

**UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA**



Universidad de El Salvador
Hacia la libertad por la cultura

OBTENCION DE UN YOGURT NATURAL UTILIZANDO UNA MEZCLA DE PROBIOTICOS ABY-3, LECHE DE CABRA COMO SUSTRATO Y CONTROL DE LA SOBREVIVENCIA DE LA CEPA *Salmonella choleraesuis* ATCC 10708.

TRABAJO DE GRADUACION PRESENTADO POR

LEONEL AMILCAR BERMUDEZ LUNA

BRENDA MARITZA PINEDA PINEDA

PARA OPTAR AL GRADO DE

LICENCIADO(A) EN QUIMICA Y FARMACIA

JUNIO, 2015

SAN SALVADOR, EL SALVADOR, CENTRO AMERICA

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

RECTOR

ING. MARIO ROBERTO NIETO LOVO

SECRETARIA GENERAL

DRA. ANA LETICIA ZA VALETA DE AMAYA

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA

DECANA

LICDA. ANABEL DE LOURDES AYALA DE SORIANO

SECRETARIO

LIC. FRANCISCO REMBERTO MIXCO LOPEZ

DIRECCION DE PROCESO DE GRADUACION

Licda. María Concepción Odette Rauda Acevedo

TRIBUNAL CALIFICADOR

COORDINADORA DE AREA DE: MICROBIOLOGIA

MSc. Amy Elieth Morán Rodríguez

**COORDINADORA DE AREA DE CONTROL DE CALIDAD DE
PRODUCTOS FARMACEUTICOS Y COSMETICOS**

MSc. Rocío Ruano de Sandoval

DOCENTES ASESORAS

MSc. María Evelyn Sánchez de Ramos

MSc. Coralía de los Ángeles González de Díaz

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a Dios por darnos la valentía y la fuerza para ser perseverantes a pesar de las dificultades y por permitir alcanzar la meta final para lograr nuestra graduación.

Agradecemos a nuestras asesoras MSc. Evelyn de Ramos y MSc. Coralia de Díaz, por estar siempre pendientes de los avances, por su dedicación al revisar el trabajo, además de guiarnos y apoyarnos en el proceso.

A MSc. Amy Morán, por ser una guía en la parte experimental y por comprender el limitado tiempo del que disponíamos, su amabilidad al mostrarnos cualquier observación. Además de agradecer a CENSALUD por permitirnos el uso de las instalaciones, equipos y sobre todo por proporcionar parte de los medios necesitados para el análisis, su apoyo fue fundamental para el desarrollo del trabajo.

A Licda. María Concepción Odette Rauda Acevedo y MSc. Rocío Ruano por su amabilidad y comprensión en las correcciones y orientación durante el desarrollo de esta investigación.

A nuestra secretaria de trabajos de graduación, Ana Elizabeth Herrera por su amabilidad y comprensión al explicarnos cada proceso a seguir durante todo el trabajo de graduación.

Y finalmente pero no por eso menos importante agradecemos enormemente el apoyo incondicional, la comprensión, el entusiasmo y la entrega de nuestros padres y familiares a través de todo el trabajo de graduación.

Leonel Bermúdez y Brenda Pineda.

DEDICATORIA

Dedico mi esfuerzo en este trabajo a Dios por permitirme vivir esta experiencia para volverme un ser mas fuerte, capaz y consiente de la vida.

Dedicarlo tambien a mi madre Maritza de Pineda por su apoyo, entusiasmo y entrega a esta lucha que sin duda fue la de ella tambien. A mi padre Alcides Pineda por su apoyo durante toda mi vida estudiantil, por creer siempre en mi y por ser un ejemplo de perseverancia.

Tambien a mi abuela María Lilian Pineda, por su cantidad y calidad de oraciones durante todo el proceso.

Sin dejar de lado a mis hermanos, primos y tios, por estar siempre pendiente de mi, brindarme su ayuda y apoyo cada vez que lo necesite.

Ademas agradecer a Leo, por su valentía y coraje, por su comprensión y también por su disgusto ya que de alguna u otra forma todo eso contribuyó a salir adelante con el trabajo.

