* y *Bifidobacterium breve*, dichas bacterias se combinaron aplicando diseño experimental, para encontrar una interacción favorable, que superen los análisis de probioticidad *in vitro* y sensoriales, de esta forma se verificaron si efectivamente se realizaba una mejora; los experimentos con los mejores resultados fueron sometidos a pruebas de resistencia al HCl, bilis y capacidad de inhibición contra patógenos, junto con los experimentos puros, con lo que se pudo comprobar que la capacidad probiótica de las mezclas en comparación con las puras se ven mejoradas en dos interacciones, la una binaria (*bifidum* 1/ 2 y *Lb. rhamnosus* 1/ 2) y la otra ternaria (*Bifidum* 2/3 *Lb. acidophilus* 1/ 6 y *Lb. rhamnosus*) destacándose que la mezcla binaria supera a la ternaria.

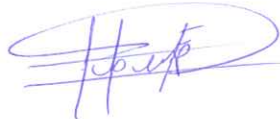
Palabras clave: *Lb. acidophilus*, *Lb. rhamnosus*, *Bifidobacterium breve*, patógenos, inhibición, binaria, ternaria.



Ing. Fausto Tobias Parra Parra
DIRECTOR DE LA ESCUELA



Ing. Claudio Esteban Sánchez Jáuregui
DIRECTOR DEL TRABAJO
DE GRADO



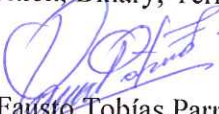
Maryori Adriana Fernández Patiño
AUTOR


ABSTRACT

"Determining probiotic strains interaction by experimental design to optimize shelf- life and functionality"

In order to improve the probiotic functionality of food three beneficial bacteria were identified by the Gram stain method: Lb. Acidophilus, Lb. Rhamnosus, and Bifidobacterium Breve. These bacteria were combined using experimental design in order to find a favorable interaction that exceeds probiotic and sensory in-vitro analysis, verifying whether an improvement actually happened. The experiments with the best results were tested for resistance to HCl, bile and inhibition ability against pathogens together with pure experiments. It was possible to verify that the probiotic capacity of the mixtures compared to the pure ones is enhanced in two interactions: a binary ($\frac{1}{2}$ Bifidum and $\frac{1}{2}$ Lb. Rhamnosus) and a ternary one ($\frac{2}{3}$ Bifidum, $\frac{1}{6}$ Lb. Acidophilus and Lb. Rhamnosus) emphasizing that the binary mixture exceeds the ternary.


Keywords: Lb. Acidophilus, Lb. Rhamnosus, Bifidobacterium Breve, Pathogen Inhibition, Binary, Ternary


Ing. Fausto Tobías Parra Parra
SCHOOL DIRECTOR


Ing. Claudio Esteban Sánchez Jáuregui
THESIS DIRECTOR

Maryori Adriana Fernández Patiño
AUTHOR




Translated by,
Lic. Lourdes Crespo

Fernández Patiño Maryori Adriana

Trabajo de Grado

Sánchez Jáuregui Claudio Esteban

Julio del 2014

DETERMINACIÓN DE LA INTERACCIÓN DE CEPAS PROBIÓTICAS MEDIANTE DISEÑO EXPERIMENTAL PARA OPTIMIZAR VIDA DE ESTANTE Y FUNCIONALIDAD

INTRODUCCIÓN

En la actualidad el aumento de determinadas enfermedades, sobre todo de las causadas por microorganismos, es atribuido al estilo de vida, junto a este y entre otros, la falta de actividad física, el consumo de alimentos ricos en hidratos de carbono refinados y grasas, y el escaso aporte de fibra en la dieta son la base de muchas enfermedades actuales, por lo tanto la dieta en este caso juega un papel muy importante; en este sentido las industrias ven la oportunidad de desarrollar nuevas y sofisticadas formas de aprovechamiento de alimentos que contienen microorganismos activos, que por medio de los prebióticos se transformaran en viables, es decir que puede generar descendencia significativa.

Los probióticos son microorganismos vivos que, al ser agregados como suplemento en la dieta, intervienen en forma beneficiosa al desarrollo de la flora microbiana en el intestino y estimulan las funciones protectoras del sistema digestivo, por su importancia actual es necesario indagar en el campo de la alimentación funcional, sobre todo porque esta clase de alimentos de alto perfil han tenido un enorme éxito en Europa, Asia, y, más recientemente, en otras regiones del mundo, por lo cual en nuestro país sigue siendo un caso inexplorado, desarrollando nuevas técnicas y formas de aprovechamiento para el beneficio de nuestra población, por lo cual el objetivo de este estudio es encontrar una interacción óptima de bacterias probióticas a través de un diseño experimental,

evaluaciones organolépticas y su consecuente evaluación con pruebas *in vitro*; dichos probióticos son actualmente comercializados principalmente en los ya mencionados “alimentos funcionales” y se encuentran representados fundamentalmente por los derivados lácteos.

En nuestro caso, la mezcla de bacterias beneficiosas conlleva un amplio estudio, sobre todo de dos aspectos que finalmente resultan indispensables, por un lado del sinergismo que debe establecerse entre estos cultivos que permitirá obtener un producto fermentado con excelentes propiedades sensoriales y por el otro lado, los factores extrínsecos que afectan o condicionan la viabilidad de las cepas funcionales; recordando una vez más que uno de los requisitos principales de este tipo de alimentos es que los microorganismos probióticos permanezcan viables y activos durante el pasaje gastrointestinal para garantizar así su potencial efecto benéfico en el huésped.

Dentro de los factores extrínsecos más importantes que afectan la viabilidad y supervivencia de las células los cuales serán analizados se encuentran: las condiciones de acidez derivadas del proceso de fermentación, los procesos antagónicos entre especies, medido en este caso específicamente con pruebas *in vitro*, las prácticas de inoculación (es importante conocer el momento adecuado para el agregado del cultivo probiótico), la temperatura y duración de la fermentación, las condiciones de almacenamiento del producto, entre las principales.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Identificar cepas beneficiosas para el ser humano, y mediante diseño experimental definir la mejor combinación para una funcionalidad probiótica en leches fermentadas durante la vida de estante.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. Identificar y seleccionar individualmente las cepas probióticas, basándose en la taxonomía de cada una de ellas, y que se muestren viables al cabo del proceso de incubación y consumo del sustrato.
2. Realizar una interacción de las cepas identificadas y hacerlas correr en un proceso libre de restricción de lactosa, para tabular los resultados en función de las variables del proceso tecnológico como la proporción de mezcla de cepas; se consideró a la temperatura y el tiempo constantes.
3. Utilizar la combinación de cepas seleccionadas para elaborar una leche fermenta cumpliendo las normas del CODEX STAN 243-2003 con funcionalidad hasta fin de validez.

CAPÍTULO I

FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA

1.1 Probióticos

El término probiótico significa: a favor de la vida, es un término relativamente nuevo, actualmente este nombre es tomado para designar a las bacterias que tienen efectos beneficiosos para los seres humanos y los animales, se han propuesto varios conceptos para su definición, hace un siglo, Elie Metchnikoff (premio Nobel) postuló que las bacterias ácido lácticas (BAL) ofrecían beneficios a la salud que llevaban a la longevidad; ya en la actualidad algunas organizaciones dedicadas a este fin entre ellas algunas que podemos nombrar están la FAO-OMS que los define: “microorganismos vivos que, cuando se administran en cantidades apropiadas, confieren al huésped un beneficio para la salud”, según la International Life Sciences Institute (ILSI) un probiótico es: “un ingrediente alimentario microbiano vivo que, al ser ingerido en cantidades suficientes, ejerce efectos benéficos sobre la salud de quien lo consume”, estos conceptos aclaran que su consumo debe ser como parte del alimento y por ello son utilizados en la preparación de una amplia gama de productos que además de alimentos incluye medicamentos y suplementos dietéticos.

1.1.2 Clasificación

Las (LAB) bacterias de ácido láctico son los microorganismos comúnmente empleados como probióticos, las cepas utilizadas generalmente pertenecen a especies de los géneros *Lactobacillus*, *Enterococcus* y *Bifidobacterium* (Amores et al, 2004), el género *Bifidobacterium*, a menudo considerado dentro de esta clasificación, filogenéticamente no está relacionado y tiene un modo único de fermentación del azúcar (Hoang, 2004).

Se trata de una clase de bacterias unidas por una gran variedad de características morfológicas, metabólicas y fisiológicas: fermentadoras no patógenas, no toxigénicas, Gram positivas, caracterizadas por producir ácido láctico a partir de carbohidratos; históricamente han sido ampliamente utilizadas para la conservación de alimentos mediante fermentación, pero también pueden ejercer una función doble, actuando como agentes fermentadores de alimentos y generando efectos beneficiosos en la salud (Cabeza, 2006).

Las LAB podrían, en su amplia definición fisiológica comprender alrededor de 20 géneros siendo los de mayor importancia: *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, and *Weissella* (Parra, 2010).

Su eficiencia ha sido científicamente comprobada *In vitro*, en animales de laboratorio y en humanos (Torres, 2003).

Por otra parte, no existen fuertes argumentos científicos para excluir bacterias formadoras de esporas, que se asemejan a las **LAB**, ya que algunos de estos géneros no se separan de los anteriores filogenéticamente, por ende ciertas cepas de *E. coli*, *Sporolactobacillus*, formadoras de esporas, y levaduras son clasificadas también como probióticos (Amores, 2004).

1.1.3 Flora intestinal normal humana

La flora humana normal es el conjunto de gérmenes que conviven con el huésped en estado normal, sin causarle enfermedad; su composición es característica para la especie humana, tanto en los microorganismos que la componen como en su número y distribución en el organismo (Torres, 2013).

En el aparato digestivo existen más de 400 especies bacterianas, el estómago contiene pocas bacterias 10^3 ufc/ml, concentración que va aumentando a lo largo del intestino hasta llegar a una concentración final en el colon de 10^{12} bacterias/g (FAO/OMS, 2006).

La colonización bacteriana del intestino inicia con el nacimiento y continúa durante toda la vida, con cambios notables en función de la edad y mala salud gástrica, representa un importante mecanismo de defensa para el huésped contribuyendo al desarrollo de la

respuesta inmunológica comprobado en individuos con su flora intestinal sana, además ayuda a evitar la colonización en la piel o las mucosas por bacterias contrarias o patógenas produciendo numerosos compuestos antimicrobianos tales como ácidos orgánicos, diacetilo y bacteriocinas entre otros, con los cuales logran defenderse de los microorganismos competidores (Alvarado, 2003).

Un desorden intestinal inicia cuando los gérmenes de la infección colonizan los epitelios, allí compiten con los constituyentes de la flora por factores tales como receptores celulares y nutrientes (Peña, 2003), por otro lado la flora normal intestinal contribuye a la síntesis de vitaminas K y vitaminas del complejo B y colabora con procesos digestivos, de esta forma compite con los microorganismos patógenos por dichos nutrientes y receptores, y elabora bacteriocinas (Plusquam + Pharma, 2013).

1.1.4 Distribución en flora intestinal humana

Su distribución en tracto digestivo se incrementa a medida que avanza en el mismo de la siguiente forma:

1.1.4.1 Estómago

La densidad de bacterias es relativamente baja y se compone de gérmenes de la flora oro faríngeo (boca) que han sido deglutidos gérmenes capaces de resistir el medio ácido (Moreno, 2006).

1.1.4.2 Intestino delgado

En el duodeno se mantiene el pH, el proceso de peristaltismo y la bilis, además de otros factores, contribuyen a mantener el crecimiento de gérmenes relativamente bajo; hacia el íleon el número de bacterias aumenta gradualmente y a nivel del íleon terminal se alcanzan concentraciones de 10^6 a 10^8 bacterias por ml de contenido intestinal, con predominio de los anaerobios (Torres, 2013).

1.1.4.3 Intestino grueso

Las bacterias representan aproximadamente el 40% del peso seco, más de la mitad del peso de la materia que se encuentra en el colon (FAO/OMS, 2001)

El aumento del contenido bacteriano probablemente se explica por:

- ✓ Disminución del peristaltismo
- ✓ Aumento del pH
- ✓ Disminución del contenido de agua

Pasando la válvula ileocecal los gérmenes de la flora alcanzan concentraciones de 10^7 a 10^9 bacterias por ml, llegando al máximo en el recto con 10^{12} bacterias por ml (Torres, 2013), aquí se estima que conviven más de 500 especies diferentes de bacterias, con un predominio de anaerobios (Guarner, 2007):

- Bacilos Gram negativos de los géneros *Bacteroides*, y *Fusobacterium*
- Cocos de las especies de *Peptostreptococcus*, *Sarcina* y *Veillonella*.
- Bacilos Gram positivos están representados por especies de *Bifidobacterium*, *Actinomyces*, *Bacillus*, *Lactobacillus* y *Clostridium*.
- Anaerobios facultativos predominan las enterobacterias, siendo E.coli la más numerosa, seguida de especies de *Klebsiella*, *Proteus*, *Enterobacter* y *Citrobacter*.
- Cocos Gram positivos pueden hallarse especies de *Enterococcus*, *Streptococcus* y *Staphylococcus* (Hutkins, 2006).

1.1.5 Importancia de la flora probiótica digestiva

- La presencia de la flora determina un correcto desarrollo de la mucosa intestinal; interviene en el metabolismo de sustancias como el ácido fólico, biotina, vitaminas B12, K y E.
- Favorece la producción de inmunoglobulina A (IgA).
- Interviene en el ciclo enterohepático de antibióticos.

- Tiene efecto de barrera, al ocupar nichos ecológicos, impidiendo el establecimiento de otras bacterias potencialmente patógenas.
- Segrega bacteriocinas, sustancias que son tóxicas para bacterias de otros géneros (Castro et al, 2006).

