



**UNIVERSIDAD DE JAÉN**  
*Facultad de Ciencias Experimentales*

Trabajo Fin de Grado

**Aislamiento de los  
lactobacilos con potencial  
probiótico a partir de  
alimentos fermentados**

**Alumno: María Isabel Jimena Escañuela**

**Julio, 2018**



**UNIVERSIDAD DE JAÉN**  
*Facultad de Ciencias Experimentales*

Trabajo Fin de Grado

# **AISLAMIENTO DE LOS LACTOBACILOS CON POTENCIAL PROBIÓTICO A PARTIR DE ALIMENTOS FERMENTADOS**

**Alumno: María Isabel Jimena Escañuela**

**Julio, 2018**

**Alumno: María Isabel Jimena Escañuela**

## RESUMEN

Los efectos beneficiosos de los alimentos con microorganismos vivos (probióticos) en la salud humana y en la nutrición han sido cada vez más reconocidos por la comunidad científica, ya que desempeñan acciones importantes en las funciones inmunológicas, gastrointestinales y respiratorias.

Los principales microorganismos probióticos utilizados en fermentaciones de productos alimenticios son las bacterias pertenecientes a los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, las cuales son comensales del tracto gastrointestinal del humano.

Para que un microorganismo probiótico añadido a un alimento presente efectos beneficiosos en su hospedador debe permanecer viable y mantener una concentración adecuada. Aunque no existen criterios establecidos en normas estandarizadas a nivel regional y mundial en relación con los niveles de células viables que debe contener un alimento probiótico, el consenso general es que debe oscilar entre  $10^6$ - $10^8$  UFC/ml o gr de alimento.

Los objetivos propuestos en este estudio son: cuantificar y aislar microorganismos probióticos en productos fermentados así como evaluar la tolerancia a pH bajo y la capacidad de supervivencia en presencia de sales biliares de las cepas aisladas de productos fermentados.

Se analizaron 4 muestras de productos fermentados: queso, yogurt de coco, pepinillo y aceitunas. Las muestras se sometieron a pruebas de tolerancia a pH 1,5 y pH 2 durante 30 minutos y pruebas de tolerancia a sales biliares a concentración 1,8% y 3,6%. Posteriormente se realizó un recuento en placas para comparar la viabilidad entre muestras control y las muestras sometidas a éstas condiciones.

Se observó que sólo 3 cepas provenientes de las muestras de queso sobrevivieron en estas condiciones de acidez y a concentraciones de sales biliares de 1,8% y 3,6%. Por tanto, se concluyó que la muestra de queso constituye la mejor matriz para albergar bacterias probióticas; Sin embargo, las 3 muestras restantes (yogurt, pepinillo y aceitunas) no representaron un buen vehículo de probióticos.

**Palabras clave:** Probiótico, *Lactobacillus*, Alimentos fermentados, pH, sales biliares.

## **ABSTRACT**

The beneficial effects of food with living microorganisms (probiotics) on human health and nutrition have been increasingly recognized by the scientific community, since they play important actions in the immunologic functions, Gastrointestinal and respiratory.

The main probiotic microorganisms used in fermentations of additives products are the bacteria belonging to the genera *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*, which are commensals of the human gastrointestinal tract.

For a probiotic Microorganism added to a food to be able to exert beneficial effects on its host, it must remain viable and maintain an adequate concentration. Although there are no criteria established in standardized norms at regional and global levels of viable cells that a probiotic food must contain, the general consensus is that it should range between  $10^6$ - $10^8$  UFC/ml or gr of food.

The objectives proposed in this study are: to quantify and isolate probiotic microorganisms in fermented products as well as to evaluate the tolerance at low pH and the survival capacity in the presence of bile salts of strains isolated from fermented products.

Four samples of fermented products were analyzed: cheese, coconut yogurt, pickle and olives. The samples were tested for tolerance at pH 1.5 and pH 2 for 30 minutes and bile salts at concentrations of 1.8% and 3.6%. Subsequently, a plaque count was performed to compare the viability between control samples and the samples subjected to these conditions.

It was observed that only 3 strains from the cheese samples survived in these conditions of acidity and at bile salt concentration of 1.8% and 3.6%. Therefore, it was concluded that the cheese sample constitutes the best matrix to house probiotic bacteria. However, the remaining three samples (yogurt, pickle and olives) do not represent a good probiotic vehicle.

**Key words:** Probiotic, *Lactobacillus*, fermented foods, pH, bile salts.

## **ÍNDICE:**

<b>Resumen</b>	<b>3</b>
<b>Abstract</b>	<b>4</b>
<b>1 INTRODUCCION</b>	<b>7</b>
<b>1.1 Definición de probióticos</b>	<b>7</b>
<b>1.2. Características de los microorganismos probióticos</b>	<b>8</b>
<b>1.3. Efectos beneficiosos de los probióticos.</b>	<b>9</b>
<b>1.4. Criterios de selección de probióticos.</b>	<b>11</b>
<b>1.5. Probióticos en alimentos fermentados.</b>	<b>12</b>
<b>1.6. Probióticos disponibles en el mercado.</b>	<b>13</b>
<b>1.7. Justificación del estudio de probióticos</b>	<b>15</b>
<b>2. OBJETIVOS DE LA INVESTIGACION</b>	<b>17</b>
<b>3. MATERIALES Y METODOS.</b>	<b>17</b>
<b>3.1. Muestras.</b>	<b>17</b>
<b>3.2. Medios de cultivo.</b>	<b>17</b>
<b>3.2.1 Caldo de Man, Rogosa y Sharpe (MRS).</b>	<b>17</b>
<b>3.3. Fundamento.</b>	<b>18</b>
<b>3.4. Preparación de los medios de cultivo.</b>	<b>19</b>
<b>3.4.1 MRS Agar.</b>	<b>19</b>
<b>3.5. Preparación de la muestra.</b>	<b>19</b>
<b>3.5.1. Preparación de las diluciones de la muestra</b>	<b>20</b>
<b>3.5.2. Recuento estándar en placas</b>	<b>20</b>
<b>3.6. Análisis macroscópico y microscópico de los aislados</b>	<b>21</b>
<b>3.7. Tolerancia de los aislados al pH.</b>	<b>21</b>
<b>3.8. Resistencia de los aislados a las sales biliares</b>	<b>22</b>
<b>4. RESULTADOS.</b>	<b>23</b>
<b>4.1. Determinación de la carga microbiana total de los alimentos analizados</b>	<b>23</b>
<b>4.2. Análisis macroscópico y microscópico de los aislados</b>	<b>24</b>
<b>4.3. Análisis de las propiedades probióticas básicas de los aislados</b>	<b>25</b>
<b>4.3.1. Supervivencia a pH ácido</b>	<b>25</b>
<b>4.3.2 Supervivencia a sales biliares</b>	<b>26</b>

<b>5. DISCUSIÓN</b>	<b>27</b>
<b>6. CONCLUSIONES</b>	<b>35</b>
<b>7. Bibliografía</b>	<b>36</b>

# 1 INTRODUCCIÓN

## 1.1 Definición de probióticos

La palabra probiótico fue utilizada por primera vez por (Lilly y Stillwell, 1965) para referirse a “sustancias secretadas por un microorganismo que estimulan el crecimiento de otro”. Posteriormente, (Parker, 1974) amplió el término y los definió como “organismos y sustancias que contribuyen al balance microbiano intestinal”. Sin embargo, el término ha evolucionado y se ha adecuando a las consideraciones actuales; es así como, una de las definiciones más completas es la propuesta por (Schrezenmeir y Vrese, 2001), en la cual los probióticos se definen como “una preparación de, o un producto conteniendo, unos microorganismos definidos, viables y en suficiente cantidad para alterar la microbiota de un compartimento del huésped y ejercer efectos beneficiosos para la salud de este huésped”.

En 2001, una comisión de expertos internacionales convocados de forma conjunta por la FAO y la OMS definió los probióticos como microorganismos vivos que confieren efecto beneficioso para la salud del hospedador, cuando se administran en cantidad adecuada (Sánchez, Ruiz y Morales, 2015). Las normas de estandarización de la cantidad de probióticos que deben contener los alimentos varían de una región a otra; sin embargo, generalmente un producto probiótico debería contener  $>10^6$ - $10^8$  UFC/gr o  $>10^8$ - $10^{10}$  UFC/dosis de células viables (Champagne et al., 2011). Además, los probióticos son definidos como seguros según el acrónimo inglés "GRAS" ("Generally Recognized As Safe").