Doy gracias finalmente a los amigos que estuvieron pendientes y ofrecieron algun tipo de ayuda para la finalización de esto, tambien quiero agradecer a todas las personas que he conocido fuera de la universidad que me han dado una visión diferente y madura de la vida.

“Si Dios nos permitiese progresar por nuestra vida sin obstáculos, nos convertiría en parasitos”

Brenda Maritza Pineda Pineda.

DEDICATORIA

Este trabajo de graduación es un fruto del apoyo incondicional y la infinita misericordia de ti mi Dios, que siempre has estado ahí brindándome las oportunidades, las fuerzas y la sabiduría necesaria para seguir adelante.

A mi madre Dinora Bermúdez que por ser mi principal pilar en todo momento, es mi amiga por sus consejos e incansables oraciones, incluyendo sus motivaciones constantes para seguir adelante en los días difíciles.

A mi abuela, que descansen en paz, Teresa Henríquez, que fue el segundo pilar en mi carrera y en este logro ya que su motivación, su apoyo incondicional, sus consejos profesionales y espirituales fueron mis bases.

A Josselyn Bermúdez por ser mi hermana y amiga a la vez, por sus consejos y preocupaciones, que a pesar de estar lejos siempre estuvo ahí para impulsarme a alcanzar esta y otras metas.

A toda mi familia Bermúdez por ser un apoyo importante en toda mi carrera y sus constantes oraciones para lograr esta meta.

A Licda. Reina Maribel Galdámez, que más que una docente es una amiga en los momentos difíciles, su apoyo y sus consejos fueron de gran aporte para mi crecimiento profesional.

A mis amigos: Brenda, Vicky, July, Heber, Luis, Alex y Josué por sus consejos profesionales y amistad incondicional fueron uno de los impulsos para concluir este trabajo.

A mis amigos: Mirna, Alexis, Mayra, Pamela, Luis Antonio, Mazzaly y Karla por estar ahí en los días con éxito y en los días difíciles, siempre apoyándome a seguir adelante.

Leonel Amílcar Bermúdez Luna.

INDICE

	Pág.
RESUMEN	
CAPÍTULO I	
1.0 INTRODUCCIÓN	xxvii
CAPÍTULO II	
2.0 OBJETIVOS	
CAPÍTULO III	
3.0 MARCO TEORICO	31
3.1 Probióticos	31
3.1.1 Definición	31
3.2 Bacterias acidolácticas	32
3.2.1 Género <i>Lactobacillus</i>	34
3.2.2 Género <i>Streptococcus</i>	36
3.2.3 Género <i>Bifidobacterium</i>	38
3.2.3.1 Morfología	42
3.2.3.2 Hábitats	45
3.2.3.3 Medios no selectivos	47
3.2.3.4 Medios Selectivos	48
3.3 Yogurt	49
3.3.1 Definición	49
3.3.2 Clasificación	51
3.4 Leche de cabra y su composición	
3.4.1 Principales diferencias de la leche de vaca con	54

	la leche de cabra	
3.4.2	Beneficios sobre la Salud	55
3.4.3	Yogurt a base de leche de cabra	55
3.4.4	Desventaja	56
3.5	Situación mundial de la producción caprina	56
3.6	Género Salmonella	58
3.6.1	Características microbiológicas y bioquímica	58
3.6.2	Clasificación	60
3.6.3	Reservorio	61
3.6.4	Patogenia	62
3.6.5	Salmonelosis	63
3.6.6	<i>Salmonella choleraesuis</i>	65

CAPÍTULO IV

4.0	DISEÑO METODOLOGICO	
4.1	Tipo de Estudio	67
4.1.1	Estudio experimental	67
4.1.2	Estudio transversal	67
4.1.3	Estudio prospectivo	67
4.2	Investigación bibliográfica	67
4.3	Investigación de campo	68
4.4	Parte experimental	69
4.4.1	Mantenimiento de cultivo de <i>Salmonella choleraesuis</i> ATCC 10708	69
4.4.2	Identificación de <i>Salmonella choleraesuis</i> ATCC 107 08	69
4.4.2.1	Triple Sugar Iron Agar (TSI)	69
4.4.2.2	Caldo UREA	70
4.4.2.3	Agar Xilosa-Lisina-Desoxicolato (XLD),	70