1.1.6 Características de evaluación de microorganismos probióticos

Según la consulta realizada por la FAO/OMS, 2001, hay datos e informes que demuestran en diversos grados los efectos beneficiosos de los probióticos en la salud, por lo que se propuso las siguientes directrices:

Los microorganismos probióticos utilizados en los alimentos deberían ser capaces no sólo de sobrevivir al paso por el aparato digestivo, sino también de proliferar en el intestino, lo que significa que deberían ser resistentes a los jugos gástricos y poder crecer en las condiciones existentes en los intestinos y ser consumidos en un alimento que, actuando como vehículo que además les permita sobrevivir al paso por el estómago y a la exposición a la bilis.

De acuerdo a lo expuesto se reconocen con estas características a las bacterias Gram positivas especialmente y se clasifican fundamentalmente en dos géneros, *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* (García et al, 2005).

1.1.7 El género *Bifidobacterium*

A pesar de que tienen un metabolismo fermentativo, estas bacterias no se utilizan en la fabricación de cualquier alimento fermentado y no son comunes, por lo cual de forma estricta se añaden a ciertos alimentos sobre todo la leche; el tracto intestinal es su hábitat primario, su presencia se le relaciona directamente con una menor incidencia de infecciones entéricas, es decir una buena salud intestinal en general. Hoy en día se utilizan con tanta frecuencia como complementos probióticos en los alimentos que se han convertido en una línea de productos de importancia comercial para las empresas de cultivos iniciadores como ingredientes en el yogur y otras formulaciones lácteas (Hutkins, 2006).

Hasta la actualidad se reconocen 24 especies de *Bifidobacterium*, 9 aislados de los seres humanos: *B. bifidum*, *B. longum*, *B. infantis*, *B. breve*, *B. adolescentis*, *B. angulatum*, *B. catenulatum*, *B. pseudocatenulatum* y *B. dentium*, con excepción de este último que produce caries dental; este género es reconocido de uso seguro como complementos dietéticos (*Bif. adolescentis*, *Bif. animalis* / *Bif. lactis*, *Bif. bifidum*, *Bif. breve*, y *Bif. longum* / *infantis*) específicamente tienen estatus GRAS (generalmente considerado como seguro) (Hoang, 2004).

Estas bacterias producen más ácido acético que ácido láctico (relación 3:2) bajas cantidades de ácido fórmico, etanol, ácido succínico y no produce CO₂ como una bacteria heteroláctica; son considerados los microorganismos con la mejor oportunidad de pasar por el estómago, intestino delgado y colonizar el medio por ser endógenos o propios de la especie aislada (animales y los seres humanos) (Cabeza, 2006).

Las constantes investigaciones han mejorado la microflora tradicional de yogur (*Streptococcus salivarius*ssp. *thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus*) por este tercer género con fines nutricional es asociada también con *Lactobacillus acidophilus*, obteniendo un nuevo producto con agradables cualidades organolépticas lo cual ha despertado un considerable interés por los consumidores, industrias lácteas y equipos médicos (Hutkins, 2006).

1.1.7.1 Morfología

Las células de este género se caracterizan por poseer una gran variedad de formas (pleomórficos): cocoide, alargada con protuberancias, bifurcaciones, extremos espatulados, etcétera; sin embargo se explica que varios componentes del medio de cultivo pueden influir en su forma, por ello, la morfología de colonia no es una buena referencia para la identificación del género, su ordenamiento es frecuentemente en cadenas estrelladas, en V o en empalizadas, dichas células no tienen cápsula y no forman esporas, no son móviles ni presentan filamentos. Se explica que todas las especies son Gram positivos a excepción de *G. vaginalis* que presenta un Gram variable y son bacterias anaerobias, algunas toleran el oxígeno pero únicamente en presencia de CO₂ (Collado, 2004).

1.1.7.2 Fisiología

El tipo de respiración de estos microorganismos es anaerobio estricto; sin embargo, se denota que existen especies tolerantes al oxígeno, la temperatura óptima para el desarrollo en la especie humana es de entre 36 y 38°C, no hay un crecimiento por debajo de 20°C y las bacterias de este tipo no tienen termo-resistencia a 46°C se explica y muere a 60°C; el pH inicial de crecimiento óptimo es entre 6.5 y 7, no hay crecimiento por debajo de 5 o por encima de 8 (Collado, 2004).

1.1.7.3 Vitaminas producidas por *Bifidobacterium*

El género *Bifidobacterium* de origen humano sintetiza seis vitaminas: Tiamina (B1), riboflavina (B2), piridoxina (B6), ácido fólico (B9), cianocobalamina (B12), y ácido nicotínico (PP), pero dependiendo de la especie generan además otras vitaminas, por ejemplo: las especies *B. bifidum* y *B. infantis* son buenos productores de tiamina, ácido fólico y ácido nicotínico, mientras que *B. breve* y *B. longum* liberan pequeñas cantidades y *B. adolescentis* no sintetiza ninguna de estas vitaminas. *B. longum* sintetiza excepcionalmente B2, B6 y B12, *B. breve* y *B. infantis* se caracterizan por un alto nivel de producción de ácido nicotínico (PP) y biotina (H) (Hoang, 2004).

1.1.7.4 Factores que influyen la colonización

Se sabe que el tracto intestinal de un ser humano es colonizado en la edad natal, pero, varios estudios debaten la hipótesis de que el tracto digestivo de un recién nacido se coloniza por la vía rectal, o por vía oral ya que en un análisis realizado en un neonato se mostró claramente que la colonización de *Bifidobacterium* en el tracto digestivo se produce vía oral, y el recto permanece estéril hasta que su colonización es completa luego de varios meses (Castro, 2006) teniendo en cuenta que esta bacteria es la principal colonizadora en los seres humanos; numerosos estudios demuestran que el número de *Bifidobacterias* en las heces desciende significativamente en los adultos y en particular en las personas de tercera edad, mientras que los números de patógenos como por

ejemplo: *Bacteroides*, *Eubacterium*, *Peptostreptococcus*, *Clostridium*, *Enterobacteriaceae*, *Streptococcus*, *Lactobacillus* aumentan, este cambio es generalmente debido a una reducción en la secreción gástrica en este grupo de edad (Hoang, 2004).

Las proporciones de las diversas especies de *Bifidobacterium* también varían con la salud gástrica de cada individuo, y cada grupo de edad tiene sus especies características

Tabla 1: Distribución de las especies de *Bifidobacterium* en el colón humano según la edad

Population	Predominating species	Minor species
Breast-fed infants	<i>B. longum</i> <i>B. infantis</i> <i>B. breve</i>	
Bottle-fed infants Children	<i>B. adolescentis</i> <i>B. infantis</i> <i>B. breve</i> <i>B. bifidum</i> biovar. b <i>B. longum</i>	<i>B. bifidum</i> biovar. b
Adults	<i>B. adolescentis</i> biovars. a and b <i>B. longum</i>	<i>B. bifidum</i> biovar. a
Older adults	<i>B. adolescentis</i> biovars. b <i>B. longum</i>	

Fuente: Gibson, Glenn R. Roberfroid and Marcel B. (2008).

1.1.7.5 Acción probiótica de *Bifidum* en el intestino

Un efecto probiótico de *Bifidum* sólo puede ocurrir si sobrevive su paso por el estómago; algunas son capaces de resistir la acidez gástrica, y esta resistencia se da gracias a la protección del bolo alimenticio (Iñiguez et al, 2006).

Dichas bacterias realizan sus efectos probióticos con, la producción bacteriana de ácidos orgánicos, especialmente los ácidos láctico y acético, la producción de bacteriocinas, e incluso antibióticos, la secreción de enzimas, vitaminas, y otros factores de crecimiento, junto con la estimulación del sistema inmune y la acumulación de metabolitos específicos (Ramírez, 2005).

Se las atribuyen las siguientes funciones:

- **Adhesión al epitelio intestinal**

Se adhieren a las células epiteliales lo que permite la formación de nichos ecológicos dentro de la cual se mantiene el crecimiento de bacterias, independientemente de los cambios en el hábitat, que les permite producir un efecto genuino (Iñiguez, 2006). El biofilm bacteriano, unido a las paredes epiteliales, mantiene el mecanismo de la producción in situ de varios metabolitos bacterianos, que a su vez tienen un efecto sobre otros géneros de bacterias e incluso en el anfitrión. Además, tiene una función de defensa contra las bacterias patógenas (Cástulo et al, 2008).

- **Efectos metabólicos**

- Supresión de la intolerancia a la lactosa
- Efecto hipocolesterolémico
- Desconjugación de ácidos biliares, la reducción de nitrosaminas, y la inhibición de la reducción de los nitratos (Iñiguez, 2006).

Teóricamente podrían utilizarse ocho especies, entre las más importantes *B. bifidum*, *B. breve*, *B. infantis*, *B. longum* que han sido debidamente estudiadas y experimentadas y no constituyen ningún peligro (Ramírez et al, 2011).

1.1.8 El género *Lactobacillus* y su acción probiótica

Este género se encuentran dentro de la clasificación de las Bacterias Acido Lácticas (Hoang, 2004), son beneficiosas para la salud por su capacidad antagónica, la cual se basan en la producción de ácidos orgánicos y otros metabolitos inhibidores, entre los que cabe mencionar el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y otros derivados del metabolismo del oxígeno, así como compuestos aromáticos (diacetilo, acetaldehído), derivados deshidratados del glicerol (reuterina), enzimas bacteriolíticas, bacteriocinas y otros (Samaniego et al, 2002).

Estas bacterias no sólo contribuyen al desarrollo de las características organolépticas y reológicas de los alimentos, sino que poseen una capacidad antagónica, la cual favorece

su proliferación en el alimento e impide el desarrollo de patógenos agrega Samaniego. Además se destaca que el género comprende cerca de 50 especies ya sea de metabolismo homo-fermentativo o hetero-fermentativo, se caracterizan por ser bacilos Gram positivos no esporulados, sin motilidad, de metabolismo fermentativo, anaerobio facultativo, no reducen el nitrato, catalasa y oxidasa negativa y de requerimiento nutricionales complejos (Cristóbal, 2008).

Los lactobacilos no desarrollan olores típicos al crecer en medios comunes, pero contribuyen a modificar el sabor de alimentos fermentados, produciendo compuestos volátiles como diacetilo y sus derivados y hasta sulfuro de hidrógeno (H₂S) y aminas en el queso según se ha expresado (Samaniego et al, 2002).

1.1.8.1 Morfología

Se caracterizan por células en forma de bastoncillos a menudo agrupadas en cadenas, poseen una gran exigencia en cuanto a factores de crecimiento y según las cepas, logran una acidificación de la leche más lenta que en el caso de los estreptococos pero generalmente más intensa gracias a una mejor resistencia a los pHs ácidos (hasta 3,5) y a una concentración más elevada de ácido láctico (como máximo 27g/Litro) (Samaniego et al, 2002).

Han sido clasificadas en tres grupos (subgéneros) (Parra, 2010):

- Grupo I: *Thermobacterium*; homofermentativos y termófilos, sus células son largas, rectas y a menudo empalizadas.
- Grupo II: *Streptobacterium*; mesófilos, homofermentativos, heterofermentativa en algunos casos, sus células son cortas, a menudo ordenadas en filamentos.
- Grupo III: *Betabacterium*; heterofermentativos, ya sea mesófilos o termófilos, sus células son cortas, rectas y separadas (Cristóbal, 2008).

1.1.8.2 Fisiología

Estas bacterias deben estar adaptadas al medio, es decir capaces de utilizar la lactosa y las fuentes de nitrógeno de la leche por lo tanto son ampliamente utilizadas para la fabricación de alimentos (productos lácteos, productos cárnicos, de panificación, bebidas sidra, vino, etcétera) (Cabeza, 2006).

Dichas bacterias crecen fácilmente en medios ricos en vitaminas, bases nitrogenadas y fuentes de carbono y nitrógeno; las vitaminas que requieren están generalmente presentes en la leche en cantidad suficiente, pero a veces es necesario la adición de vitaminas lo que mejora su crecimiento como por ejemplo extracto de levadura (Hoang, 2004).

Los *Lactobacillus* crecen de acuerdo al pH de la siguiente manera, con pH inicial de 6,4 - 4,5 y con un óptimo entre 5,5 y 6,2, su crecimiento cesa cuando el pH alcanza valores desde 4 hasta 3,6 en dependencia de especies y cepas y disminuye notablemente en medios neutros o ligeramente alcalinos. Los lactobacilos son capaces de disminuir el pH del sustrato donde se encuentran por debajo del valor 4,0 mediante la formación de ácido láctico. De esta forma evitan o al menos disminuyen considerablemente el crecimiento de casi todos los microorganismos competidores, exceptuando el de otras bacterias lácticas y el de las levaduras (Parra, 2010).

1.1.8.3 Resultado de la fermentación de *Lactobacillus*

Fermentación de los azúcares según los subgéneros de *Lactobacillus* (Cristóbal, 2008):

Thermobacterium: degradan las hexosas exclusivamente a ácido láctico y resultan incapaces de fermentar pentosas o el gluconato.

Streptobacterium: degradan hexosas (hetero y homofermentativa), pentosas y gluconato con producción de ácido láctico y acético.

Betabacterium: fermentan las hexosas con la producción de ácido láctico, acético y CO₂ y de las pentosas únicamente ácido láctico y acético (Collado, 2004)

1.1.9 Efectos beneficiosos de los probióticos

Uno de los beneficios más destacables de estos microorganismos es que son bacterias aisladas del tracto intestinal de un individuo saludable e introducido nuevamente en el intestino, generalmente por medio de leches fermentadas que son las más populares.

Y otra no menos importante es que compiten con los patógenos no solo por los nutrientes sino también por el espacio físico, produciendo además numerosas sustancias antimicrobianas como las bacteriocinas, ácidos grasos volátiles de cadena corta, peróxido de hidrógeno y ácido láctico que reduce el pH lo cual convierte el medio en uno no tolerable para los patógenos; de hecho, se considera el principal mecanismo por el cual las bacterias lácticas inhiben el crecimiento de diferentes bacterias nocivas como *E. coli*, *Streptococcus* y *Salmonella* (Amores et al, 2004).