Los efectos beneficiosos de los alimentos con microorganismos vivos agregados (probióticos) en la salud humana y en la nutrición han sido cada vez más reconocidos por la comunidad científica (Villanueva, 2015). Investigaciones recientes acerca de las propiedades y funcionalidad de los probióticos en los alimentos señalan que los mismos desempeñan una acción importante en las funciones inmunológicas, gastrointestinales y

respiratorias y podrían tener un efecto significativo en la profilaxis de enfermedades infecciosas en grupos de riesgo, como niños y ancianos (FAO, 2006).

Las principales especies de probióticos que se incorporan en alimentos son bacterias pertenecientes al grupo de bacterias ácido lácticas (BAL), principalmente, los géneros *Lactobacillus*, (bacterias anaerobias facultativas) y *Bifidobacterium* (bacterias anaerobias estrictas). También se utilizan levaduras no patógenas como *Saccharomyces boulardii*, y bacterias no patógenas como *Streptococcus thermophilus* y *Escherichia coli* Nissle 1917 (Riechmann y Álvarez, 2013). Estos microorganismos son utilizados por la industria alimentaria en la elaboración de leche fermentada, queso, encurtidos, yogurt, vino, cerveza, entre otros.

Las BAL son cocos o bacilos Gram positivos, no esporulados, no móviles, anaeróbicos, microaerófilicos o aerotolerantes; oxidasa, catalasa y benzidina negativas; ácido tolerantes citocromo oxidasa negativa, no reducen nitrato a nitrito y producen ácido láctico como único o principal producto de la fermentación de carbohidratos (Carr et al.,2002).

## **1.2. Características de los microorganismos probióticos**

Los microorganismos para ser considerados y utilizados como probióticos deben presentar una serie de características de seguridad, funcionales y tecnológicas, que garanticen su inocuidad, estabilidad y viabilidad tanto en el tracto gastrointestinal como en los procesos de producción.

Dentro de los aspectos de seguridad se incluyen: ser históricamente reconocido como seguro y no patógeno, provenir preferiblemente del intestino humano, aislado de personas sanas, no portar genes transmisibles de resistencia a antibióticos (Nava, 2008; Nejati y Oelschlaeger, 2015; Saarela et al., 2000).



En cuanto a las propiedades funcionales: debe tener capacidad de resistir la acción de los jugos gástricos, tolerar las sales biliares (factor de supervivencia en el intestino delgado), adherirse al epitelio intestinal y persistir en el tracto gastrointestinal, estimular el sistema inmunitario del organismo, potenciar las defensas inmunitarias del huésped, tener actividad antagonista contra patógenos, poseer propiedades antimutagénicas y anticarcinogénicas, resistente a antibióticos, establecer sinergia con la microbiota intestinal y producir sustancias que tengan una acción trófica sobre el epitelio intestinal (Nava, 2008; Saarela et al., 2000).

En relación con los aspectos tecnológicos el microorganismo debe conferir buenas propiedades sensoriales al producto que los contiene, ser resistente a la acción de los fagos, mantener la viabilidad en condiciones de producción de probióticos, poseer estabilidad en el producto y durante el almacenamiento (Saarela et al., 2000).

### **1.3. Efectos beneficiosos de los probióticos**

Numerosos investigadores han señalado que el consumo de alimentos que contienen microorganismos probióticos conlleva una serie de efectos beneficiosos para la salud de los consumidores. Dentro de estos se destacan:

Reducción de la intolerancia a la lactosa: La intolerancia a la lactosa se debe a bajos niveles de  $\beta$ -D-galactosidasa intestinal. La presencia de bacterias probióticas en los alimentos capaces de sintetizar esta enzima e hidrolizar cierta cantidad de lactosa en el intestino, ayuda a mejorar los síntomas de mala absorción de la lactosa (Marquina y Santos, 2009).

Modulación del sistema inmunitario y prevención de alergias: Los probióticos pueden incrementar de producción de anticuerpos, estimular la liberación local de interferón, facilitar el transporte de antígenos y actuar como adyuvantes en el uso de vacunas orales. En cuanto a las reacciones alérgicas

inflamatorias en el intestino, estos microorganismos son capaces de disminuir la inmunogenicidad de los alérgenos por degradación proteolítica, reducir la secreción de mediadores de la inflamación, disminuir la permeabilidad intestinal, aumentar la degradación de antígenos, normalizar la composición de la microbiota intestinal, y aumentar la respuesta de inmunoglobulina A frente a los antígenos (Isolauri et al., 2001).

Prevención de las infecciones urogenitales: Los lactobacilos están presentes de forma natural en el tracto genital femenino. De hecho son los microorganismos dominantes en la microbiota vaginal de mujeres sanas y juegan un papel relevante en la prevención de infecciones urogenitales (Reid y Bruce, 2003). La capacidad de adhesión de los lactobacilos y la producción de ácido láctico, biosurfactantes, bacteriocinas y peróxido de hidrógeno, sustancias tóxicas para los patógenos, podrían prevenir la aparición de infecciones urogenitales y acelerar la recuperación tras una infección (Reid, 2001).

Mejoramiento del valor nutricional de los alimentos: La evaluación de las características nutricionales de leches fermentadas por los lactobacilos indica que presentan menor contenido de lactosa y mayor concentración de aminoácidos libres y ciertas vitaminas, que otros productos fermentados. Se ha documentado que los lactobacilos y bifidobacterias producen ácido fólico, niacina, tiamina, riboflavina, piridoxina y vitamina K (O'Sullivan et al, 1992).

Propiedades antimicrobianas: Las bacterias probióticas producen ácidos orgánicos, antioxidantes y bacteriocinas, sustancias que son inhibidoras de bacterias patógenas en el intestino (Reid, 2001). Estos compuestos pueden reducir el número de células viables, afectar el metabolismo bacteriano y la producción de toxinas.

Reducción del nivel de colesterol sanguíneo: Los probióticos en el intestino contribuyen a disminuir el colesterol sanguíneo utilizándolo para su propio metabolismo o alterando la desconjugación enzimática de las sales biliares, con lo cual disminuyen su reabsorción, por lo que el hígado debe

sintetizar sales biliares a partir del colesterol sanguíneo con la consecuente disminución de los niveles de colesterol en sangre (Sanders, 2000).

Prevención del cáncer de colon Algunos probióticos son capaces de degradar sustancias mutagénicas presentes en el intestino disminuyendo su genotoxicidad, el ácido butírico generado por algunas bacterias inhibe la acción de sustancias tóxicas, como las nitrosaminas y el peróxido de hidrógeno. Estos microorganismos favorecen la proliferación y el recambio de células intestinales, evitando la acumulación de mutaciones, suprimen la proliferación de células procancerosas e incrementan su apoptosis (Wollowski et al., 2001).

#### **1.4. Criterios de selección de probióticos**

Los microorganismos considerados como posibles probióticos deben ser evaluados para verificar su resistencia a las condiciones adversas del ecosistema digestivo y su estabilidad durante los procesos de producción. Dentro de estas pruebas se incluyen:

Estabilidad en el tránsito por el estómago: Es indispensable la realización de pruebas de resistencia a los ácidos y enzimas gástricas, puesto que, el comportamiento de los probióticos varía según la especie en estudio. El tiempo medio de tránsito de un alimento por el estómago es de 90 minutos. Por lo tanto, las pruebas de resistencia “*in vitro*” de microorganismos susceptibles de ser catalogados como probióticos, deben comprobar que son capaces de resistir el pH y el tiempo necesario sin perder su viabilidad (González-Rivas y González-Martínez, 2006; Chou y Weimer, 1999).

Resistencia a las sales biliares: La mayor dificultad a enfrentar por los probióticos en el intestino delgado es la acción bactericida de las sales biliares. Los probióticos deben ser capaces de desconjugar las sales biliares y así inactivar su acción biocida. Para mejorar la resistencia al paso por el tracto digestivo se recomiendan someter a los probióticos a condiciones de estrés subletal, como tratamiento con ácidos o calor, lo cual permite la expresión de

genes de respuesta adaptativa al estrés que los hacen más resistentes (Bezkorovainy, 2001).

Capacidad de adhesión al intestino: La adhesión al epitelio intestinal es un importante criterio para la selección de los probióticos, puesto que, sólo las cepas capaces de adherir podrán efectuar una colonización exitosa y ejercer sus efectos beneficiosos sobre el hospedero. Cuando las cepas probióticas no se adhieren a la mucosa intestinal la concentración de probióticos se diluye hasta niveles insignificantes después de una comida o bebida. Además, la colonización protectora del intestino por microorganismos beneficioso previene la adhesión de patógenos (Salminen, et al., 2005).