	Bismuto sulfito (BS) y Agar Sulfa Verde Brillante (AVS).	
4.4.2.4	Tinción de Gram	70
4.4.2.5	Prueba API	71
4.4.3	Estandarización de bacteria patógena <i>Salmonella choleraesuis</i> ATCC 10708	72
4.4.4	Estandarización de la mezcla de probióticos ABY-3	73
4.4.5	Elaboración de yogurt con mezcla ABY-3	74
4.4.6	Elaboración de yogurt sin mezcla ABY-3	75
4.4.7	Preparación de muestras de yogurt con mezcla ABY-3 y yogurt sin mezcla ABY-3	76
4.4.8	Inoculación de <i>Salmonella choleraesuis</i> ATCC 10708 en muestras de yogurt con mezcla ABY-3 y muestras de yogurt sin mezcla ABY-3	76
4.4.9	Conteo de bacterias acidolácticas en el yogurt con mezcla ABY-3 y en el yogurt sin mezcla ABY-3 durante 0, 5, 8, 16 y 30 días.	77
4.4.10	Medición de pH en el yogurt con mezcla ABY-3 y yogurt sin mezcla ABY-3 durante los días 0, 5, 8, 16 y 30 días.	78
4.4.11	Determinación de la sobrevivencia de <i>Salmonella choleraesuis</i> ATCC 10708 frente a las bacterias acidolácticas del yogurt con mezcla ABY-3 y yogurt sin mezcla ABY-3	78
4.4.12	Evaluación de la tolerancia de la mezcla de probióticos ABY-3 a las sales biliares y al pH ácido del estómago.	79

CAPÍTULO V

5.0	RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	82
-----	--------------------------------------	----

5.1	Elaboración de yogurt con mezcla ABY-3	82
5.2	Elaboración de yogurt sin mezcla ABY-3	83
5.3	Determinación de la sobrevivencia de <i>Salmonella choleraesuis</i> ATCC 10708 frente a las bacterias acidolácticas del yogurt con mezcla ABY-3 y yogurt sin mezcla ABY-3.	84
5.3.1	Resultados de la reducción de <i>Salmonella choleraesuis</i> ATCC 84 10708 en yogurt con mezcla ABY-3.	84
5.3.2	Resultados de reducción de <i>Salmonella choleraesuis</i> ATCC 10708 en yogurt sin mezcla ABY-3.	87
5.3.3	Comparación de la reducción de <i>Salmonella choleraesuis</i> ATCC 10708 del yogurt con mezcla ABY-3 y del yogurt sin mezcla ABY-3.	90
5.4	Análisis estadístico de la reducción de <i>Salmonella choleraesuis</i> ATCC 10708.	96
5.5	Evaluación de la mezcla de probióticos ABY-3 a las sales biliares y al pH ácido del estómago.	99
5.6	Medición de pH en el yogurt con mezcla ABY-3 y yogurt sin mezcla ABY-3 durante los días 0, 5, 8, 16 y 30.	105
5.6.1	Resultados de medición de pH en el yogurt con mezcla ABY-3.	105
5.6.2	Resultados de medición de pH en el yogurt sin mezcla ABY-3.	106
5.6.3	Comparación del pH ambos tipos de yogurt durante los 5 días de monitoreo.	107
5.7	Mantenimiento de cultivo de <i>Salmonella choleraesuis</i> ATCC 10708.	113
5.8	Identificación de <i>Salmonella choleraesuis</i> ATCC 10708	114

5.9	Estandarización de bacteria patógena <i>Salmonella choleraesuis</i>	115
	ATCC 10708	
5.10	Estandarización de la mezcla de probióticos ABY-3.	118