1.1.10 Bacterias patógenas

1.1.10.1 Salmonella spp

Puede causar gastroenteritis, fiebre entérica y septicémia, la contaminación de los alimentos se da por contaminación cruzada; este patógeno perteneciente a la familia Enterobacteriaceae, es una bacterias Gram-negativa, anaerobia facultativa, no esporulada, de forma bacilar; fermenta la glucosa con producción de ácido y gas, se divide en dos especies *Salmonella* entérica y *Salmonella bongori*, es capaz de multiplicarse en un amplio rango de temperaturas desde 5 hasta 46°C, con una actividad de agua entre 0,94 y 0,99, pH entre 7 y 7,5, vive en el tracto intestinal de los animales como comensal o patógeno (Begoña, 2007).

1.1.10.2 Staphylococcus aureus

Originan toxinas y enterotoxinas cuya ingesta produce diarrea, vómitos y calambres abdominales, son bacteria Gram-positiva, esférica que puede encontrarse en parejas o agrupada en forma de racimos, anaerobio facultativo y produce un amplio rango de factores de virulencia y patogenicidad, muy resistente, soporta temperaturas extremas 7-48°C y un pH de 4-10, a_w de 0,83- 0,99, presente en el hombre, animales (Begoña, 2007).

1.1.10.3 E. coli

Es un bacilo Gram negativo, anaerobio facultativo de la familia Enterobacteriaceae, tribu *Escherichia*, está presente en grandes concentraciones en la microflora intestinal normal de las personas y los animales donde, por lo general, es inocua. Sin embargo, en otras partes del cuerpo puede causar enfermedades graves, como infecciones de las vías urinarias, bacteriemia y meningitis. Hay descritos seis grupos de *E. coli* productora de diarrea: enterotoxigénica (ETEC), enterohemorrágica (EHEC), enteroinvasiva (EIEC), enteropatógena (EPEC), enteroagregativa(EAEC) y de adherencia difusa (DAEC) (Rodríguez, 2002).

1.2 Probióticos usos y efectos

1.2.1 Aspecto nutricional de los probióticos

Los profesionales de la salud están reconociendo cada vez más los efectos beneficiosos de los probióticos sobre la salud y la nutrición humana. Estudios científicos recientes sobre las propiedades y la funcionalidad de microorganismos vivos en los alimentos sugieren que los probióticos desempeñan un importante papel en las funciones inmunitaria, digestiva y respiratoria, y que podrían tener un efecto significativo en el alivio de las enfermedades infecciosas en los niños y otros grupos de alto riesgo (FAO, 2006).

Es así que los productos que contienen probióticos de alto perfil han tenido un enorme éxito en Europa, Asia, y, más recientemente, en otras regiones del mundo, este éxito comercial promueve el consumo, el desarrollo de productos, y la investigación, y la evidencia más fuerte que respalda el consumo de los probióticos está relacionada con su uso en mejorar la salud del intestino y estimular la función inmunitaria; hoy en día existen una amplia gama de productos disponibles en el mercado (García, 2003).

1.2.2 Relación probióticos y prebióticos

En primera instancia se debe destacar la relación directa que existe entre los probióticos y prebióticos, ya que en el intestino del huésped se produce una simbiosis el cual puede optimizarse mediante intervención farmacológica o nutricional (consumo de probióticos con alimentos que son anfitriones de bacterias viables), es decir que a modo de sugerencia los probióticos deben ser consumidos conjuntamente con prebióticos para que su acción esté garantizada (Alvarado, 2003).

Los prebióticos (aumentan el número de bacterias anaerobias beneficiosas y disminuyen la población de microorganismos potencialmente patógenos) y los probióticos (afectan el ecosistema intestinal estimulando los mecanismos inmunitarios de la mucosa y estimulando los mecanismos no inmunitarios a través de un antagonismo/competencia con los patógenos potenciales) se piensa que estos fenómenos intervienen en la mayoría de los efectos beneficiosos, incluyendo la reducción de la incidencia y gravedad de la diarrea en los casos de enfermedad, que es uno de los usos más ampliamente reconocidos para los probióticos (Lorente, 2001), aunque no ha sido demostrado en humanos, reducen del riesgo de cáncer de colon en modelos animales, probablemente porque suprimen la actividad de ciertas enzimas bacterianas que pueden aumentar los niveles de procarcinógenos, (World Gastroenterology and Organisation, 2008).

1.2.3 Inulina (prebiótico)

Se considera que las bacterias de los productos alimenticios son muy sensibles, debido a su baja tolerancia a las diferentes barreras fisicoquímicas dentro del tracto gastrointestinal, y que solo algunas logran llegar al colon para brindar el efecto benéfico, por lo tanto su efecto es transitorio; pero una alternativa para incrementar su supervivencia es con la adición de prebióticos a los alimentos antes ya mencionados, las cuales son formas solubles de fibra dietética fermentable, la más conocida es la inulina (Solis, 2008).

Es extraída de la raíz de la planta de achicoria, es un fructooligosacárido (FOS) que ayuda en muchas funciones del ser humano, después del almidón es uno de los principales carbohidratos presentes en forma natural, pueden ser incorporados en una gran variedad de productos y lo más importante es que son insensibles a las enzimas del tracto digestivo por lo que llegan intactos al colon, a modo de ejemplo en un artículo de la revista “mundo alimentario” se han encontrado en estudios *in vivo* e *in vitro*, las propiedades probióticas con respecto a algunas especies del genero bifidobacterium por lo tanto tendría un efecto bifidogénico (Madrigal, 2007).

1.2.4 Efectos atribuidos al consumo de alimentos con probióticos

Los probióticos están siendo utilizados de manera variable, es decir por ejemplo que para la fermentación de leches los fermentos consisten en muchos casos en un solo microorganismo o la mezcla, los mismos que se comportan de manera “amistosa” con el organismo (Olagero et al, 2007).

La contribución atribuida a los probióticos para la salud ha sido relacionada con numerosos efectos beneficiosos (Iñiguez, 2006):

- Mejorar la intolerancia a la lactosa.
- Restablecer el equilibrio intestinal frente a diarreas por diversas causas.
- Mantener la homeostasis de la mucosa intestinal para hacer frente a situaciones de mayor predisposición a infecciones microbianas en el tubo digestivo o el aparato genitourinario, alergias.

- Favorecer la acción inmunomoduladora del intestino (Guarner, 2007)

Pero se debe manifestar la importancia que la relación entre la flora intestinal, la dieta y la salud humana tiene, y es en base a esto que algunas organizaciones que velan por la salud y la alimentación, entre ellos el Codex Alimentario, sugieren que antes de recurrir a cualquier complemento de vitaminas, minerales o comprimidos probióticos, se debe alentar a las personas a elegir una alimentación equilibrada, ya que normalmente esta dieta provee todos los nutrientes que se necesitan.

Solo en el caso en que la ingestión de nutrientes con los alimentos sea insuficiente o los consumidores consideren que su alimentación requiere complementos se recurrirá a los mismos (Codex Alimentarius, 2005).

Tradicionalmente las bacterias ácido lácticas han sido utilizadas en la industria de los alimentos con diferentes propósitos; para proporcionar textura, aroma, sabor, calidad preservativa, valor nutricional y mejorar la salud del huésped.

En los últimos años la tecnología de alimentos en todo el mundo se ha inclinado a favor de la producción de alimentos funcionales que engloba la última línea del párrafo anterior, este es el caso de la inclusión de las bacterias ácido lácticas probióticas en la industria de los lácteos (Torres, 2003), los cuales como ya se ha dicho son los máximos representantes.

De este modo la ingestión de microorganismos beneficiosos resulta confortable y agradable, lo que impulsa a un consumo frecuente y placentero, no así en el caso de suplementos o comprimidos que relacionan al paciente con malestar y enfermedad y que su consumo resulta casi obligatorio; de esta forma se aprovecha la sinergia que hacen los probióticos y prebióticos (Vargas et al, 2003).

En otros estudios se evalúa la capacidad contra patógenos según los halos que se forman alrededor de la bacteria beneficiosa por medio de la técnica conocida como difusión en pozos en donde ambos tipos de bacterias compiten en el medio, lo que determinan su acción probiótica; “los efectos inhibitorios no sólo son el resultado de una acidificación del medio, también pueden ejercer diversos sistemas de inhibición microbiana por la producción de ácidos orgánicos, metabolitos del oxígeno, compuestos orgánicos, antibióticos y bacteriocinas” (Ramírez, 2005).

En algunos trabajos realizados con bacterias lácticas interpretan la acción bacteriocinogénica (Cástulo et al, 2008) mediante los halos de inhibición la siguiente forma:

- Inhibición, cuando se observa un halo nítido de inhibición en el lugar en donde se coloca la gota del preparado de los cultivos de las BAL sobre la superficie del medio.
- Inhibición parcial, cuando la presencia del halo fue nítida.
- Sin inhibición, cuando no se encontró ningún halo en la superficie tratada.

Además se deduce que el mecanismo de acción puede ser debido a la competencia por el sustrato, en donde las bacterias lácticas, probablemente tienen una mayor capacidad de adaptación al medio y no permiten el desarrollo de otros microorganismos.

En (Frizzo, 2006) los resultados simplemente se informaron como positivos o negativos sobre la presencia o ausencia de zonas de inhibición.

Otras pruebas inhibitorias realizadas de *L. palntarum* y *L. cassei* frente a *E. coli* y consideró como actividad inhibitoria la formación de un halo mayor de 2mm, estos análisis fueron realizados en tres tiempos 5, 10 y 15 días; los resultados sobresalientes de actividad bactericida se presentaron luego de 5 días con 14 mm y 10 mm respectivamente para cada bacteria beneficiosa (Gutiérrez, 2008).

1.2.5 Fisiología de las LAB en el intestino

1.2.5.1 Función

En la actualidad se proponen varios mecanismos de acción de los probióticos, las cuales pueden ser el resultado de una fermentación desarrollada con un solo tipo de microorganismo probiótico, contener bacterias vivas y diversos compuestos generados durante la fermentación (productos finales del metabolismo, menor concentración de lactosa, presencia de aminoácidos libres, etcétera.) como es el caso de Yakult o LC1-go,

o bien, contener bacterias vivas que son agregadas durante alguna etapa del proceso (Lozada, 2001).

Las principales funciones de las bacterias probióticas autóctonas del intestino son (Iñiguez, 2006):

- **Nutritiva**

La fermentación bacteriana produce ácidos grasos de cadena corta que aportan energía al organismo.

- **Trófica**

Acelera el tránsito gastrointestinal.

Aumenta la velocidad de renovación de los enterocitos.

Incrementa la reabsorción de agua.

- **Defensiva**

Disminuye el pH, aumenta la capacidad redox.

Posee el papel de barrera.

Compite por la fijación con otras bacterias patógenas.

Produce sustancias antimicrobianas denominadas bacteriocinas.

- **Modulación del sistema inmune**

Produce metabolitos como vitaminas (K y algunas del complejo B) y enzimas digestivas.

Favorece la absorción de minerales” (Amores et al, 2004).

Pero ciertos factores pueden desequilibrar la microbiota intestinal, lo que tiene consecuencias negativas para el buen funcionamiento de nuestro organismo y de nuestro sistema inmunitario (de Vrese et al, 2008).

1.2.6 Estudios realizados con probióticos

Estudios clínicos, bien controlados y de investigación básica han demostrado que los probióticos pueden ser una alternativa efectiva para la prevención y tratamiento de enfermedades (Torres, 2003), también se han realizado pruebas para la prevención del cáncer con resultados favorables al cabo de 2 años (Ohta, 2002); hay estudios que documentan los efectos probióticos en una serie de trastornos gastrointestinales y extraintestinales, incluyendo las enfermedades inflamatorias del intestino (EII), el síndrome de intestino irritable (SII), las infecciones vaginales, y las alteraciones de la inmunidad, también han sido investigados en relación con el eczema atópico, la artritis reumatoidea, y la cirrosis hepática (Castro, 2006).

Si bien también existe alguna evidencia clínica que respalda el efecto de los probióticos para bajar el colesterol, los resultados son contradictorios, pero en general, la evidencia clínica más fuerte a favor de los probióticos está relacionada con su uso en mejorar la salud del intestino y estimular la función inmunitaria (Organización mundial de gastroenterología, 2008).

En otros estudios se menciona que la capacidad inmunomodulatoria de las BAL es un criterio de selección para probióticos con fines terapéuticos, por ejemplo hasta la fecha, el único tratamiento para la alergia por alimentos ha sido excluirlo de la dieta; sin embargo estudios recientes indican que la bacterioterapia probiótica tiene un gran potencial para controlar la inflamación alérgica asociada con alimentos, así lo indican estudios realizados con *L. casei Shirota* que muestran la operatividad de células del sistema inmunológico en animales y en humanos (Torres, 2003); en su trabajo la autora demuestra la supervivencia de algunos lactobacilos como es el caso de la bacteria probiótica *Lactobacillus casei shirota*, la cual sobrevive en logaritmos de 10^8 ufc/ml durante tres horas en presencia de sales biliares sintéticas y bilis porcina, en logaritmo 10^7 en HCl pH 3.0 durante igualmente tres horas y una hora en presencia de HCl pH 1.5 (Torres, 2003).

En otro estudio se evaluó la capacidad probiótica de un grupo de 53 bacterias ácido lácticas (BAL) aisladas del suero sometidas de igual forma a las condiciones simuladas de ácido y bilis en el estómago, siendo seleccionadas 7 que a su vez se sometieron a

evaluaciones de sensibilidad antibióticos y adherencia al mucus intestinal, reuniendo las condiciones requeridas para considerarse como potencialmente probióticas (Cueto et al, 2010).