Viabilidad durante el procesado y el almacenamiento en refrigeración: Los probióticos deben ser capaces de soportar las condiciones de producción industrial y mantener su viabilidad durante el almacenamiento, en muchas ocasiones en refrigeración o congelación (Stanton, et al., 2005).

### **1.5. Probióticos en alimentos fermentados**

Los alimentos fermentados son productos modificados por la acción enzimática de microorganismos que transforman la materia cruda o tratada térmicamente, mediante un proceso en el cual se incluyen microorganismos específicos y adquieren propiedades sensoriales características en cuanto a sabor, aroma, apariencia visual, textura y consistencia, además de una vida de anaquel y seguridad higiénica mayor (Ramírez et al., 2011).

Los principales microorganismos probióticos utilizados en fermentaciones de productos alimenticios son las bacterias pertenecientes a los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, las cuales son comensales del tracto gastrointestinal del humano (Sanz et al., 2003). Las BAL, además de contribuir en la biopreservación de los alimentos, mejoran las características organolépticas y aumentan su calidad nutritiva. Además, los probióticos son cultivos puros, o mezcla de cultivos de microorganismos vivos, que al ser

consumidos por el hombre y los animales en cantidades adecuadas mejoran su salud. (Villanueva, 2015).

Los yogures y otras leches fermentadas constituyen los principales vehículos para el aporte de probióticos, ya que, además de las propiedades funcionales de las bacterias inoculadas, estos alimentos tienen gran aceptación en los distintos grupos de población y son fáciles de digerir (Sanz et al., 2003). Sin embargo, hoy en día, están siendo incorporando, cada vez más, en otros alimentos como jugos, barras de granola, chocolates, cereales, frutas, vegetales, y carnes (Villanueva, 2015).

### **1.6. Probióticos disponibles en el mercado**

El mercado mundial de los probióticos está en plena expansión y representa una de las mayores tasas de crecimiento dentro del mercado de los alimentos funcionales. Un análisis global acerca del mercado de probióticos estimó un crecimiento anual del 7%, impulsado principalmente por un aumento de petición por parte de los consumidores asiáticos y europeos (Sánchez et al., 2015).

Cada año aumenta el número de nuevos productos con probióticos y, si bien el principal sector asociado al uso de probióticos sigue siendo el de los productos lácteos, los progresos de la microbiología y la tecnología de alimentos están permitiendo la incorporación de estos microorganismos a productos tan variados como jugos, helados, cereales, mayonesa, chocolate y galletas (Cáceres y Gotteland, 2010).

Los microorganismos comúnmente empleados como probióticos se encuentran disponibles comercialmente a través de laboratorios o industrias alimenticias a nivel internacional; así como, en colecciones de cultivos (ATCC, DSM, CRL [CERELA-CONICET]). Algunos ejemplos de estos microorganismos son los siguientes: *Lactobacillus acidophilus* NCFM (Rhone-Poulenc, Estados Unidos), *Lactobacillus reuteri* 106 (BioGaia, Estados Unidos), *Bifidobacterium*

*longum* bb536 (Morinaga Milk Ind. Japón), *Lactobacillus plantarum* 299 (ProViva, Finlandia), *Lactobacillus casei* YIT9018, Shirota, (Yakult, Japón) y *Lactobacillus johnsonii* LJ-1 (Nestlé, Suiza). *Lactobacillus casei* CRL 431 y *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 (CERELA, Argentina), *Lactobacillus reuteri* CRL 1098 (CERELA, Argentina) (Gibson y Fuller, 2000).

Los probióticos lácticos están incluidos en diversos productos lácteos, actualmente en el mercado, tales como (Gibson, 2000) (Cáceres y Gotteland, 2010; Medici et al., 2004) (Olagnero et al., 2007):

Bio-yogurts: Activia Acti regularis (**B. animalis**), Yogurisimo con provitalis (**L. casei** y **B. animalis**), Ser con biopuritos (**B. animalis**), Kaiku (**L. rhamnosus** y **B. animalis spp. lactis**).

Leches fermentadas: Yakult (**L. casei** Shirota), Actimel (**L. casei**), Kefir de leche (**L. casei**, **L. lactis**, **L. delbrueckii**, **L. helveticus**, **L. brevis**, **K. marxianus**, **S. cerevisiae**, **C. incompusca**, **C. maris**), Leche SanCor Bio **L. casei**), Activia (**B. animalis spp Lactis**).

Quesos probióticos: Bioqueso Iloay Vita (**B. bifidum**, **L. acidophilus** y **L. paracasei**)

Se dispone en el mercado de preparados en forma de cápsulas y polvos que incluyen un solo microorganismo o una mezcla de ellos. Dentro de estos productos se encuentran (Cáceres y Gotteland, 2010; Sánchez, 2015):

Medicamentos probióticos como: Casenfilus (**L. acidophilus**), Lacteol (**L. acidophilus**, **L. fermentum**, **L. delbrueckii**).

Suplementos alimenticios como: Floramax (**L. acidophilus**, **L. rhamnosus**, **L. casei**, **L. bulgaricus**, **B. bifidus**, **B. longum**, **S. thermophilus**, **S. faecium**), Lactofilus (**L. acidophilus**), Ultra levura (**Saccharomyces boulardii**).

Complejos de vitaminas con probióticos: Multibionta (**L. acidophilus**, **Bifidobacterium bifidum** y **B. longum**) y Protexin (**Streptococcus**, dos cepas de bifidobacterias y cuatro lactobacilos).

Soluciones de rehidratación oral: Bioralsuero Baby (**Lactobacillus reuteri**).

Fórmulas lácteas infantiles: Nan Pro1/Nam HA (**B animalis spp lactis**), Nam Pro 2 y 3/Nam 2 y 3 (**L. rhamnosus** y **B. longum**).

Probióticos de aplicación vaginal: Gynophilus (**L. casei spp rhamnosus**), Lactonorm (**L. acidophilus**), Muvagin (**L. gasseri**, **L. rhamnosus**).

### 1.7. Justificación del estudio de probióticos

La viabilidad y estabilidad de los probióticos en los alimentos dependen de una variedad de factores relacionados con sus características fisiológicas y las condiciones de producción y almacenamiento; así como también, de la capacidad de la cepa utilizada para resistir las condiciones adversas del ecosistema del tracto gastrointestinal como acidez gástrica, acción de enzimas digestivas y efecto biocida de las sales biliares.

Para que un microorganismo probiótico añadido a un alimento sea capaz de ejercer efectos beneficiosos en su hospedador debe permanecer viable y mantener una concentración adecuada. Aunque no existen criterios establecidos en normas estandarizadas a nivel regional y mundial en relación con los niveles de células viables que debe contener un alimento probiótico, el consenso general es que debe oscilar entre  $10^6$ - $10^8$  UFC/ml o gr de alimento.

Cuando los microorganismos probióticos contenidos en alimentos son sometidos a condiciones de estrés tales como: calor, frío, acidez, baja disponibilidad de agua, cambios de presión osmótica; es posible que la

concentración de células viables disminuya a niveles en los cuales sean inefectivas.

Para verificar si los alimentos contienen la cantidad de microorganismos adecuados se han diseñado técnicas para evaluar los niveles de probióticos en los productos alimenticios. Dentro de estas, el recuento estándar en placas es un método rutinariamente utilizado para tal fin y tiene la ventaja de permitir el conteo de células vivas. Por lo tanto, no solo permite determinar si la concentración de probióticos es adecuada; sino también, si las células son capaces de mantener su viabilidad.

La técnica de recuento estándar en placas se puede utilizar para registrar los niveles de células viables durante el proceso de producción de los alimentos probióticos y durante su permanencia en los anaqueles de los mercados; así como también para medir la dosis propuesta por los fabricantes.

La presencia de microorganismos probióticos en cantidad adecuada en los alimentos no garantiza que sean capaces de provocar efectos beneficiosos sobre el consumidor; por lo tanto, es necesario evaluar la capacidad de los microorganismos de soportar las condiciones adversas del ecosistema del tracto digestivo y puedan alcanzar la diana donde ejercer su función protectora.

En la literatura existe una variedad de técnicas para analizar el potencial probiótico de cepas aisladas de alimentos utilizados como vehículo de probióticos. Las pruebas de laboratorio incluyen: tolerancia al pH, capacidad de supervivencia en presencia de sales biliares, actividad de la enzima hidrolasa de sales biliares, hidrofobicidad de la superficie celular, capacidad de adhesión celular, crecimiento a diferentes temperaturas, crecimiento en medios nutricionalmente deficientes, capacidad inhibitoria sobre microorganismos patógenos, susceptibilidad a los agentes antimicrobianos, entre otras.