CAPÍTULO VI

6.0 CONCLUSIONES

CAPÍTULO VII

7.0 RECOMENDACIONES

GLOSARIO

BIBLIOGRAFÍA

ANEXOS

INDICE DE ANEXOS

Anexo N°

1. Organización de muestras de yogurt con mezcla ABY-3 y yogurt sin mezcla ABY-3
2. Datos epidemiológicos consolidados en El Salvador durante 2014, según MINSAL.
3. Mantenimiento de cultivo de *Salmonella choleraesuis* ATCC 10708.
4. Identificación de la bacteria de trabajo: *Salmonella choleraesuis* ATCC 10708.
5. Estandarización de bacteria patógena: *Salmonella choleraesuis* ATCC 10708.
6. Estandarización de mezcla de probióticos ABY-3
7. Elaboración de yogurt con mezcla ABY-3.
8. Elaboración de yogurt sin mezcla ABY-3.
9. Inoculación de *Salmonella choleraesuis* ATCC 10708 en muestras de yogurt con mezcla ABY-3 y muestras de yogurt sin mezcla ABY-3.
10. Conteo de bacterias acidolácticas en el yogurt con mezcla ABY-3 y en el yogurt sin mezcla ABY-3 durante 0, 5, 8, 16 y 30 días.
11. Determinación de la sobrevivencia de *Salmonella choleraesuis* ATCC 10708 frente a las bacterias acidolácticas del yogurt con mezcla ABY-3 y yogurt sin mezcla ABY-3.
12. Evaluación de la tolerancia de la mezcla de probióticos ABY-3 a las sales biliares y al pH ácido del estómago.
13. Ficha técnica de mezcla de probióticos ABY-3.
14. Medición de pH en el yogurt con mezcla ABY-3 y yogurt sin mezcla ABY-3 durante los días 0, 5, 8, 16 y 30.

15. Valores críticos de F para los cuales el área bajo la curva a la derecha es igual a 0.05.
16. Cálculos de concentración de probióticos en mezcla ABY-3.
17. Materiales y equipo utilizados para la elaboración de yogurt natural de leche de cabra.

INDICE DE FIGURAS

Figura N°	Página N°
1. Morfología del género <i>Lactobacillus</i>	36
2. Morfología del género <i>Streptococcus</i>	38
3. Morfología del género <i>Bifidobacterium</i>	45
4. Curva de lactancia de un hato caprino cualquiera en El Salvador	59
5. Elaboración de yogurt con mezcla ABY-3	84
6. Reducción de <i>Salmonella choleraesuis</i> a diferentes concentraciones y a diferentes días de muestreo en el yogurt con mezcla ABY-3	87
7. Reducción de <i>Salmonella choleraesuis</i> a diferentes concentraciones y a diferentes días de muestreo en el yogurt sin mezcla ABY-3	90
8. Comparación de reducción de <i>Salmonella choleraesuis</i> ATCC 10708 a 10 ³ UFC/mL de yogurt con mezcla ABY-3 y yogurt sin mezcla ABY-3	92
9. Comparación de reducción de <i>Salmonella choleraesuis</i> ATCC 10708 a 10 ⁴ UFC/mL de yogurt con mezcla ABY-3 y yogurt sin mezcla ABY-3	93
10. Comparación de reducción de <i>Salmonella choleraesuis</i> ATCC 10708 a 10 ⁵ UFC/mL de yogurt con mezcla ABY-3 y yogurt sin mezcla ABY-3	95

11. Comparación de reducción de <i>Salmonella choleraesuis</i> ATCC 10708 a 10^6 UFC/mL de yogurt con mezcla ABY-3 y yogurt sin mezcla ABY-3.	96
12. Curva de Distribución F	98
13. Conteo de bacterias acidolácticas en yogurt con mezcla ABY-3 y en yogurt sin mezcla ABY-3	104
14. Comparación del pH en ambos tipos de yogurt a concentración de 10^6 UFC/mL de <i>Salmonella choleraesuis</i> ATCC 10708.	109
15. Comparación del pH en ambos tipos de yogurt a concentración de 10^5 UFC/mL de <i>Salmonella choleraesuis</i> ATCC 10708	111
16. Comparación del pH en ambos tipos de yogurt a concentración de 10^4 UFC/mL de <i>Salmonella choleraesuis</i> ATCC 10708	112
17. Comparación del pH en ambos tipos de yogurt a concentración de 10^3 UFC/mL de <i>Salmonella choleraesuis</i> ATCC 10708	113
18. Crecimiento de <i>Salmonella choleraesuis</i> ATCC 10708 en BHI y en Agar XLD.	114
19. Identificación de <i>Salmonella choleraesuis</i> 10708 en TSI, Tinción al Gram y agar XLD, BS y AVS	116
20. Identificación de <i>Salmonella choleraesuis</i> 10708 en prueba API	116