Existen un gran número de trabajos realizados con bacterias ácido lácticas en donde se comprueban las capacidades probióticas de una gran variedad de géneros, todas *in vitro* (simulación de las condiciones gástricas), capacidad contra patógenos e incluso sensibilidad a antibióticos.

1.2.7 Beneficios planteados como hipótesis

Los posibles beneficios de los probióticos, sobre el organismo humano, una vez ingeridos, son los siguientes (Iñiguez, 2006):

- Protección ante microorganismos patógenos, ayudando a reforzar o reconstituir el efecto barrera frente a los microorganismos patógenos, mediante diversas vías.
 - Ocupando los puntos de adhesión en la mucosa, de modo que se impide la adhesión de microorganismos patógenos (Vargas, 2003).
 - Competición por los nutrientes, de modo que los patógenos tienen menos sustancias a su alcance para desarrollarse.
 - Producción directa de sustancias antimicrobianas: las bacteriocinas, moléculas proteínicas.
 - Generación de un entorno hostil para los microorganismos patógenos: acidificación del medio, aumento de la capacidad de oxidorreducción.
 - Estimulación de la inmunidad intestinal y general (Amores et al, 2004).

Recientemente también se ha sugerido que pueden ayudar en el tratamiento contra *Helicobacter pylori* y en prevenir el proceso de carcinogénesis pero son necesarios más estudios. Se encuentra en investigación el uso de bacterias ácido-lácticas como antígenos para el desarrollo de vacunas que induzcan una respuesta humoral protectora (Castro, 2006).

Los experimentos con animales y las observaciones en seres humanos permiten pensar que algunos probióticos, si se ingieren en cantidades suficientes, pueden ayudar a

reforzar las defensas específicas e inespecíficas del intestino, y posteriormente de todo el organismo, mediante las siguientes acciones (Alvarado, 2003):

- Estimulación de la fagocitosis de antígenos por parte de los leucocitos (principalmente macrófagos, polimorfonucleares y células naturales killer).
- Aumento de la producción de citocinas: interferones, interleucinas, factor de necrosis tumoral.
- Aumento de la proliferación de linfocitos B y T.
- Aumento de la producción de inmunoglobulinas (en especial la IgA).
- Mantenimiento de las propiedades tróficas de la mucosa intestinal

Gracias a las propiedades metabólicas que poseen estas cepas, los probióticos pueden desempeñar una función trófica en la mucosa intestinal, contribuyendo a mantener su funcionalidad. Los ácidos grasos de cadena corta (el ácido láctico, el ácido acético y especialmente el ácido butírico), fruto del metabolismo de los probióticos, estimulan la renovación del epitelio intestinal y sirven como su fundamental fuente de energía. Así, se pueden mantener las funciones de la digestión y la asimilación de nutrientes. (Guarner, 2007)

Los efectos benéficos que relacionan a los probióticos en la salud incluyen de forma cada vez más frecuente, tratamiento y prevención de la diarrea por rotavirus en niños y reducción de la diarrea asociada con el uso de antibióticos. También se ha documentado que contribuyen en la prevención de la diarrea del viajero, vaginitis, infecciones urinarias, alergia a los alimentos y reacciones atópicas en niños y pueden mejorar la intolerancia a la lactosa. Se han informado resultados prometedores en personas con enfermedad inflamatoria del intestino, enterocolitis necrotizante y colon irritado (Castro, 2006).

1.2.8 Incorporación de los probióticos a los alimentos

A modo de historia se sabe que desde hace ya cien años la adición de gérmenes vivos a los productos lácteos fue una forma de conservarlos (Lorente, 2001), pero no fue sino

hasta la década de entre los 80 – 90 que en Japón surge el concepto de “alimentos funcionales” los cuales tienen efectos beneficiosos para la salud; a partir de aquí múltiples estudios han confirmado y demostrado la acción de dichos alimentos en la salud del consumidor (Sarmiento, 2006).

Esta es la razón que ha llevado a considerar a los probióticos como alimentos funcionales, ya que al adicionarlos a determinados alimentos y por diferentes mecanismos son eficaces en la prevención y el tratamiento de algunas enfermedades como ya se las ha mencionado anteriormente.

Cabe destacar que “en los países industrializados ha cambiado el concepto de nutrición, pasando del papel de la dieta de aportar los nutrientes necesarios a la idea de que la dieta puede contener alimentos que, además de nutrir, promuevan específicamente la salud. Así surge el concepto del «alimento funcional» (AF), amplio abanico de productos nutritivos y no nutritivos que no sólo alimentan, sino que modulando o actuando sobre determinadas funciones y elementos del organismo, tienen un efecto beneficioso en la salud del individuo” (Lorente, 2001); así los probióticos, prebióticos y una simbiosis han sido incorporados a los alimentos.

1.2.9 Alimentos que contienen probióticos

El yogur se ha considerado tradicionalmente como un alimento saludable debido a su contenido bacteriano (del Campo, 2005); en principio muchos alimentos podrían ser utilizados como vehículos de probióticos, pero tradicionalmente las leches fermentadas han sido utilizadas como la principal vía de administración de éstos, y las bacterias usadas y estudiadas son bacterias lácticas, microorganismos estrechamente ligados a los productos lácteos.

Las leches fermentadas además de su amplia aceptación como alimentos nutritivos, sabrosos y convenientes, han sido utilizadas en forma creciente como el principal vehículo para las bacterias con características probióticas en los humanos en el transcurso de las últimas décadas, particularmente las bacterias que tienen la capacidad de implantarse en la flora intestinal como algunas especies de *bifidobacterias*, *Lactobacillus casei* o *Lactobacillus acidophilus* (García, 2003)

Según el (Codex 2003) es un producto lácteo obtenido por medio de la fermentación de la leche, con o sin modificaciones en la composición por medio de la acción de microorganismos adecuados y teniendo como resultado la reducción del pH con o sin coagulación. Estos cultivos de microorganismos serán viables, activos y abundantes en el producto hasta la fecha de duración mínima.

1.2.10 Aplicaciones industriales

Las cualidades pedidas a las cepas de fermentos son múltiples, en primer lugar deben transformar el alimento en un nuevo producto con propiedades definidas y constantes, deben permitir una buena conservación del alimento y defenderlo en particular del deterioro por otros microorganismos, la acidificación es uno de los beneficios proporcionados, la producción de antibióticos o de bacteriocinas es otro a veces más específico (Cabeza, 2006).

Con el desarrollo de la genética e ingeniería genética, se utilizan ya cepas recombinadas naturalmente y las bacterias lácticas son objeto de investigación para otras cualidades nutricionales y terapéuticas en preparaciones probióticas (Hoang, 2004)

1.2.11 Aplicaciones en la industria cárnica

Son empelados con fines tecnológicos más que biológicos, ya que originan cambios durante el proceso de maduración (21 a 30 días) lo que se manifiesta en un descenso de pH de la carne, una desecación y concentración de la sal y producción de sustancias antimicrobianas que contribuyen a la reducción y posterior desaparición de bacterias Gram negativas; en definitiva el principal papel de las BAL en la industria cárnica es contribuir con la rápida acidificación de estos productos y aportar componentes aromáticos y propiedades texturales (Cabeza, 2006).

1.2.12 Aplicaciones en la industria de conservas vegetales y cereales

La utilización de cultivos puros de bacterias lácticas para la fermentación de productos vegetales: pepinos, coles, aceitunas y otros productos es todavía muy limitada y lo principal en esta ocasión es todavía la fermentación natural de estos productos por las bacterias lácticas presentes en su superficie (Hoang, 2004), por lo tanto el uso de cultivos estérter para esta actividad industrial se encuentra poco explotada; de todas formas su exploración queda como un campo amplio de investigación y desarrollo para futuras generaciones (Cabeza, 2006).

CAPITULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 MATERIALES

2.1.1 Materiales de laboratorio

- Botellones volumétricos: 200ml, 500ml, 1000ml
- Cajas Petri
- Varillas de vidrio
- Pipetas serológicas: 1ml, 5ml, 10ml
- Vasos de vidrio: 20ml, 50ml, 100ml, 200ml, 500ml
- Pinzas metálicas
- Hisopos
- Pipetas automáticas
- Puntas de plástico
- Fundas herméticas de plástico
- Mecheros: alcohol, gas
- Hazas
- Tubos de ensayo con tapas
- Gradillas

2.1.2 Equipos de laboratorio

- Incubadora 1
- Incubadora 2

- Estufas de esterilización
- Balanza
- Microscopio
- Cámara de flujo laminar
- Autoclave
- Peachimetro de electrodo

2.1.3 Insumos para laboratorio

- Fermentos: *Lb. rhamnosus* y *Lb. acidophilus* cepas ATCC liofilizadas, y *B. breve*
- Leche entera estandarizada
- Leche en polvo
- Blood agar base (agar sangre) obtenido de HIMEDIA laboratorios
- Peptone Water (buffered) distribuidor MERCK
- Anaerobier – agar nach BREWER distribuidor MERCK
- Hefeextrakt granuliert distribuidor MERCK
- Tween 80 distribuidor PANREAC QUIMICA SAU
- Agar bacteriological distribuidor SCHARLAU CHEMIE S.A.
- Lactobacilli MRS broth distribuidor ACUAMEDIA
- Nutrient broth distribuidor HIMEDIA
- Anaerocult A y PCA distribuidor MERCK

2.2 MÉTODOS

2.2.1 Obtención de cultivos iniciadores

2.2.1.1 Aislamiento y propagación del cultivo

En la primera etapa se inició el aislamiento y propagación del cultivo, dicho de otra forma, su activación en agares tradicionales empleados según (Microbiologics Retail Catalog: 39 th Edition) , a partir de un cultivo comercial y un liofilizado que han sido adquiridos cada uno de diferentes laboratorios a saber: *Lb. rhamnosus* y *Lb. acidophilus* desde la empresa MICROBIOLOGICS, estas son cepas ATCC liofilizadas, y *B. breve* desde CHR HANSEN la cual contiene una mezcla de bacterias de los géneros: *Bifidobacterium*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*

Figura1: Aislamiento y propagación de los cultivos



Fuente: Autor

Para incrementar el número de bacterias puras que son necesarias para la inoculación en la leche estandarizada, fue necesario encontrar el agar óptimo de crecimiento para cada bacteria:

Tabla 2: Agares sometidos a pruebas de aislamiento

BACTERIA	AGAR (MEDIO DE CULTIVO)
Bifidobacterium breve	Agar – MRS Anaerobier Agar BREWER
Lb. acidophilus	Agar – Nutrient BD LBS Agar (Lactobacillus Selection Agar)
Lb. rhamnosus	Blood Agar Base Agar – Nutrient

Fuente: Autor

Como ya se ha mencionado anteriormente, debemos cerciorarnos de la eficacia del cultivo, ya que las bacterias no siempre se desarrollan en el mismo medio que se describe en el fundamento teórico.

En el cuadro se describen los agares con los que se probaron el desarrollaron de las bacterias luego de 48 horas de incubación a una temperatura de 37°C en el caso de *Lb. rhamnosus* y *Lb. acidophilus* y 40°C *Bifidobacterium*.

2.2.2 Inoculación de leche (obtención del starter)

Se empleó el método colorimétrico de caldos estándares de Mc Farland el cual propone su equivalencia ajustada, dicha técnica consiste en realizar suspensiones bacterianas ajustadas a un patrón tomando una muestra de la bacteria requerida y la consiguiente incorporación en un tubo con agua estéril o peptona hasta el momento en que se produzca la turbidez similar al del estándar, en nuestro caso se usó como referencia el patrón o estándar 5 equivalente a $1,5 \times 10^9$ según explica la publicación de (Servicio Antimicrobianos - INEI – ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán”, 2001) esto se realizó con cada bacteria aislada.

Figura2: Caldo estándar número 10 de Mc Farland.



Fuente: Autor.

Del estándar de Mc Farland obtenido se adiciona 1ml del mismo en 100 ml de leche con un 9% de sólidos totales, manteniendo el tiempo y la temperatura constantes: incubación por 5 horas a sus temperaturas correspondientes es decir 37°C en el caso de *Lb. rhamnosus* y *Lb. acidophilus* y 40°C *Bifidobacterium*, hasta alcanzar un pH entre 4 y 5.

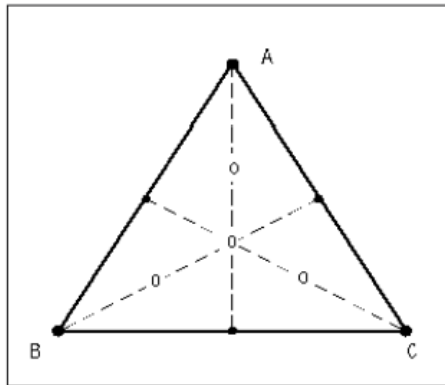
2.2.3 Cuantificación o recuento en placa

Su cuantificación se lo realiza en agar MRS para comprobar el número de bacterias con el que se parte.

2.2.4 Desarrollo del diseño experimental de mezclas

Se utiliza el diseño de mezclas Simplex Lattice con 6 puntos espaciados en el perímetro, un adicional de 3 puntos axiales localizados en el interior a medio camino entre el centroide y los vértices y 1 punto en el centroide.

Figura3: Diseño simplex con diez puntos aumentados para tres componentes



Fuente: (Napolitano, 2013)

En el diseño las variables son las bacterias ya que se desea conocer el resultado de su interacción:

Variables

Tabla 3: Variables del diseño experimental

Bifidobacterium breve	X1
Lb. acidophilus	X2
Lb. rhamnosus	X3

Fuente: Autor.