Por lo anteriormente expuesto, es necesaria la evaluación de la viabilidad y el análisis del potencial probiótico de las cepas aisladas a partir de diferentes productos fermentados.



## **2. OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN**

- Cuantificar y aislar microorganismos probióticos en productos fermentados.
- Caracterizar morfológicamente los microorganismos probióticos obtenidos de productos fermentados.
- Evaluar la tolerancia al pH de las cepas aisladas de productos fermentados.
- Analizar la capacidad de supervivencia en presencia de sales biliares de las cepas aisladas de productos fermentados.

## **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **3.1. Muestras**

Se analizaron 4 muestras de productos fermentados: queso, yogurt de coco, pepinillo y aceitunas.

### **3.2 Medios de cultivo**

#### *3.2.1 Caldo de Man, Rogosa y Sharpe (MRS)*

Para el análisis de las muestras se utilizó caldo MRS. Este medio fue usado para el cultivo, aislamiento y recuento de lactobacilos y otras bacterias ácido lácticas. (De Man, Rogosa y Sharpe, 1960) (ISO 15214:1998).

### 3.3. Fundamento

El contenido de peptona, extracto de carne, glucosa y extracto de levadura proporcionan la fuente de nitrógeno, carbono, energía y otros nutrientes necesarios para el crecimiento microbiano. El tween 80, magnesio, manganeso y acetato aportan cofactores y pueden inhibir el desarrollo de algunos microorganismos favoreciendo el crecimiento óptimo de los lactobacilos. El citrato de amonio y el pH actúan como agentes inhibidores del crecimiento de la microbiota asociada (De Man, Rogosa y Sharpe 1960) (ISO 15214:1998).

#### Composición (g/l)

Di Amonio Hidrógeno Citrato .....	2g
Extracto de Carne .....	8g
Extracto de Levadura.....	4g
D (+) Glucosa.....	20g
Magnesio Sulfato .....	0,2g
Manganeso (II) Sulfato.....	0,05g
Peptona Bacteriológica .....	10g
Di-Potasio Hidrógeno Fosfato .....	2g
Sodio Acetato .....	5g
Tween 80 .....	1g
pH: .....	6,2 ±0,2

### **3.4. Preparación de los medios de cultivo**

Disolver 6,5 gramos del medio deshidratado en 125 ml de agua destilada.

Dispensar en tubos, a razón de dos ml por tubo. Esterilizar en autoclave a 115°C durante 20 minutos y dejar enfriar a temperatura ambiente. Almacenar a 2-8°C.

#### *3.4.1 MRS Agar*

Preparación:

El agar MRS se preparó a partir del medio deshidratado (Caldo MRS) al cual se le añadió una determinada cantidad de agar.

Suspender 41.6 gramos de caldo base MRS y 14.4 gramos de agar en 800 ml de agua destilada.

Calentar con agitación frecuente y hervir un minuto para disolver completamente el agar.

Esterilizar en autoclave a 115°C durante 20 minutos.

Enfriar el medio, aproximadamente hasta 45-50°C, en Baño de María.

Dispensar asépticamente en placas de Petri y dejar enfriar en cámara fría.

Almacenar de 2-8°C.

### **3.5. Preparación de la muestra**

Las muestras de yogurt de coco, pepinillo, queso y aceitunas se prepararon según el protocolo establecido por (Swanson et al, 2001) el cual se describe brevemente: Se pesan 5 gramos de cada muestra y se añaden en 45 ml de solución salina fisiológica (dilución  $10^{-1}$ ). Luego, se homogeniza con la ayuda de un equipo Stomacher®80 (30 segundos para el yogurt de coco y 120 segundos para queso, pepinillo y aceitunas). A partir de este homogeneizado se preparan diluciones seriadas las cuales se utilizan para los diferentes análisis.

### *3.5.1. Preparación de las diluciones de la muestra*

A partir de la primera dilución ( $10^{-1}$ ) se preparan diluciones seriadas por múltiplo de 10 ( $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ). El procedimiento es el siguiente:

Se transfieren 100  $\mu$ l de la dilución  $10^{-1}$  a un tubo conteniendo 900  $\mu$ l de solución salina fisiológica para obtener la dilución  $10^{-2}$ . Se transfieren 100  $\mu$ l de la dilución  $10^{-2}$  a un tubo conteniendo 900  $\mu$ l de solución salina fisiológica para obtener la dilución  $10^{-3}$ ; y así sucesivamente hasta la dilución  $10^{-6}$ .

### *3.5.2. Recuento estándar en placas*

El recuento en placas se basa en determinar el número de células viables capaces de formar colonias sobre la superficie de un medio sólido, previamente inoculado con una cantidad conocida de muestra e incubado en condiciones ambientales establecidas.

El número de microorganismos se determinó a partir de las diluciones seriadas preparadas para cada muestra ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ). Para ello, se procedió a sembrar por extensión 100  $\mu$ l de cada dilución, por duplicado, en placas de Petri conteniendo agar MRS, se incubó en condiciones de aerobiosis a 37°C durante 24-48 horas. Transcurrido el período de incubación, con la ayuda de un contador de colonias, se procedió a enumerar las colonias en las placas. Para tal fin, se selecciona aquella dilución donde se observan entre 30 y 300 colonias.

El número de unidades formadoras de colonias obtenido en cada placa de la dilución seleccionada, se multiplica por el factor de dilución correspondiente, se promedian los resultados y el valor final se expresa en unidades formadoras de colonia por gramo o ml de muestra (UFC/gr o ml) (Swanson et al., 2001).

### **3.6. Análisis macroscópico y microscópico de los aislados**

Mediante la inspección visual del crecimiento en las placas de agar MRS se observó las características macroscópicas (forma, tamaño, consistencia y pigmentación) de las colonias obtenidas de las diferentes muestras estudiadas. Las colonias obtenidas de cada muestra se seleccionaron y se procedió a su observación microscópica. Para ello, se utilizó la técnica de Gram. Esta coloración diferencial permite observar la morfología microscópica, disposición y afinidad tintorial de las células bacterianas. Con base en la coloración de Gram, las células bacterianas se dividen en dos grandes grupos: bacterias Gram positivas, que se tiñen con cristal violeta y aparecen de color violeta intenso y, Gram negativas, las que se tiñen con safranina y aparecen de color rojo-rosado.

### **3.7. Tolerancia de los aislados al pH**

Principio.

Según la metodología propuesta por Millette et al. (2008), la tolerancia al pH se determina mediante las variaciones del recuento de células viables cuando la muestra se somete a pH 1,5 y pH 2, durante un período de 30 minutos.

Procedimiento.

Para la realización de la prueba se utilizó caldo MRS ajustado, añadiendo HCL, a pH 1,5 y pH 2.

Las colonias seleccionadas a partir de las diferentes muestras de alimentos se cultivaron en caldo MRS y se incubaron en condiciones de aerobiosis a 37°C durante 24 horas. A continuación, se inocularon 40 µl de cultivo bacteriano en 3 tubos: el primero conteniendo 2 ml de caldo MRS (control), el segundo 2 ml de caldo MRS a pH 1,5 y el tercero 2 ml de caldo MRS a pH 2. Tras 30 minutos de incubación a 37°C se realizaron diluciones seriadas por múltiplo de 10 para cada tubo: control, pH 1,5 y pH 2, como se ha descrito arriba. Se realizó un recuento inicial (tiempo 0 minutos) en placas y un

recuento después de 30 minutos de incubación, a 37°C en aerobiosis, de los 3 tubos (control, pH 1,5 y pH 2).

Para el recuento de microorganismos viables al inicio y tras 30 minutos de incubación, se tomaron 100 µl de cada dilución (control, pH 1,5, pH 2) y se inocularon, por triplicado, 3 gotas de cada dilución en una placa de agar MRS. Las placas se incubaron en condiciones de aerobiosis a 37°C por 24 horas. Transcurrido el periodo de incubación se determinó el número de microorganismos viables, el resultado se expresó en UFC/ml de muestra.

El porcentaje de supervivencia se calculó según la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de supervivencia} = \frac{\log UFC N1}{\log UFC N0} \cdot 100$$

Donde N1 representa el total de células viables después del tratamiento y N0 el número inicial de células viables (Bao et al., 2010).