Los experimentos que se realizarán son 10: 3 mezclas puras, 3 binarias y 4 ternarias

Tabla 4: Número y proporciones de experimentos

	X1	X2	X3	Recuento
Exp	Bifidum breve	Lb. Acidophilus	Lb.rhamnosus	
1	1	0	0	
2	0	1	0	
3	0	0	1	
4	1/2	1/2	0	
5	1/2	0	1/2	
6	0	1/2	1/2	
7	1/3	1/3	1/3	
8	1/6	1/6	2/3	
9	1/6	2/3	1/6	
10	2/3	1/6	1/6	

Fuente: (Gutiérrez, 2008)

Las proporciones en las que participan los componentes de la mezcla deben satisfacer dos restricciones:

$$0 \leq x_i \leq 1, \text{ para cada componente } i; \sum_{i=1}^q x_i = x_1 + x_2 + \dots + x_q = 1$$

La primera indica que las proporciones tienen que ser cantidades entre cero y uno, es decir cada componente debe estar sujeto a un límite inferior y superior, y la segunda condiciona a que las q proporciones sumen siempre la unidad un valor fijo, lo cual causa que los niveles de los componentes x_i no sean independientes entre sí.

En base a esto y cumpliendo la primera condición el límite superior es 24 ml y el límite inferior es 4ml que se toma de cada cultivo iniciador obtenido y cuyo recuento ya se ha identificado; para cumplir la segunda condición la mezcla de bacterias antes de la inoculación en la leche siempre tiene que sumar 24 ml, dichas cantidades se han decidido así, debido a que el porcentaje de fermento para una inoculación, no es una imposición y depende de la experimentación con dichos cultivos. Esta cantidad de fermento líquido será inoculado en 300 ml de leche entera; las variables respuestas son en todos los casos el recuento de ufc en placa.

Tabla 5: Cantidades de starter según límite inferior y superior

CANTIDADES EN 300 ml				
	X1	X2	X3	Rend
Exp	Bifidum	Lc. Acidophilus	Lc.rhamnosus	
1	24	0	0	
2	0	24	0	
3	0	0	24	
4	12	12	0	
5	12	0	12	
6	0	12	12	
7	8,000	8,000	8,000	
8	4,000	4,000	16,000	
9	4,000	16,000	4,000	
10	16,000	4,000	4,000	

Fuente: Autor

2.2.5 Aceptabilidad, análisis organolépticos

Fue necesario calificar la aceptabilidad de las mezclas, valiéndonos del hecho de que la cantidad de bacterias probióticas presentes en el producto no define su aceptación por parte del consumidor.

De esta forma con un panel de catadores se analizaron las características organolépticas de las mezclas; para construir la ficha que evaluó los experimentos nos basamos en una cata de análisis descriptivo; esta prueba permite detectar pequeños cambios en el sabor del producto que está siendo evaluado, con este se desarrolla y mejora sabores en los productos alimenticios, también se emplea para detectar olores desagradables.

Para el desarrollo del panel se requiere de ocho a diez panelistas con experiencia, las características tomadas en cuenta se adjuntan en la ficha de cata:

Figura4: Ficha de catación

Ficha de cata						
Yogur Natural tipo 1 Sin Sabor						
Numero de ficha:			N° del catador:			
Fecha:						
Nomenclatura						
E: Excelente MB: Muy bueno B: Bueno R: Regular D: Deficiente						
FACTOR VISUAL	Característica	E	MB	B	R	D
	Color	5	4	3	2	1
	Presencia de suero	5	4	3	2	1
	Grumos	5	4	3	2	1
FACTOR OLFATIVO	Característica	E	MB	B	R	D
	Ácido	5	4	3	2	1
	Acético	5	4	3	2	1
FACTOR GUSTATIVO	Característica	E	MB	B	R	D
	Ácido	5	4	3	2	1
	Acético	5	4	3	2	1
CONSISTENCIA	Característica	E	MB	B	R	D
	Suavidad	5	4	3	2	1
	Cremosidad	5	4	3	2	1
	Paleatibilidad	5	4	3	2	1
Observaciones:						
Total características sensoriales						/50

Fuente: Autor

Para construir la ficha que evaluó los experimentos nos basamos en una cata de análisis descriptivo; esta prueba permite detectar pequeños cambios en el sabor del producto que está siendo evaluado. Se aplica para desarrollar y mejorar sabores en los productos alimenticios para hacerlos más agradables y detectar olores desagradables.

Para el desarrollo del panel se requiere de ocho a diez panelistas con experiencia.

2.2.6 Pruebas *in vitro* funcionalidad de un producto

Para medir la funcionalidad de un producto se tomó en cuenta la consulta de expertos FAO/OMS del 2001 en donde se dan pautas para su evaluación, uno de los primeros puntos a tener en consideración es que no debería hacerse hincapié en una cepa concreta considerada superior a otra, sino en los beneficios sumados de una mezcla conferidos para la salud del huésped.

En el proceso de selección de microorganismos probióticos se deben considerar varios aspectos, incluyendo características de seguridad, funcionales y tecnológicas. Entre los aspectos funcionales se pueden mencionar viabilidad (que lleguen vivas) y persistencia en el tracto gastrointestinal, inmunomodulación y propiedades antagonistas; estas características de funcionalidad se miden dentro de la denominación de pruebas *in vitro*.

Por lo tanto se concuerda en que deberían realizarse estudios *in vitro* para establecer los posibles beneficios de los probióticos para la salud antes de emprender ensayos *in vivo*.

Para este trabajo se van a tomar en cuenta los siguientes análisis *in vitro*:

- Número de bacterias presentes o recuento en placa que según la norma ecuatoriana (INEN, 2011)

Tabla 6: Cantidad de microorganismos específicos en leche fermentada sin tratamiento térmico posterior a la fermentación

PRODUCTO	Yogur, kumis, kéfir, leche cultivada, leches fermentadas con ingredientes y leche fermentada concentrada Mínimo	kéfir y kumis Mínimo
Suma de microorganismos que comprenden el cultivo definido para cada producto	10^7 UFC/g	
Bacterias probióticas	10^6 UFC/g	
Levaduras		10^4 UFC/g

Fuente: (INEN, 2011)

- Tolerancia al ácido
- Tolerancia a la bilis
- Capacidad de inhibición de patógenos
- Acidez durante vida de estante

2.2.6.1 Tolerancia al ácido

Se preparó caldo MRS y se lo ajustó a diferentes pHs 3, 2.5 y 2 los cuales simulan las condiciones gástricas del estómago, se colocaron 10 ml de en tres tubos para cada pH y para cada bacteria dando un total de 9 tubos, en seguida se inocularon 100 microlitros de yogur de las mezclas puras y de aquellas cuyas propiedades organolépticas resultaron agradables para el consumidor, se incubaron los tubos durante 2 horas a 37°C, transcurrido ese tiempo se realizó la siembra de cada tubo en agar PCA para su recuento después de 48 horas de incubación, así se medirá el porcentaje de supervivencia de las bacterias en dicho medio de acidez.

2.2.6.2 Tolerancia a la bilis

Se preparó caldo BRILA en tubos para cada bacteria, este caldo contiene un 3% de bilis de buey que resulta ser suficiente para realizar el análisis de resistencia a la bilis, se colocan 10 ml de BRILA en cada tubo para las mezclas puras y las seleccionadas por los panelistas de cata, se incubaron por 2 horas y se sembraron en agar PCA para su recuento después de 48 horas.

2.2.6.3 Capacidad de inhibición de patógenos

Los análisis se realizaron con tres bacterias patógenas las más comunes en nuestro medio: *E. coli*; *S. aureus* y *Salmonella* para lo cual se preparó agar Muler Hinton en 15 placas, en cada caja se sembraron las bacterias patógenas, se empapo papel filtro de un diámetro de 2mm en el preparado de yogur y se los colocó sobre la siembra de patógenos, se las llevó a incubación durante 48 horas luego de lo cual se observaron y midieron los halos formados.

2.2.7 Acidez durante vida de estante

Se midió la acidez de los yogures seleccionados por el panel de catadores con Hidróxido de Sodio 0,11 N durante 30 días obteniéndose una curva.

2.2.8 Identificación de bacterias beneficiosas en el microscopio

Se identificó a cada bacteria, basándonos en la taxonomía de cada una de ellas

Bifidobacterium: células caracterizadas por su gran variedad de formas (pleomórficos)

Lb. Acidophilus y *Lb. rhamnosus*: células en forma de bastoncillos o varas a menudo agrupadas en cadenas.

CAPITULO III

RESULTADOS

3.1 Obtención de cultivos iniciadores

3.1.1 Aislamiento y propagación del cultivo

Las bacterias se desarrollaron y se propagaron luego de varias pruebas en los siguientes agares:

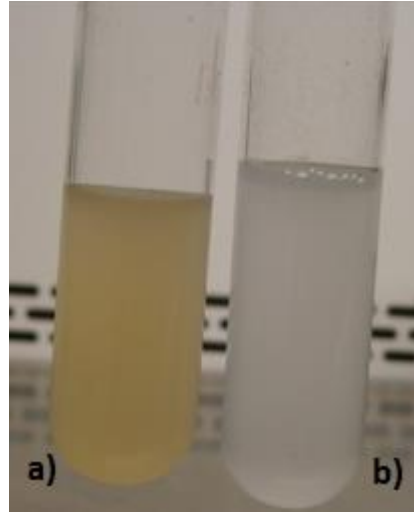
Tabla 7: Agares de desarrollo aptos para cada bacteria

BACTERIA	AGAR (MEDIO DE CULTIVO)
Lb. rhamnosus	Blood agar base (agar sangre)
Lb. acidophilus	BD LBS Agar (Rogosa Agar)
Bifidum breve	Anaerobier – agar nach BREWER

Fuente: Autor

3.1.2 Inoculación de leche (obtención del starter)

Figura5: Comparación estándares (a) Cultivo estándar. (b) estándar de Mc Farland



Fuente: Autor.

De la propagación de bacterias se obtuvo los estándares según Mc Farland número 10, de este se adicionó 1ml en 100 ml de leche con un 9% de sólidos totales, se mantuvo el tiempo y la temperatura constantes: incubación por 5 horas a sus temperaturas correspondientes es decir 37°C en el caso de *Lb. rhamnosus* y *Lb. acidophilus* y 40°C *Bifidobacterium*, hasta alcanzar un pH entre 4 y 5.

3.1.3 Cuantificación o recuento en placa

El resultado de recuento en placa de cada starter se ordena de mayor a menor en el siguiente cuadro:

Tabla 8: Recuento en placa de cada starter

Cuantificación del STARTER o cultivo base	
Bacteria	ufc/ml
Bifidobacterium breve	$2,1 \times 10^8$
Lb. acidophilus	6×10^7
Lb. rhamnosus	1×10^7

Fuente: Autor.

Figura6: Cultivos base. (a) Starter de Lb. acidophilus. (b) Starter de Lb. rhamnosus. (c) Starter de B. breve



Fuente: Autor.

3.2 Diseño experimental de mezclas

El recuento en placas se ordena por el número de experimento:

Tabla 9: Rendimiento (recuento en placa) de cada experimento

	X1	X2	X3	
Exp	Bifidum	Lc. Acidophilus	Lc.rhamnosus	Recuento
1	24	0	0	7×10^9
2	0	24	0	2×10^8
3	0	0	24	3×10^8
4	12	12	0	1×10^7
5	12	0	12	1×10^7
6	0	12	12	4×10^7
7	8,000	8,000	8,000	3×10^7
8	4,000	4,000	16,000	2×10^7
9	4,000	16,000	4,000	1×10^7
10	16,000	4,000	4,000	2×10^7

Fuente: Autor.

La inoculación de mezclas puras en leche entera dio un recuento por encima del mínimo permitido por la norma ecuatoriana de leches fermentadas (NTE INEN 2395, 2011), lo cual es favorable, pero es necesario someterlos a varios análisis y evaluar su acción probiótica individual y en asociación; los recuentos de mezclas binarias y ternarias dieron resultados en logaritmos de 10^7 en todos los experimentos, es decir que si se sigue variando el volumen de los cultivos starter el recuento seguirá dando el mismo resultado, por lo que una optimización del diseño no sería conveniente, en este caso para identificar la mezcla óptima en términos de probioticidad es conveniente someter los experimentos a una selección por catas, debido a que a pesar de que los experimentos dieron lecturas logarítmicas favorables no todos presentaron características sensoriales adecuadas.

3.5 Aceptabilidad, pruebas sensoriales

Las características nutricionales de un producto o las propiedades funcionales que posee no son suficientes para su aceptación por parte del consumidor, este sin duda alguna prefiere productos que le resulten placenteros a los sentidos muy especialmente al gusto.

Se eligieron dos experimentos como los óptimos, estos experimentos fueron sometidos a los análisis que comprueban su probioticidad, para ello fue necesario realizar además análisis con las bacterias puras y observar si efectivamente su acción probiótica era mejorada con la interacción.

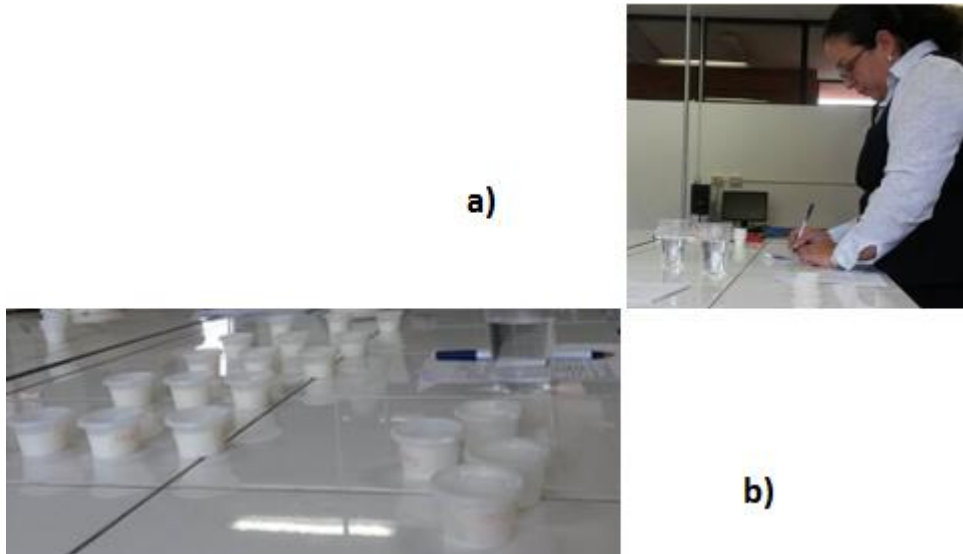
Tabla 10: Experimentos mejor aceptados por los panelistas

	X1	X2	X3		
Exp	Bifidum	Lc. Acidophilus	Lc.rhamnosus	Recuento	Catación%
1	24	0	0	7×10^9	71
2	0	24	0	2×10^8	68
3	0	0	24	3×10^8	57
4	12	12	0	1×10^7	77
5	12	0	12	1×10^7	80
6	0	12	12	4×10^7	77
7	8,000	8,000	8,000	3×10^7	78
8	4,000	4,000	16,000	2×10^7	79
9	4,000	16,000	4,000	1×10^7	79
10	16,000	4,000	4,000	2×10^7	82

Fuente: Autor.

De esta forma los experimentos 5 y 10 fueron los más aceptados.

Figura7: Cataciones. (a) Evaluación del catador. (b) Muestras de catación



Fuente: Autor.

3.5 Pruebas *in vitro* funcionalidad de un producto

3.5.1 Tolerancia al ácido

Los análisis se realizaron también en los experimentos de mezclas puras ya que es necesario evaluar su acción probiótica de forma individual o si para su efecto necesitan asociación.

De acuerdo a lo expuesto se realizaron pruebas con ácido clorhídrico a diferentes pHs con una exposición de 2 horas y con concentraciones logarítmicas de:

Tabla 11: Recuento en placa de los cultivos base

Cuantificación del STARTER o cultivo base	
	ufc/ml
Experimento 1	7×10^9
Experimento 2	2×10^8
Experimento 3	3×10^8
Experimento 5	1×10^7
Experimento 10	2×10^7

Fuente: Autor.

Se realizaron 4 repeticiones: en las tres primeras pruebas se construyó estándares de McFarland 5, 9 y 10 con un equivalente en logaritmos de $10^8 - 10^9$ pero no hubo supervivencia luego de realizar una siembra en agar PCA por 48 horas a 37°C , por lo cual se decidió agregar al estándar 10, *inulina* un agente prebiótico en un porcentaje de 0,5 %, con lo cual existió supervivencia:

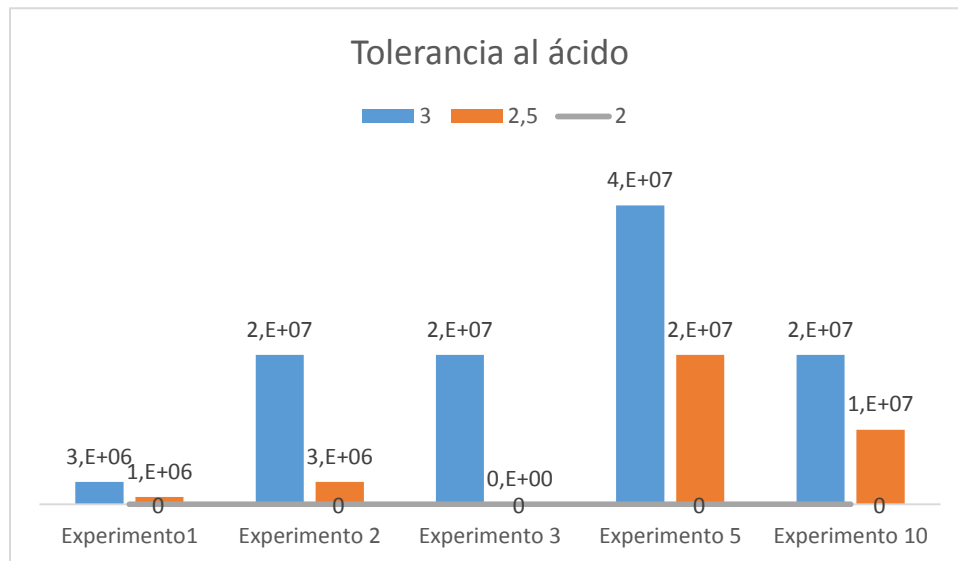
- En HCl, pH 3 existe una supervivencia de bacterias en logaritmos de 10^7 ufc/ml de todos los experimentos.
- En HCl pH 2,5 los experimentos 1 y 2 sobreviven en logaritmos de 10^6 , en el experimento 3 no hubo supervivencia y en los experimentos 5 y 10 la supervivencia fue en logaritmos de 10^7 .
- En HCl, pH 2 no hubo supervivencia de bacterias en ninguno de los experimentos.

Tabla 12: Tolerancia a diferentes concentraciones de ácido clorhídrico

Tolerancia al ácido			
Experimentos	pH		
	3	2,5	2
Recuento en placa			
Mezclas puras			
1	3×10^7	1×10^6	0
2	2×10^7	3×10^6	0
3	2×10^7	0	0
Mezcla binaria			
5	4×10^7	2×10^7	0
Mezcla ternaria			
10	2×10^7	1×10^7	0

Fuente: Autor.

Figura8: Representación gráfica de la tolerancia al ácido clorhídrico 6M



Fuente: Autor.

3.5.2 Tolerancia a la bilis

Para este análisis también se tomaron en cuenta los experimentos de mezclas puras con una exposición de 2 horas:

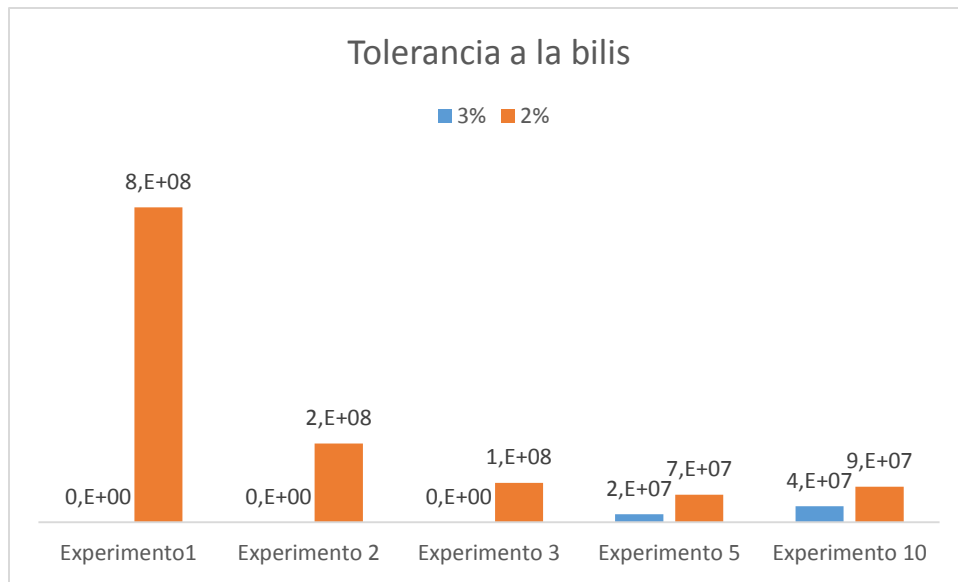
Las bacterias no fueron resistentes en concentraciones de bilis al 3 por ciento en los experimentos 1,2 y 3, mientras que en el 5 y 10 resistieron en logaritmos de 10^7 ; en concentraciones de 2 por ciento de bilis las mezclas puras 1,2 y 3 resistieron en logaritmos de 10^8 , 5 y 10 en log de 10^7 .

Tabla 13: Tolerancia a la bilis 2 porcentajes

Tolerancia a la bilis		
Experimentos	Bilis porcentaje	
	3%	2%
	Recuento en placa	
Mezclas puras		
1	0	8×10^8
2	0	2×10^8
3	0	1×10^8
Mezcla binaria		
5	2×10^7	7×10^7
Mezcla ternaria		
10	4×10^7	9×10^7

Fuente: Autor.

Figura9: Representación gráfica de la tolerancia a la bilis



Fuente: Autor.

3.5.3 Capacidad de inhibición de patógenos

Tabla 14: Halos de inhibición de capacidad contra patógenos

Actividad antipatógena tamaño de halos de inhibición				
Bacterias beneficiosas	Experimentos	Bacterias patógenas		
		Mezclas puras		
		E. coli	Salmonella	S. aureus
	Experimento 1	12,6mm	12,3mm	11mm
	Experimento 2	11,3mm	11,3mm	10,3mm
	Experimento 3	11,3mm	12,7mm	10,7mm
		Mezcla binaria		
	Experimento 5	14,3mm	13,7mm	13,7mm
		Mezcla ternaria		
Experimento 10	12,3mm	13,3mm	12mm	

Fuente: Autor.

Se determinó la capacidad bactericida de las mezclas frente a 3 bacterias patógenas: *E. coli*, *Salmonella spp* y *S. aureus*; además de evaluar las mezclas seleccionadas se tomaron en cuenta las mezclas puras con el afán de hacer una comparación entre su actividad individual y en conjunto (interacción).

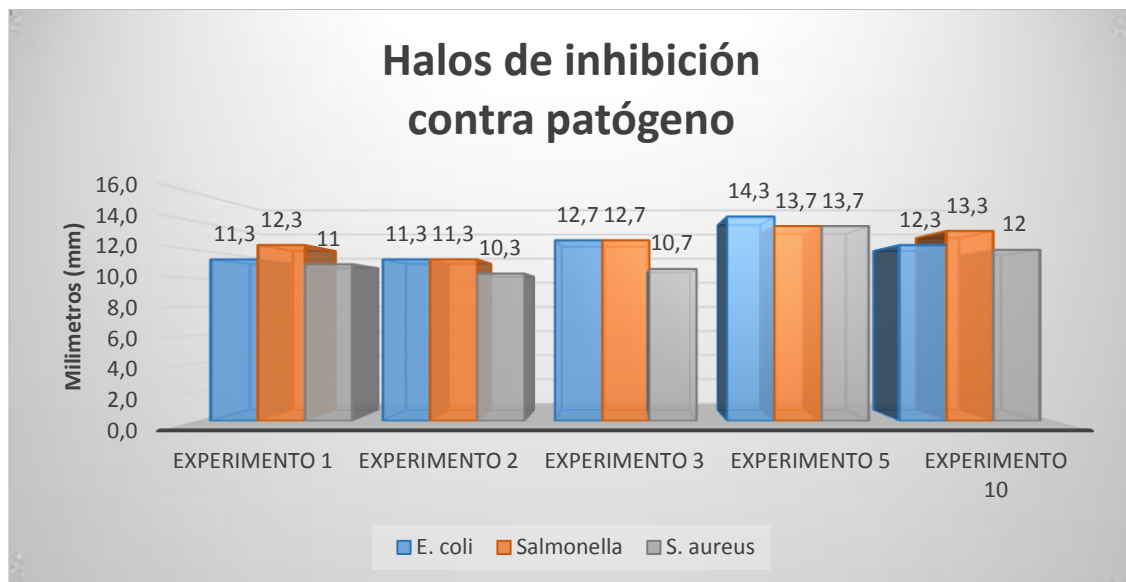
Con respecto a la inhibición de las mezclas frente a *E. coli* el experimento 5 presentó un halo superior al resto de experimentos 14,3mm de diámetro, los experimentos 1 y 10 presentaron un halo de 12,6mm y 12,3mm respectivamente.

La inhibición frente a *Salmonella spp* el experimento 5 presentó un halo superior al resto 13,7mm, seguido del experimento 10 con 13,3mm.

Y frente a *S. aureus* el experimento 5 igualmente dio un diámetro de 13,7mm siendo de igual forma superior a los demás experimentos.

En todos los casos las mezclas dan resultados superiores a las puras lo que da entender que su acción en interacción es más eficiente que su acción individual.

Figura10: Representación gráfica de halos de inhibición contra patógenos

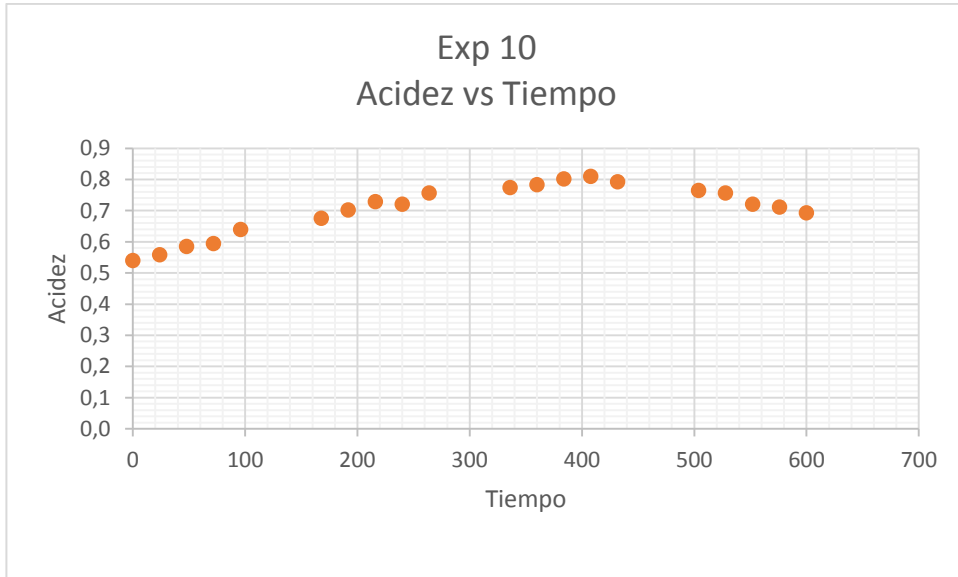


Fuente: Autor.