### **3.8. Resistencia de los aislados a las sales biliares**

La resistencia a las sales biliares se determinó según la metodología descrita por Millette et al. (2008), .A partir de las colonias seleccionadas cultivadas en caldo MRS, se procedió a sembrar agar MSR (control) y agar MRS suplementado con 1,8% y 3,6% de sales biliares, respectivamente. Las placas se incubaron en condiciones de aerobiosis a 37°C durante 24-48 horas. Después del período de incubación, el crecimiento bacteriano indica que el microorganismo es resistente a la concentración de sales biliares usada.

Swanson K.M., Petran R.L., Hanlin J.H. (2001) "Culture Methods for Enumeration of Microorganisms". In: Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. 4th ed. Downs F.P. & Ito K. (Eds.) APHA. Washington. 53-67.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Determinación de la carga microbiana total de los alimentos analizados

Tabla 1.  
Recuento de microorganismos en productos fermentados.

Muestra (n=4)	Cantidad (log UFC/gr)
Queso	6,90±0,29
Yogurt de coco	5,75±0,07
Pepinillo	4,30±0,43
Aceitunas	3,40±0,34

En la tabla 1 se observan los resultados de los recuentos estándares de microorganismos obtenidos en las muestras analizadas. Como puede apreciarse, en la muestra de queso se obtuvo un nivel de bacterias considerado como adecuado, puesto que, se encuentra dentro de los límites que debe contener un alimento probiótico ( $6 \log - 8 \log \text{ UFC.g}^{-1}$ ); no así, en las otras muestras, en las cuales el promedio de bacterias está por debajo del nivel mínimo, particularmente en la muestra de aceitunas.

## 4.2. Análisis macroscópico y microscópico de los aislados

Tabla 2  
Características morfológicas de las colonias aisladas de productos fermentados.

Muestra	No de Colonias	Morfología macroscópica	Morfología microscópica
Queso	5	Colonias blancas, pequeñas y redondas	Bacilos Gram positivo
	1	Colonia blanca, grande y redonda	
	1	Colonia blanca, grande y ovalada	
	1	Colonia amarilla, grande y redonda	
	1	Colonia blanca, mediana y redonda	
Yogurt de coco	1	Colonia blanca, grande, redonda y cremosa	Bacilos Gram positivo*
	10	Colonias pequeñas, blancas y redondas	
Pepinillo	2	Colonias blancas, medianas y redondas	Cocos Gram positivo
	2	Colonias blancas, medianas y redondas	Bacilos Gram positivo
Aceitunas	5	Colonias blancas, grandes y redondas	Levaduras

\*: Sólo se observó la morfología microscópica de cinco colonias, ya que el resto no creció al repicarla en agar MRS

La morfología macroscópica y microscópica de las bacterias aisladas a partir de las muestras de queso, yogurt de coco y pepinillo son compatibles con las características de bacterias ácido lácticas; sin embargo, en el caso de la muestra de aceitunas la morfología microscópica indica que se trata de levaduras; por lo tanto, estas colonias no fueron consideradas para el resto de los análisis (tabla 2).



### 4.3. Análisis de las propiedades probióticas básicas de los aislados

#### 4.3.1. Supervivencia a pH ácido

Tabla 3  
Supervivencia de las cepas analizadas según tolerancia al pH durante  
exposición de 30 minutos

Cepas n=3	Recuento final (logUFC/.ml )	Tolerancia pH 1,5		Tolerancia pH 2	
		30 minutos	% de supervivencia	30 minutos	% de supervivencia
Q2	11,07±0,10	6,00±0,2 4	54,20		
Q3	11,18±0,25	0	0	7,43±0,17	66,48
Q4	11,08±0,07	0	0	10,87±0,15	98,07

Fuente:

Cuando las cepas fueron incubadas durante 30 minutos en caldo MRS ajustado a pH 1,5 y pH 2, 11 de ellas no crecieron; solo 3 cepas provenientes de la muestra de queso sobrevivieron en estas condiciones de acidez. De estos microorganismos, Q4 obtuvo el mayor porcentaje de supervivencia a pH 2; sin embargo, no creció a pH 1,5. La cepa Q2 fue la única en mantenerse viable a pH 1,5; no se pudo verificar su tolerancia a pH 2 debido a contaminación de la muestra (tabla 3).

#### 4.3.2 Supervivencia a sales biliares

Tabla 4

Distribución de las cepas analizadas según su crecimiento en sales biliares

Cepas (n=15)	Crecimiento en sales biliares			
	1,8%		3,6%	
	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
Q1-Q10	3	7	3	7
Y7	1	0	1	0
P1-P4	1	3	0	4
Total	5(33%)	10(67%)	4(27%)	11(73%)

El crecimiento de las cepas en estudio en agar MRS suplementado con sales biliares se observa en la tabla 4. Como puede apreciarse, 33% y 27% de las cepas crecieron a concentraciones de sales biliares de 1,8% y 3,6%, respectivamente. Solo 3 cepas (Q3, Q1y Q5) provenientes de la muestra de queso y 1 de la muestra de yogurt toleraron ambas concentraciones de sales biliares.

## 5. DISCUSIÓN

Los beneficios sobre la salud que se atribuye a los alimentos y suplementos nutricionales probióticos ha estimulado el interés de la comunidad científica mundial por la investigación de bacterias con potencial probiótico; es así como, en la actualidad, la literatura sobre el tema abarca la búsqueda de cepas probióticas en una gran variedad de fuentes como: leche y productos lácteos, embutidos, productos cárnicos, jugos de frutas, vegetales, cereales, pescado, aves de corral, entre otros. Además, diversos estudios han enfocado su interés en el potencial probiótico de bacterias de origen humano, principalmente, aisladas del tracto gastrointestinal y/o del tracto genital femenino.

En este estudio, la obtención de cepas para analizar su potencial probiótico se realizó a través de un muestreo que incluyó cuatro alimentos fermentados: queso, yogurt de coco, pepinillo y aceitunas. En vista que, las bacterias probióticas pueden encontrarse en estos productos alimenticios formando comunidades con diversidad de microorganismos, el aislamiento y recuento se realizó en agar MRS, medio de cultivo selectivo, diseñado para el aislamiento y recuento de las BAL. La utilización de este medio de cultivo para el estudio de las BAL también ha sido comunicada por otros autores (Ramírez, 2010; Vázquez et al., 2007; Zamudio y Zabaleta, 2003). El agar MRS provee las condiciones nutricionales necesarias para el aislamiento y mantenimiento de las BAL; además, la presencia de sustancias inhibitoras impide el desarrollo de microorganismos indeseables.

Los resultados de los recuentos de células viables indican que sólo la muestra de queso contenía niveles de microorganismos por encima de  $10^6$  UFC/g, cantidad mínima considerada como adecuada en alimentos probióticos. Según Ramírez (2010) los recuentos altos son recomendados para la formulación de productos que contenga probióticos, ya que se espera que cuando los microorganismos atraviesen la barrera intestinal disminuyan 1 o 2

ciclos logarítmicos, debido a los efectos adversos que pueda causar el pH en la población microbiana, la actividad de las enzimas gástricas y la presencia de sales biliares en el tracto gastrointestinal.

Los hallazgos de esta investigación coinciden con los resultados informados por diversos autores, quienes han evaluado la viabilidad de bacterias probióticas en diferentes tipos de quesos y han encontrado contajes de células viables que oscilan entre  $10^6$  y  $10^8$  UFC/g. Así, un estudio experimental realizado por Daigle et al., (1999) en el cual se inocularon cepas probióticas en muestras de queso cheddar-like producido con leche microfiltrada y fermentada por *Bifidobacterium infantis*; estos quesos se envasaron al vacío y se conservaron a 4°C durante 84 días. Luego, se determinó la viabilidad de las células microbianas, las cuales mostraron supervivencia por encima de  $3 \times 10^6$  UFC/g, cantidad suficiente de microorganismos viables capaces de proporcionar beneficios para la salud; por lo tanto, se consideró a los quesos analizados como una buena alternativa para albergar probióticos.

Contaje de células viable superiores a los obtenidos en esta investigación han sido reportados por diversos investigadores. En un estudio de viabilidad de una cepa probiótica de *Lactobacillus paracasei* añadida a queso semidescremado, se observó que durante el tiempo de maduración (hasta 14 días) y el período de comercialización (hasta 35 días), el recuento de células viables se mantuvo entre 7,87-8,46 log UFC/g (Brite et al., 2011). Ramírez (2010) utilizó agar MRS para el aislamiento y contaje de las BAL y levaduras a partir de productos lácteos artesanales (queso, yogurt y kumis). Los recuentos promedio más altos correspondieron a queso crema (12,7 log UFC/g) y kumis (12,5 log UFC/g); mientras que, para queso paipa y yogurt los niveles de la población microbiana oscilaron entre 8,2-8,4 log UFC/g.

Martin et al., (2008) aislaron y analizaron los niveles de las BAL en 35 muestras de 4 tipos de queso fresco, los recuentos de UFC/g fueron de 12,7 log para el queso crema doble y 12,5 log para kumis. Para el queso paipa y yogurt, los contajes fueron más bajos y oscilaron entre 8,2-8,4 log UFC/g de

muestra. Además, Marrón et al., (2013) evaluaron muestras de queso fresco que se consumen en Jalisco, México y detectaron niveles de BAL que oscilaron entre 6,97 y 7,20 log UFC/g.

El queso ofrece ciertas ventajas como vehículo de transporte de microorganismos probióticos por tener un pH más alto que otros productos lácteos como yogurt, una matriz más compacta, con menos oxígeno y un mayor contenido de grasa que puede ofrecer protección a las bacterias probióticas durante su paso a través del tracto gastrointestinal. Se han incorporado bacterias probióticas en diferentes variedades de queso logrando la viabilidad de estos microorganismos por distintos tiempos, con diferentes características sensoriales y funcionales en el producto. En este sentido, los quesos frescos son excelentes para la inclusión de probióticos; puesto que, la elaboración de estos productos no implica maduración y en general poseen bajo a moderado contenido de sal. El almacenamiento se hace a temperatura de refrigeración y la vida útil es relativamente corta y corresponde al tiempo en el que se espera el probiótico se mantenga viable (de 2 semanas a unos pocos meses) (Brito et al., 2011; Vinderola, 2014).

En relación con la muestra de yogurt de coco, aunque las leches fermentadas son ampliamente recomendadas como productos para albergar microorganismos probióticos, los niveles de la población bacteriana estuvieron por debajo del valor mínimo recomendado, ya que oscilaron entre  $5 \cdot 10^5$  y  $6,2 \cdot 10^5$  UFC/ml.

Otros estudios coinciden con los hallazgos de esta investigación. Así, Vallejo y Toro (2002) evaluaron muestras de yogurt con probiótico, cuyo etiquetado indicaba que el número de bacterias vivas al momento del envasado era de  $10^9$  UFC/ml; sin embargo, el recuento de células viables varió entre  $10^4$ - $10^5$  UFC/ml.

Los resultados de este estudio son contrarios a los comunicados por otros autores, quienes analizaron la estabilidad y el comportamiento del microorganismo probiótico *Lactobacillus casei* añadido a especímenes de

yogurt en diferentes etapas de la producción. Como resultado se encontró que *L. casei* no afectó las características organolépticas del producto y se mantuvo viable en poblaciones de más de  $10^8$  UFC/ml durante los 21 días de almacenamiento a una temperatura de 4°C, cantidad adecuada de células para definir las formulaciones como probióticos (Bandiera et al., 2013). Similarmente, Kristo et al., (2003) produjeron leche fermentada con el probiótico *Lactobacillus paracasei*, cultivadas conjuntamente con *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus*. Los autores encontraron que las poblaciones de *L. paracasei* permanecieron con contajes de  $10^6$  UFC/ml durante los 21 días de almacenamiento a 4°C.

Es posible inferir que la muestra de yogurt de coco analizada en este estudio, fue sometida a condiciones de almacenamiento inadecuadas que pudieron afectar el nivel de células viables. Además, es necesario considerar que, mientras más cercano es el análisis a la fecha de caducidad, más bajo debe resultar el contaje de células viables. Por tal motivo, es recomendable realizar varios recuentos desde la fecha de envasado hasta los días más cercanos a la fecha de vencimiento, a objeto de evaluar si los recuentos de microorganismos probióticos se mantienen estables y en cantidad suficientemente elevada como para garantizar su supervivencia en las condiciones adversas del tracto gastrointestinal y al ser ingeridos proporcionen efectos beneficiosos a la salud del consumidor.

Nighswonger et al., (1999) evaluaron muestras de mantequilla y yogurt conteniendo cepas probióticas de *Lactobacillus*. Los resultados de la investigación arrojaron pérdida de la viabilidad microbiana durante el tiempo de almacenamiento y en algunas muestras esta disminución fue realmente significativa. Es posible que la producción de ácido acético, otros ácidos orgánicos, compuestos inhibitorios como peróxido de hidrógeno influyan en la supervivencia de algunos probióticos en derivados lácteos.

Zapata et al., (2015) evaluaron el efecto del almacenamiento durante 0, 8 y 16 días en las propiedades probióticas de yogurt saborizado con Mortiño (*Vaccinium meridionale Sw*). Aunque los resultados indican que durante el

muestreo se mantuvo un conteo mínimo de  $10^6$  UFC/ml hasta después de 16 días de almacenamiento, se observó una disminución significativa entre el recuento microbiano el día 8, pero luego un leve incremento para el día 16. No obstante, existe una notable variabilidad en los resultados de los estudios de viabilidad de probióticos en yogurt. Es así como, Ranadheera et al, (2012) reportaron una disminución, mientras que Guler y Akin (2007), mostraron un incremento seguido de un descenso.

La viabilidad de bacterias probióticas en leches fermentadas como yogurt depende de numerosos factores, tales como: las características metabólicas de la cepa probiótica, la forma de inoculación, el proceso de fabricación, el pH final y la composición química de la matriz, las interacciones con bacterias lácticas acidificantes, las condiciones de temperatura durante el almacenamiento y el tipo de empaque, puesto que los recipientes plásticos mejoran la viabilidad facilitando la difusión de oxígeno en comparación con otros materiales como el acero. De esta variedad de factores, el pH final del producto y el fenómeno de post-acidificación durante la vida en los anaqueles, debido a la producción de ácido láctico y otros ácidos orgánicos, han sido señalados como las principales causas de pérdida de viabilidad de bacterias probióticas en leches fermentadas (Rahadheera et al.,2012; Vinderola, 2014).

Una vez realizado el recuento de células viables, se procedió a seleccionar colonias de las muestras de quesos, yogurt de coco, aceitunas y pepinillo, las cuales fueron purificadas mediante aislamiento por agotamiento del inóculo en placas de agar MRS, se observó las características morfológicas macroscópicas y microscópicas; además se evaluó el potencial probiótico de las colonias identificadas de forma preliminar como BAL, mediante la prueba de tolerancia al pH y la supervivencia en presencia de sales biliares.

En esta investigación, las cepas seleccionadas presentaron variaciones en cuanto a la morfología colonial, siendo la mayoría colonias blancas, redondas de tamaño variable; además, la mayor diversidad morfológica se observó en las colonias obtenidas de las cepas aisladas de la muestra de queso. La observación microscópica indicó que la mayoría correspondían a

bacilos Gram positivos; características compatibles con miembros del grupo de BAL.

Bazán y Vargas (2007) utilizaron como fuente de obtención de BAL, particularmente *Lactobacillus*, muestras de queso, leche y yogurt. Estos investigadores observaron que aunque todas las muestras presentaron colonias características de *Lactobacillus*, en el queso hubo un mejor desarrollo de estas colonias.

En un estudio realizado por Seseña (2005) en el cual evaluó muestras de berenjena fermentada, observó que la morfología celular de los aislamientos utilizando la tinción de Gram era variable. La mayoría aparecían como bacilos rectos, en parejas y/o cadenas cortas, algunos eran cocobacilos y otras mezcla de bacilos cortos y largos de pequeño grosor. La morfología colonial en agar MRS fue también diversa, observándose algunas colonias de color blanco intenso, convexas y sin brillo; y otras de color crema, planas y brillantes. Unos pocos aislados produjeron colonias blancas, granuladas, de borde ligeramente irregular y umbonadas.

Por otra parte, López (2010) evaluó la presencia de probióticos a partir de muestras de leche de cabra, suero de queso y jocogue (producto lácteo fermentado), utilizó agar MRS para el aislamiento, purificación y observación de la morfología colonial; y la tinción de Gram para la visualización de la morfología celular. La mayoría de las colonias aisladas eran blancas, de bordes enteros, circulares y de tamaño pequeño. Al microscopio se visualizaron bacilo largos y cocos Gram positivos. Además, para la identificación presuntiva de las cepas con morfología macroscópica y microscópica típicas de las BAL se incluyó la prueba de catalasa.

Ramírez (2010) utilizó el agar MRS para el aislamiento y purificación de microorganismos a partir de muestras de productos lácteos artesanales (queso, yogurt y kumis). Observó la presencia de dos tipos de organismos; el primero correspondió a bacilos Gram positivos, algunos alargados y otros más cortos, la morfología macroscópica resultó ser similar y en su mayoría fueron colonias



pequeñas de color blanco grisáceo. El segundo tipo mostró morfología microscópica de levaduras, con morfotipo colonial característico de este tipo de hongos microscópicos, es decir, colonias grandes y cremosas.