3.5.4 Acidez durante vida de estante

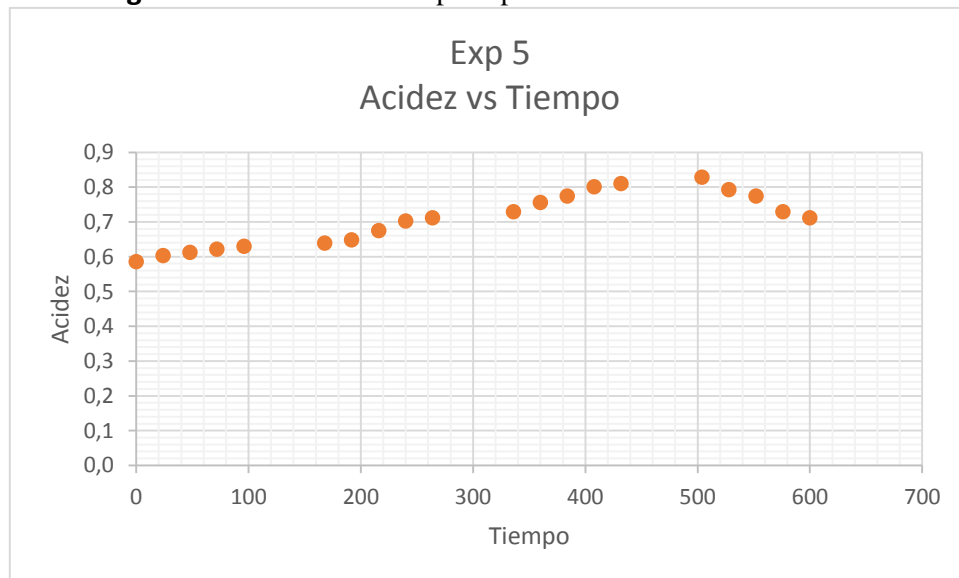
Con el propósito de establecer la curva de acidificación para determinar la acidez del yogur en el transcurso del proceso se tomaron una serie de datos teniendo en cuenta el tiempo, la temperatura constante a 4°C.

Figura11: Acidez Vs Tiempo experimento 10



Fuente: Autor.

Figura 12: Acidez Vs Tiempo experimento 5

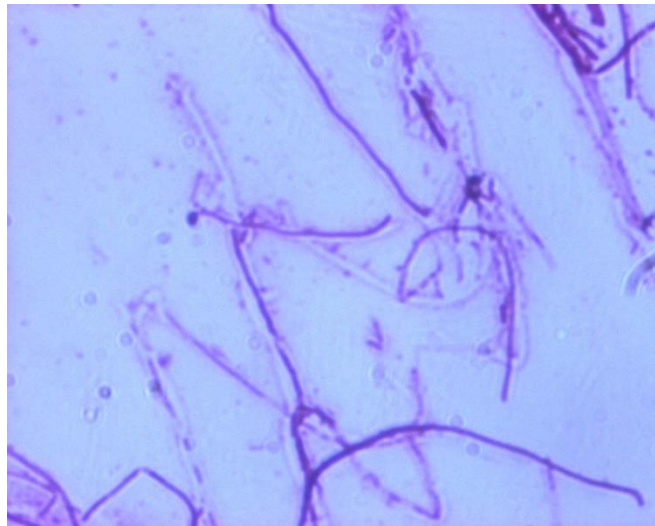


Fuente: Autor.

3.6 Identificación de bacterias beneficiosas en el microscopio

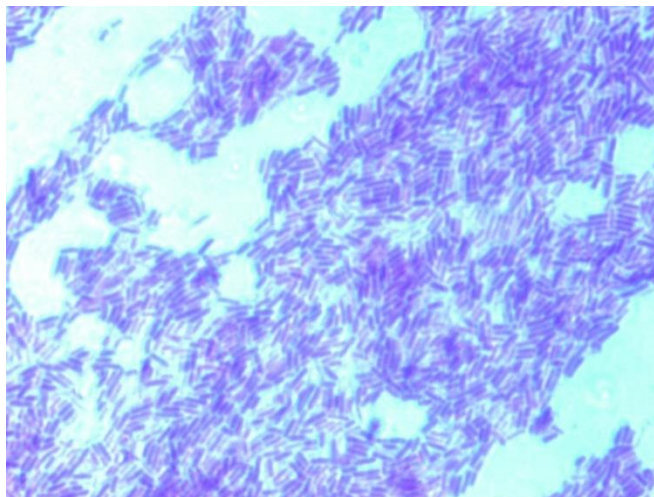
Lb. acidophilus y *Lb. rhamnosus*: células en forma de bastoncillos o varas a menudo agrupadas en cadenas.

Figura13: células de *Lb. acidophilus* vistas al microscopio



Fuente: Autor.

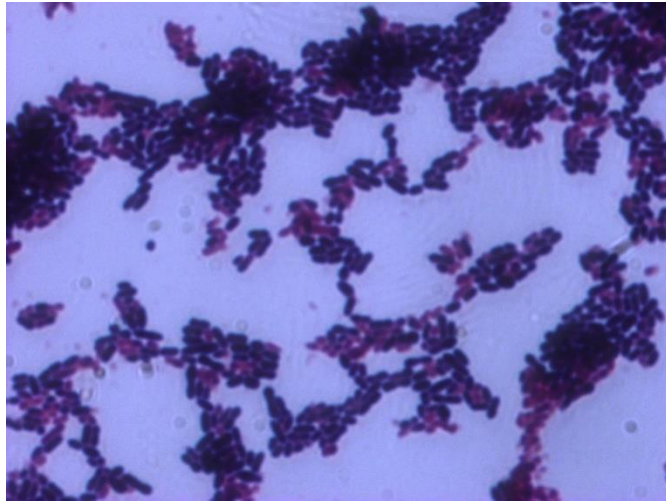
Figura14: Células de *Bifidobacterium* vistas en el microscopio



Fuente: Autor.

Bifidobacterium: células características por su gran variedad de formas (pleomórficos)

Figura15: Células de *Lb. rhamnosus* vistas en el microscopio



Fuente: Autor.

DISCUSIÓN

Se aislaron tres cepas de bacterias potencialmente probióticas, dos del género *Lactobacillus* (*Lb. acidophilus*, *Lb. rhamnosus*) y el *Bifidobacterium breve* y fueron identificadas por el método de la tinción de Gram, según la taxonomía de cada una de ellas; dichas bacterias se mostraron viables al termino del consumo del sustrato una vez que fueron aplicadas pruebas de aislamiento.

Con las bacterias aisladas se elaboraron los STARTERS para iniciar el diseño de mezclas simplex latice, el resultado medido fue comparado con la norma INEN de alimentos funcionales, cuyos rendimientos del recuento en placa fueron en el caso de las mezclas puras: logaritmos de 10^9 (*Bifidum*), logaritmos de 10^8 (*acidophilus* y *rhamnosus*) y en el caso de mezclas binarias y ternarias logaritmos de 10^7 , es decir que todas cumplen la norma, lo que nos lleva a pensar que dichas bacterias proliferan e interactúan creando un beneficio solas que en interacción, pero en el 2002 la FAO recomienda someter a esta clase de productos a análisis *in vitro* que evalúan su nivel de probioticidad y los resultados fueron los siguientes:

- En ácido clorhídrico pH 3, 2,5 y 2, ninguna resistía, por lo cual se agregó el preparado de bacterias con inulina en un porcentaje de 0,5%, los cambios fueron significativos, todas resistieron en un pH de 3 pero únicamente las mezclas binaria y ternaria resistieron en logaritmos de 10^7 en un pH de 2,5 y ninguna resistió en pH 2.
- En un porcentaje de bilis al 3 y 2%, las mezclas puras no fueron resistentes en concentraciones del 3 por ciento, mientras que las combinaciones binaria y ternaria resistieron en logaritmos de 10^7 , en concentraciones del 2 por ciento de bilis las mezclas puras resistieron en logaritmos de 10^8 y las combinaciones resistieron en log de 10^7 .
- Inhibición contra patógenos frente a tres bacterias: *E. coli*, *Salmonella* y *S. aureus*, el experimento 5 presento una inhibición contra patógenos superior al resto de experimentos: *E.coli* 14,3mm, *Salmonella* 13,7mm y *S. aureus* 13,7mm;

seguida por el experimento 10: E.coli 12,6mm, Salmonella 13,3mm y S. aureus 12mm.

De la misma manera, en las propiedades sensoriales de las combinaciones puras no resultaron agradables ni placenteras para el grupo de panelistas que evaluaron sus características organolépticas y en el caso de mezclas binarias y ternarias los resultados fueron muy aceptables; de dichas pruebas resultaron idóneas dos combinaciones: la primera binaria, el experimento 5 ($\frac{1}{2}$ *Bifidum*, 0 *acidophilus* y $\frac{1}{2}$ *rhamnosus*) y la segunda ternaria, el experimento 10 ($\frac{2}{3}$ *Bifidum*, $\frac{1}{6}$ *acidophilus* y $\frac{1}{6}$ *rhamnosus*).

En todos los casos las mezclas dan resultados superiores a las puras lo que da a entender que su actividad en interacción es más eficiente que su acción individual y su vida de anaquel fue de 30 días a una temperatura de 4°C sin conservantes, reuniendo así las condiciones requeridas que mejoran la actividad probiótica de este yoyur.

CONCLUSIONES

1. Las interacciones obtenidas del diseño experimental fueron sometidas a pruebas sensoriales de las cuales la mayoría fueron rechazadas a pesar de que el recuento en placa fue favorable especialmente para las puras, lo que indica que no todos presentaron características sensoriales adecuadas.
2. Los recuentos de mezclas binarias y ternarias dieron resultados en logaritmos de 10^7 en todos los experimentos, es decir que si se sigue variando el volumen de los cultivos starter el recuento seguirá dando el mismo resultado.
3. Las combinaciones 5 ($\frac{1}{2}$ *Bifidum*, 0 *acidophilus* y $\frac{1}{2}$ *rhamnosus*) y 10 ($\frac{2}{3}$ *Bifidum*, $\frac{1}{6}$ *acidophilus* y $\frac{1}{6}$ *rhamnosus*) reunieron las condiciones requeridas que mejoran la acción probiótica en comparación con los tratamientos puros, es decir que resistieron a un pH ácido de (2,5), un porcentaje de bilis de 2% - 3%, su acción inhibitoria contra patógenos fueron superiores: E.coli 14,3mm, Salmonella 13,7mm y S. aureus 13,7mm (binaria), seguida por la (ternaria): E.coli 12,6mm, Salmonella 13,3mm y S. aureus 12mm , resistieron además una vida de anaquel de 30 días sin aditivos ni conservantes.
4. Se ha logrado optimizar la funcionalidad probiótica y vida de estante de leches fermentadas.

RECOMENDACIONES

El desarrollo del presente trabajo permite realizar la siguiente recomendación para futuros estudios en esta línea de investigación:

1. Realizar estudios *in vivo* debido a que las organizaciones de la salud mundial recomiendan verificar los efectos probióticos con evaluaciones de este tipo y en vista de que en este trabajo únicamente se realizaron pruebas *in vitro*.
2. Realizar estudios con prebióticos debido a que hay fuentes suficientes que fomentan el mejoramiento de los probióticos en simbiosis y su viabilidad por el tracto intestinal.

BIBLIOGRAFÍA

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- **ALVARADO O**, Claudia. **GARCÍA A**, Blanca y **REGALADO G**, Carlos (2003). Bacterias lácticas aisladas de alimentos fermentados mexicanos como inhibidoras de patógenos. Simposio mexicano de probióticos. Mexico
- **AMORES**, R. **CALVO**, A. **MAESTRE**, J.R. **MARTÍNEZ** (2004). Probióticos. *Sociedad Española de quimioterapia*. Vol. 17, 131 – 139
- **BENGMARK**, S. Gil, Á. Control bioecológico y nutricional de la enfermedad: prebióticos, probióticos y simbióticos. (2006). *Nutrición Hospitalaria*. Vol 21. 73 – 86.
- **CORRY**, J. E. L. **CURTIS**, G. D. W; and **BAIRD**, R. M. (2003) Handbook of Culture Media for Food Microbiology. *ELSEVIER SCIENCE B.V.* Vol. 37.
- **CHEN**, H. **HOOVER**, D.G. Bacteriocins and their Food Applications. (2003). *Institute of Food Technologists*. Vol. 2. 82 – 100
- **FLORES**, G. T. (2003). Evaluación de la actividad probiótica in vitro de bacterias ácido lácticas. (pág. 1). México.
- **GIBSON**, Glenn R. **ROBERFROID** and **MARCEL B.** (2008). *Handbook of previotics*. London New York: CRC Press.
- **GONZÁLEZ M**, Blanca E. **GÓMEZ T**, Maribel. (2003). Calidad microbiológica de alimentos y suplementos con probióticos. Bahía de las Islas 3710 Col. Rincón de la Primavera
Monterrey, Nuevo León. Fax: (81) 8359 3651 e-mail bedeliagzz@hotmail.com.
- **HOANG** y **DUNG**. (2004). Lactic Acid Bacteria. Marcel. Dekker, Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology (pág. 1-2). Finland: Editorial board.
- **MILO OHR L**. Products&Technologies. Nutraceuticals& functional foods. *Improving the Gut Feeling*. 2002

- **RODRÍGUEZ** de SAN MIGUEL, V. SANTILLANA, R. MENDOZA, M., RAMÍREZ, R., y AZAOLA, A. y. (2003). Sobrevivencia de *Lactobacillus acidophilus* y *Bifidobacterium lactis* en una leche., (pág. 1). México.
- **RODRÍGUEZ**, V. F., M., R., & y BARBA, D. L. (2003). Identificación de Bacterias Probióticas en un alimento. México.
- **IFIC** Foundation. Calories Count: Balancing the Energy Equation. (2003). *Food Insigth.* 1 – 7
- **LOURENS**, H, A. VILJOEN, B.C. Growth and survival of a probiotic yeast in dairy products. (2001). *ELSEVIEREL.* Vol. 34. 791 – 796.
- **MARTIN DEL MORAL**, A. Moreno – Aliaga, M. J. MartinezHernandez, J. Efectos de los prebióticos sobre el metabolismo lipídico. (2003). *Nutrición Hospitalaria.* Vol 18. 181 – 188.
- **PEÑA**, A. S. (2003). The intestinal microflora in inflammation and motility disorders of the gastrointestinal tract. A role for probiotics. Netherlands.
- **SANDERS**, M.E., MORELLI, L., TOMPKINS, T.A. Sporeformers as Human Probiotics: *Bacillus*, *Sporolactobacillus*, and *Brevibacillus*. (2003). *Comprehensive reviews in food science and food safety.* Vol 2. 101 – 110
- **Tetra Pak Systems** AB. (2003). Preparación de cultivos y starters. En T. P. AB, Manual de Industrias Lácteas (págs. 233 - 240). Lund, Suecia: A. Madrid Vicente, Ediciones.
- **TORRES VITELA**, R. (2003). Investigación en probióticos. Investigación en probióticos, (pág. 1 - 9). México.
- **VARGAS V**, M. L. (2003). Efectos de los probióticos en la absorción de nutrientes y el funcionamiento intestinal de los pacientes en estado crítico. (pág. 1). México.
- **VARGAS VORÁCKOVÁ**, F. (2003). Probióticos y daño hepático. México.