La supervivencia de los probióticos en el tracto gastrointestinal depende en gran parte de su capacidad de tolerar la acidez estomacal y la actividad bactericida de la bilis secretada por el duodeno. Por tanto, es esencial que el microorganismo supere la acidez gástrica y colonice el intestino delgado, para poder garantizar sus efectos beneficiosos sobre el hospedador. Es deseable que una cepa con potencial probiótico tolere al menos un pH de 3, puesto que el pH del estómago puede alcanzar valores de 1-2. (Fang, 2016) La resistencia a las sales biliares está relacionada con la actividad de la enzima hidrolasa de sales biliares presente en la célula bacteriana, la cual hidroliza las sales biliares reduciendo su toxicidad (Bae et al., 2010).

Las investigaciones realizadas a nivel mundial con el propósito de evaluar el potencial probiótico de cepas aisladas de diferentes fuentes abarcan una serie de ensayos *in vitro*, dentro de los cuales se incluyen la tolerancia al pH y la supervivencia en presencia de sales biliares. Sin embargo, se debe ser cuidadoso cuando se seleccionan cepas probióticas de acuerdo con estos dos parámetros, puesto que, no existe una metodología estándar para la evaluación de los mismos, debido a que los resultados son muy variables y dependen en gran medida de las propiedades de la cepa analizada.

En relación con la capacidad de resistir las condiciones de pH, los resultados de esta investigación demuestran que sólo el 14,28% (2/14) de las cepas evaluadas fueron capaces de tolerar la exposición a pH 2 tras 30 min de incubación. Es importante señalar que la cepa Q4 mantuvo un nivel de supervivencia muy elevado 98% y un recuento de células viables muy similar al valor inicial del control; en contraste con la cepa Q3 cuyo porcentaje de supervivencia fue de 66% y el recuento de viables disminuyó 4 ciclos logarítmicos. Algunos autores han señalado que es deseable que la pérdida de viabilidad de las células probióticas no exceda los 2 ciclos logarítmicos en condiciones de pH similares a las encontradas en el tracto gastrointestinal, a fin

de garantizar que pueda sobrevivir durante su tránsito por el estómago y mantenerse viable hasta alcanzar la diana donde ejerce sus efectos protectores.

La incubación a pH 1,5 durante 30 minutos afectó notablemente la viabilidad de las cepas; de tal modo que, solo la cepa Q2 de las 14 evaluadas (7,14%) fue capaz de resistir ese nivel de acidez. Se observó que la supervivencia fue de 54%, lo que correspondió a un descenso de la población bacteriana de 5 ciclos logarítmicos.

Los hallazgos de este estudio son comparables con los encontrados por Vázquez et al. (2007), quienes evaluaron la tolerancia de la exposición a pH 1,9 durante 30 minutos y comunicaron una disminución de la concentración celular de 90% en comparación con un valor control a pH 6,1. No obstante, contrastan con la investigación realizada por Cueto y Aragón (2012) en la cual se incubaron un grupo de cepas de *Lactobacillus* aisladas de suero costeño a pH 2 por un tiempo de 2 horas y reportaron que el 54% de los aislamientos conservó su viabilidad en dichas condiciones.

Además de la tolerancia a pH bajo, las cepas susceptibles de ser consideradas como probióticos deben resistir el efecto bactericida de las sales biliares. En este estudio, el 33% de las cepas crecieron a una concentración de sales biliares de 1,8%; mientras que, 27% mantuvieron su viabilidad a 3,6%. Otros autores, Vázquez et al. (2007), Cueto y Aragón (2012), evaluaron el comportamiento de las BAL incubadas en medios de cultivo suplementados con concentraciones de sales biliares entre 0,3% y 0,5% y encontraron porcentajes de supervivencia de 60% o más.

Cuando se analiza en conjunto el comportamiento de las cepas a diferentes pH y concentraciones de sales biliares, se puede observar que sólo la cepa Q3 creció a ambas concentraciones de sales biliares y toleró la exposición a pH 2 por 30 minutos, manteniendo una supervivencia de 66% y un descenso del recuento de viables de 4 ciclos logarítmicos.

Las cepas Q1, Q5 y Y7, resistieron la incubación por 24 horas a las concentraciones de sales biliares a que fueron sometidas; sin embargo, no sobrevivieron a pH 2 por 30 minutos. Por otra parte, la cepa Q2 resistió la incubación a pH 1,5 por 30 minutos, pero no creció en presencia de sales biliares. Por tal motivo, estas cepas no representan buenas opciones como probióticos de acuerdo con los criterios evaluados en este estudio.

## **6. CONCLUSIONES**

La muestra de queso fue el producto fermentado donde se encontró el mayor recuento de células viables, por lo que constituye la mejor matriz para albergar bacterias probióticas.

La muestra de yogurt de coco analizada no representa una buena opción para transportar probióticos, puesto que, el contaje de células viables obtenido, no garantiza que este alimento fermentado pueda mantener una concentración apropiada de microorganismos capaces de ejercer sus efectos protectores sobre la salud del consumidor.

La valoración del potencial probiótico de las cepas aisladas utilizando la tolerancia al pH y la supervivencia en presencia de sales biliares como criterios de selección, permitió determinar que la cepa Q3, proveniente de la muestra de queso, puede ser considerada una buena candidata como probiótico. Sin embargo, es necesario completar su identificación fenotípica y molecular; así como, realizar otros ensayos *in vitro* e *in vivo* que permitan complementar el estudio del potencial probiótico de esta cepa.

En vista que la cepa Q2 fue capaz de crecer en condiciones de alto grado de acidez (pH 1,5), mas no mantuvo su viabilidad en presencia de las concentraciones de sales biliares ensayadas en este estudio, se recomienda evaluar la capacidad de esta cepa de crecer a 0,3% de sales biliares, lo cual representa la máxima concentración encontrada en el tracto gastrointestinal.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

Lilly, D., y Stillwell, R. (1965). Growth promoting factors produced by microorganisms. *Science*, 147, 747-748.

Parker, R. (1974). Probiotics, the other half of the antibiotic story. *Anim Nutr Health*, 29; 4-8.

Schrezenmeir, J., y Vrese M. (2001). Probiotics, prebiotics and synbiotics-approaching a definition. *Am J Clin Nutr*, 73, 361S-364S.

Sánchez, M., Ruiz, M., y Morales, M. (2015). Microorganismos probióticos y salud. *Ars Pharm*, 56(1), 45-59.

Champagne, C., Ross, R., Saarela, M., y Hansen, K., y Charalampopoulos D. (2011). Recommendations for the viability assessment of probiotics as concentrated cultures and in food matrices. *Int J Food Microbiol*, 149, 185-193.

Villanueva, R. (2015). Probióticos: una alternativa para la industria de alimentos. *Ingeniería Industrial*, 33, 265-275.

FAO. (2006). Probióticos. Recuperado de: <http://www.fao.org/food/foodsafety-quality/a-z-index/probiotics/es/>.

Riechmann, R., y Álvarez G. (2013). Empleo de probióticos y prebióticos en Pediatría. *Nutr Hosp*, 28 (Supl 1), 42S-45S.

Carr, F., Chill, D., y Maida, N. (2002). The lactic acid bacteria: A literature survey. *Crit Rev Microbiol*, 28(4), 281-370.

Nava, J. (2008). Evaluación de Bacterias Ácido Lácticas Comercializadas como Probióticas. Universidad de los Andes. Departamento de Biología. Mérida-Colombia. 15-16.

Nejati, F., y Oelschlaeger T. (2015). In vitro characterization of *Lactococcus lactis* strains isolated from iranian traditional dairy products as a potential probiotic. *Appl Food Biotechnol*, 3(1), 43-51.

Saarela, M., Mogensen, G., Fondén, R., Mättö, J., y .Mattila, T. (2000). Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *J Biotechnol*, 84, 197-205.

Marquina, D., y Santos, A. (2009, 30 de agosto) Probióticos, prebióticos y salud. Actualidad. Recuperado de [http://www.cib.csic.es/sem/Actualidad/SEM32\\_24.pdf](http://www.cib.csic.es/sem/Actualidad/SEM32_24.pdf).

Isolauri, E., Sütas, Y., Kankaanpää, P., Arvilommi, H., y Salminen, S. (2001). Probiotics: effects on immunity. *Am J Clin Nutr*, 73, 444S-450S.

Reid, G., y Bruce, A. (2003). Urogenital infections in women: can probiotics help? *Postgrad Med J*, 79, 428-132.

Reid, G. (2001). Probiotic agents to protect the urogenital tract against infection. *Am J Clin Nutr*, 73, 437S-443S.

O'Sullivan, M., Thorton, G., O'Sullivan, G., y Collins, J. (1992). Probiotic bacteria: myth or reality. *Trends Food Sci. Technol*, 3, 309-314.

Sanders, M. (2000). [Considerations for use of probiotic bacteria to modulate human health](#). *J Nutr*, 130, 384S-390S.

Wollowski, I., Rechkemmer, G., y Pool, B. (2001). Protective role of probiotics and prebiotics in colon cancer. *Am J Clin Nutr*, 73, 451S-455S.

González-Rivas F., y González-Martínez, B. (2006). Criterios de calidad de los microorganismos probióticos y evidencias sobre efectos hipocolesterolémicos.

RESPYN, 7(1). Recuperado de:  
<http://respyn.uanl.mx/index.php/respyn/article/view/162/144>.

Chou, L., y Weimer, B. (1999). Isolation and characterization of acid-and bile-tolerant isolates from strains of *Lactobacillus acidophilus*. *J Dairy Sci*, 82, 23-31.

Bezkorovainy, A. (2001). Probiotics: determinants of survival and growth in the gut. *Am J Clin Nutr*, 73(suppl), 399-405.

Salminen, S., Gueimonde, M., y Isolauri, E. (2005). Probiotics that modify disease risk. *J Nutr*, 135, 1294-1298.

Stanton, C., Ross, P., Fitzgerald G., y Van Sinderen, D. (2005). Fermented functional foods based on probiotics and their biogenic metabolites. *Curr Opin Biotechnol*, 16, 198-203.

Ramírez, J., Ulloa. P., Velázquez, M.; Ulloa J., y Romero, F. (2011). Bacterias lácticas: Importancia en alimentos y sus efectos en la salud. *Revista Fuente*, 7. Recuperado de: <http://fuente.uan.edu.mx/publicaciones/03-07/1.pdf>.

Sanz, Y., Collado, M., y Dalmau, J. (2003). Probióticos: criterios de Probióticos y orientaciones para el consumo. *Acta Pediátrica Española*, 61(9), 476-482.

Cáceres, P., y Gotteland R. (2010). Alimentos probióticos en Chile: ¿qué cepas y qué propiedades saludables? *Rev Chil Nutr*, 37(1), 97-109.

Gibson, G., y Fuller, R. (2000). Aspects of in vitro and in vivo research approaches directed toward identifying probiotics and prebiotics for human use. *J Nutr*, 130 (2S Suppl), 391S-395S.

Medici, M., Vinderola, C., y Perdigón, G. (2004). Gut mucosal immunostimulation by probiotic fresh cheese. *Int. Dairy J*, 14, 611-618.

Olagnero, G., Abad, A., Bendersky, S., Genevois, C., Granzella, L., y Montonati, M. (2007). Alimentos funcionales: fibra, prebióticos, probióticos y simbióticos. DIAETA (B. Aires), 25(121), 20-33.

De Man, J., Rogosa, M., y Sharpe, M., E. (1960). A Medium for the cultivation of *Lactobacilli*. J Appl Bact, 23,130-135.

ISO International Standardisation Organisation. (1998) Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of mesophilic lactic acid bacteria - Colony-count technique at 30°C. ISO 15212:1998.

Bao, Y., Zhang, Y., Liu, Y., Wang, S., Dong, X, Wang, Y., Zhang, H. (2010). Screening of potential probiotic properties of *Lactobacillus fermentum* isolated from traditional dairy products. Food Control, 21(5), 695-701.

Vázquez, S., Lopretti, M., Rey, F., Zunino, P. (2007). Aislamiento y caracterización de cepas nativas de *Lactobacillus spp.* para su uso como probióticos en la industria láctea. Publicación anual del Laboratorio Tecnológico del Uruguay, 2, 12-14. Recuperado de <https://www.researchgate.net/publication/279483818>.

Zamudio, K., y Zabaleta, A. (2003). Estudio del potencial probiótico de lactobacilos aislados de fuentes naturales. Ciencia e Investigación, 6(1), 30-35.

Ramírez, F. (2010). Aislamiento de bacterias *Lactobacillus sp* y Levaduras a partir de productos lácteos artesanales y evaluación de la capacidad antagónica *in vitro*. (Tesis de grado). Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia.

Daigle, A., D. Roy, D., Bélanger, G., Vuilleumard, J. (1999). Production of probiotic cheese (cheddar-like cheese) using enriched cream fermented by *Bifidobacterium infantis*. J Dairy Sci, 82(6), 1081-1091.

Brito, C., Navarrete, C., M., Schöbitz, R., Horzella, M. (2011). Viabilidad y efectos del probiótico *Lactobacillus paracasei ssp paracasei* en queso gauda semidescremado chileno. ALAN, 61(4), 414-422.

Vinderola, G. (2014). Bacterias probióticas en productos lácteos fermentados. Anales Acad. Nac. De Cs. Ex., Fis y Nat, 66, 5-21.

Martín, C., Gómez, H., Alaníz, R. (2008). Bacterias ácido lácticas con capacidad antagónica y actividad bacteriocinogénica aisladas de quesos frescos. e-Gnosis, 6, 1-17. Recuperado de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=73011197005>

Marrón, I., Flores, J., De la Torre, A., Del Toro, C., Guerrero, P, Gutiérrez, M. (Abril de 2013). Sanitary quality, physicochemical and lactic acid bacteria in fresh cheese in the Ciénaga región of Jalisco. Ponencia presentada en el 6<sup>th</sup> International Symposium on Probiotics, Ciudad de México, México. Recuperado de <https://www.researchgate.net/publication/304540263>

Vallejo, F., y Toro, M. (2002). Análisis microbiológico en yogurt con probióticos. Boletín Micológico. 17, 15-19.

Bandiera, N., Carneiro, I., Santana, A., Honjoya, E., Walter, E., Aragon, L., Batista, C. (2013) Viability of probiotic *Lactobacillus casei* in yoghurt: defining the best processing step to its addition. ALAN, 63(1), 58-63.

Kristo, E., Biliaderis, C., y Tzanetakis, N. (2003). Modelling of rheological, microbiological and acidification properties of a fermented milk product containing a probiotic strain of *Lactobacillus paracasei*. Int Dairy J, 13, 517-28.

Nighswonger, B.; Brashears, M. & Guillard, S. (1996). Viability of *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* in fermented milk products during refrigerated storage. J. Dairy Sci. 79:212-219.

Zapata, I., Sepúlveda, U., y Rojano, B. (2015). Efecto del Tiempo de Almacenamiento sobre las Propiedades Fisicoquímicas, Probióticas y



Antioxidantes de Yogurt con Mortiño (*Vaccinium meridionale* Sw). Información Tecnológica, 26(2), 17-28.

Ranadheera, C., Evans, C., Adams, M., y Baines, S. (2012). Probiotic viability and physico-chemical and sensory properties of plain and stirred fruit yogurts made from goat's milk. Food Chemistry, 135, 1411-1418.

Guler, M., y Akin, M. (2007). Effects of cysteine and different incubation temperatures on the microflora, chemical composition and sensory characteristics of bio- yogurts made from goat's milk. Food Chemistry, 100(2), 788-793.

Bazán, J., y Vargas, C. (2007). Aislamiento de *Lactobacillus* nativos de productos de fermentación en la Ciudad de Tacna. Ciencia y desarrollo, 11, 61-66.

Seseña, S. (2005). Caracterización tecnológica de cepas autóctonas y selección de cultivos iniciadores para la fermentación de berenjena de Almagro (Tesis Doctoral). Universidad de Castilla-La Mancha. Toledo, España.

López, C (2010). Aislamiento e identificación de microorganismos probióticos a partir de leche de cabra y sus derivados (Tesis de pregrado). Universidad Autónoma Agraria "Antonio Navarro". Coahuila, México.

Fang, J. (2016). Caracterización de bacterias lácticas en subproductos industriales de piña (*Anana cosmosus* L. Merr) y determinación de su capacidad de potencial probiótico en jugo de piña. (Trabajo de grado). Universidad de Costa Rica. Costa Rica.

Cueto, C., y Aragón, S. (2012). Evaluación del potencial probiótico de bacterias ácido lácticas para reducir el colesterol *in vitro*. Scientia Agrop