REFERENCIAS ELECTRÓNICAS

- **BEGOÑA M, Marcos.** (2007). *Mejora de la seguridad alimentaria en productos carnicos listos para el consumo mediante la aplicación combinada de tecnologías de conservación emergentes.* (Tesis doctoral, Universidad de Girota). Recuperado de <http://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/7797/tbmm.pdf?sequence=1>.
- **CABEZA HERRERA, Enrique. A.** (2006). Bacterias ácido-lácticas (BAL): aplicaciones como cultivos. Simposio regional de microbiología, (1-11). Recuperado de http://www.academia.edu/992789/Bacterias_acido-lacticas_BAL_aplicaciones_como_cultivos_estarter_para_la_industria_lactea_y_carnica
- **CASTRO B, Luz. Á.; DE ROVETTO, C. M. D** (2006). Probióticos: utilidad clínica. *Colomb. méd.*, 37 (4) 308 - 314. Recuperado de <http://www.bioline.org.br/pdf?rc06060>
- **DEL CAMPO, C. I. M., Gómez, H. E. y Alanís de la O** (2008). Bacterias ácido lácticas con capacidad antagonica y actividad bacteriocinogénica aisladas de quesos frescos. *e-Gnosis*, 6, 1-17. Recuperado de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=73011197005>
- **Medical Technology Company.** (2003). medios en placa listos para usar. *BD*, 1, 2,3. Recuperado de <https://www.bd.com/europe/regulatory/Assets/IFU/HB/CE/PA/ES-PA-255011.pd>
- **COLLADO AMORES, Maria. Carmen.** (2004). *Caracterización de cepas del genero Bifidobacterium con carácter probiótico.* (Tesis doctoral, Universidad Politécnica de Valencia). Recuperado de <http://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/1907/tesisUPV2209.pdf?sequence=1>
- **Codex Alimentarius.** (2005). Directrices para los complementos alimentarios de vitaminas y/o minerales. Autor. Recuperado de [file:///C:/Users/user/Downloads/cxg_055s%20\(1\).pdf](file:///C:/Users/user/Downloads/cxg_055s%20(1).pdf)
- **CRISTÓBAL D, Ruth. L.** (2008). *Lactobacilos productores de bacteriocinas aislados de quesos artesanales provenientes de Lima y provincias.* (Tesis magistral, Universidad nacional mayor de San Marcos). Recuperado de http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/cybertesis/235/1/cristobal_dr.pdf
- **CUETO, V. María. C, Acuña, M. Yudtanduly y Valenzuela, R. Jacqueline** (2010). Evaluación in vitro del potencial probiótico de bacterias ácido lácticas aisladas de suero costeño. *Revista actualidades biológicas.* 32 (93). Recuperado de <http://aprendeenlinea.udea.edu.co/revistas/index.php/actbio/article/viewArticle/13809>

- **DE VRESE**, M. y Schrezenmeir, J. (2008). Probiotics, Prebiotics and Symbiotics. *AdvBiochemEngin/Biotechnol*, 1 - 66. Recuperado de http://link.springer.com/chapter/10.1007/10_2008_097#page-1
- **DEL CAMPO**, R y Baquero, Fernando (2005). Probióticos y alimentos: Un estudio basado en la evidencia. *Revista Española de quimioterapia*, 18 (1), 75 - 78. Recuperado de <http://www.seq.es/seq/0214-3429/18/supp1/75.pdf>
- **ANNICK** Mercenier. Bioscience Department, Head Food & Molecular Microbiology. Nestlé Research Center, P.O. Box 44, CH-1000 Lausanne 26, Suiza. Correo electrónico: annick.mercenier@rdls.nestle.com
- **FAO** alimentación y nutrición. (2002). Informe de grupo de trabajo conjunto FAO/OMS sobre borrador de directrices para la evaluación de los probióticos en los alimentos. Canadá: Autor. Recuperado de <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/009/a0512s/a0512s00.pdf>
- **FRIZZO**, L. S., Soto, L. P., Bertozzi, E., Sequeira, G., Marti, L. E., y Rosmini, M. R. (2006). Evaluación in vitro de las capacidades probióticas microbianas orientadas al diseño de inóculos probióticos multiespecie para ser utilizados en la crianza de terneros. *FAVE Sección Ciencias Veterinarias*, 5(1/2), 69-80. Recuperado de [file:///C:/Users/user/Downloads/1426-3761-1-SM%20\(3\).pdf](file:///C:/Users/user/Downloads/1426-3761-1-SM%20(3).pdf)
- **GARCÍA C**, Yanelys., García Yaneisy., López Anahí y Boucourt R. (2005). Probióticos: una alternativa para mejorar el comportamiento animal. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, Vol 39, 129-140. Recueprado de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=193017845001>
- **RODRÍGUEZ**, Angeles, G. (2002). Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de Escherichiacoli. *Salud pública de México*, 44(5), 464-475. Recuperado de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-36342002000500011
- **GUARNER**, F. (2007). Papel de la flora intestinal en la salud y en la enfermedad. *Nutrición Hospitalaria*, 14 - 19. Recueperado de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=309226723007>
- **GUTIÉRREZ PULIDO**, H., y DE LA VARA SALAZAR, R. (2003). Análisis y diseño de experimentos. Editorial McGraw Hill, México. Recuperado de <http://dspace.ucbscz.edu.bo/dspace/handle/123456789/4879>
- **GUTIÉRREZ**, R. L. (2008). Determinación del potencial bactericida In vitro de un aislado nativo de lactobacilluscasei frente E. coli. *Lasallista de Investigación*, 68-73. Recuperado de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=69550209>

- **HUTKINS**, Robert W. *Microbiology and Technology of Fermented Foods*, (2006). USA: IFT Press. Recuperado de <http://es.scribd.com/doc/23195566/Microbiology-and-Technology-of-Fermented-Foods>
- **INEN**. (2011). Leches fermentadas. Requisitos. Ecuador: Autor. Recuperado de <https://law.resource.org/pub/ec/ibr/ec.nte.2395.2011.pdf>
- **IÑIGUEZ P**, C. y. (2006). Mecanismo de adhesión al tracto intestinal y antagonismo de *Bifidobacterium*. *RESPIN Revista de salud pública y nutrición*. Vol 7, 1-6. Recuperado de <http://new.medigraphic.com/cgi-bin/resumenMain.cgi?IDARTICULO=13250>
- **LORENTE**, B. F., y Serra, J. D. (2001). Alimentos funcionales: probióticos. *Acta Pediatr Espan*, 59(3), 150-5. Recuperado de <http://www.inocua.org/site/Archivos/investigaciones/Alim%20funcional%20probioticos.pdf>
- **LOZADA E**, A. (2001). El potencial de la manipulación de la flora intestinal por medios dietéticos sobre la salud humana. *Asociación Mexicana de Infectología y Microbiología Clínica*, 106 - 114. Recuperado de <http://www.medigraphic.com/pdfs/micro/ei-2001/ei013e.pdf>
- **MADRIGAL**, L., y SANGRONIS, E. (2007). La inulina y derivados como ingredientes claves en alimentos funcionales. *Archivos latinoamericanos de nutrición*, 57(4), 387-396. Recuperado de http://www.alanrevista.org/ediciones/2007-4/la_inulina_derivados_ingredientes_claves_alimentos_funcionales.asp
- **Microbiologics Retail Catalog**: 39 th Edition. (s.f.). *Recommended growth requirements*. Recuperado de <http://www.genlabperu.com/imagenesweb/catalogos/Microbiologics/Microbiologics.pdf>
- **MORENO VILLARES**, J. M. (2006). Flora bacteriana intestinal. *In Anales de pediatría* (Vol. 65 (4), 12-19. Recuperado de <https://medes.com/publication/24642>
- **NAPOLITANO**, H. (28 de 02 de 2013). Diseño de experimentos. Industria y química. *Asociación Química Argentina*. 62-78. Recuperado de <http://www.aqa.org.ar/iyq354/6.pdf>
- **NÚÑEZ M**. (2002). Alimentos probióticos: un proceso largo y complicado. Recuperado de <http://www.diariomedico.com/grandeshist/lacteos2002/dos.html>
- **OHTA**, T. **SHIBATA**, H. **KAWAMORI**, T. **IIMURO**, M. **SUGIMURA**, T y **WAKABAYASHI**, K. (2002). Marked Reduction of *Helicobacter pylori*-Induced Gastritis by Urease Inhibitors, Acetohydroxamic Acid and Flurofamide, in Mongolian

- Gerbils. *Biochemical and biophysical research communications*, 285(3), 728-733. Recuperado de <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006291X01952295>
- **OLAGERO**, G. ABAD, A. BENDERSKY, S. GENEVOIS, C y GRANZELLA, L. (2007). Alimentos funcionales: fibra, prebióticos, probióticos y simbióticos. *DIAETA*, 20 - 31. Recuperado de http://www.fmed.uba.ar/depto/nutrinormal/funcionales_fibra.pdf
 - **Organización mundial de gastroenterología**. (2008). Guías prácticas Probióticos y Prebióticos. España. Recuperado de http://www.worldgastroenterology.org/assets/downloads/es/pdf/guidelines/19_probioticos_prebioticos_es.pdf
 - **PARRA**, H. R. (2010). Bacterias Ácido Lácticas: Papel Funcional en los Alimentos. (Tesis de Maestría Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia). 1 - 10. Recuperado de <http://www.scielo.org.co/pdf/bsaa/v8n1/v8n1a12>
 - **Plusquam + Pharma**. (2013). Flora intestinal. *Plusquam + Pharma*. Recuperado de <http://www.plusquampharma.com/es/areas/salud-del-nino/flora-intestinal>
 - **RAMÍREZ** R, J. C., Rosas U, P., VELÁZQUES G, M y ULLOA, J. A. (2011). Bacterias lácticas: Importancia en alimentos y sus efectos en la salud. *Revista Fuente*, 1-16. Recuperado de <http://fuente.uan.edu.mx/publicaciones/03-07/1.pdf>
 - **RAMÍREZ**, C. M. (2005). *Actividad inhibitoria de cepas de bacterias ácido lácticas frente a bacterias patógenas y deterioradoras de alimentos*. (Tesis de licenciatura, Universidad autónoma del estado de Hidalgo). Recuperado de <http://dgsa.uaeh.edu.mx:8080/bibliotecadigital/bitstream/231104/236/1/Actividad%20inhibitoria%20de%20cepas%20de%20bacterias.pdf>
 - **SAMANIEGO** F, L. M y **SOSA DEL CASTILLO**, M. (2002). *Lactobacillus spp: Importantes promotores de actividad probiótica, antimicrobiana y bioconservadora*. Cuba. Recuperado de <http://www.bibliociencias.cu/gsd/collect/libros/index/assoc/HASH011d/e18c5081.dir/doc.pdf>
 - **SARMIENTO RUBIANO**, L. A. (2006). Alimentos funcionales, una nueva alternativa de alimentación. *Indexación: apenas un hito en el camino*, 10(1), 16. Recuperado de <http://201.234.78.173:8084/publindex/docs/articulos/0121-3709/2/11.pdf>
 - **MALBRÁN**, Carlos G. (2001). Manual de procedimientos para la determinación de la sensibilidad a los antimicrobianos en bacterias aisladas de humanos. *Servicio Antimicrobianos - INEI - ANLIS*. Recuperado de http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/gss/publications/documents/Argentina-LevelII/Manual_procedimientos.pdf

- **SOLIS**, D. A. (2008). Inulina: un prebiótico natural. *Mundo alimentario*, 18-19. Recuperado de http://www.alimentariaonline.com/media/MA023_inulina.pdf
- **Statgraphics**. (2006). DDE – Diseños de Mezclas. Stat Point, Inc. Recuperado de <http://www.statgraphics.net/wp-content/uploads/2011/12/tutoriales/DDE%20-%20Disenos%20de%20Mezclas.pdf>
- **TORRES**, M. E. Relación huésped parasito: flora humana normal. Recuperado de <http://www.educa2.madrid.org/web/educamadrid/principal/files/6046b373-a0b6-4737-8f6b-4553dfefcd53/12.-%20Flora%20humana%20normal.pdf>