21. Mantenimiento de cultivo de <i>Salmonella choleraesuis</i> ATCC 10708	139
22. Identificación de la bacteria de trabajo <i>Salmonella choleraesuis</i> . ATCC 10708	141
23. Estandarización de bacteria patógena: <i>Salmonella choleraesuis</i> ATCC10708	143
24. Estandarización de mezcla de probióticos ABY-3	145
25. Elaboración de yogurt con mezcla ABY-3.	147
26. Elaboración de yogurt sin mezcla ABY-3	148
27. Inoculación de <i>S. choleraesuis</i> ATCC 10708 en muestras de yogurt con mezcla ABY-3 y muestras de yogurt sin mezcla ABY-3.	149
28. Conteo de bacterias acidolácticas en el yogurt con mezcla ABY-3 y en el yogurt sin mezcla ABY-3	154
29. Determinación de sobrevivencia de <i>Salmonella choleraesuis</i> ATCC 10708 frente a las bacterias acidolácticas del yogurt con mezcla ABY-3 y yogurt sin mezcla ABY-3.	157
30. Evaluación de la tolerancia de la mezcla de probióticos ABY-3 a las sales biliares y al pH del estómago.	160
31. Medición de pH en el yogurt con mezcla ABY-3 y yogurt sin mezcla ABY-3 durante los días 0, 5, 8, 16 y 30.	165
32. Cálculo de concentración de probióticos en mezcla ABY-3	163
33. Ficha técnica de Mezcla de probióticos ABY-3	
34. Materiales y equipos utilizados para la elaboración de yogurt natural de leche de cabra.	166
	171

INDICE DE TABLAS

Tabla N°	Página N°
1. Listado de géneros pertenecientes a los probióticos.	31
2. Características del género <i>Lactobacillus</i> .	35
3. Taxonomía del género <i>Bifidobacterium</i> .	39
4. Cronología de la taxonomía del género <i>Bifidobacterium</i> .	39
5. Lista actual de las especies del género <i>Bifidobacterium</i> .	41
6. Principales características que permiten la diferenciación de los géneros <i>Acriscardovia</i> , <i>Bifidobacterium</i> y <i>Bifidobacteriaceae</i> .	43
7. Lista actual de especies al género <i>Bifidobacterium</i> en diferentes hábitats.	44
8. Medios no selectivos empleados para el cultivo del género <i>Bifidobacterium</i> .	46
9. Medios selectivos empleados para el cultivo del género <i>Bifidobacterium</i> .	47
10. Comparación de la leche de cabra y leche de vaca.	48
11. Composición vitamínica de la leche de diferentes especies.	52
12. Resultados de reducción de <i>S. choleraesuis</i> ATCC 10708 del yogurt con mezcla ABY-3: Lote 1	53
13. Resultados de reducción de <i>S. choleraesuis</i> ATCC 10708 del yogurt con mezcla ABY-3: Lote 2	84
14. Resumen de resultados de reducción de <i>S. choleraesuis</i> ATCC 10708 del yogurt con mezcla ABY-3.	85

15. Resultados de reducción de <i>S. choleraesuis</i> ATCC 10708 del yogurt sin mezcla ABY-3: Lote 1	85
16. Resultados de reducción de <i>S. choleraesuis</i> ATCC 10708 del yogurt sin mezcla ABY-3: Lote 2	87
17. Resumen de resultados de reducción de <i>S. choleraesuis</i> ATCC 10708 del yogurt sin mezcla ABY-3.	88
18. Resumen de reducción de <i>S. choleraesuis</i> ATCC 10708 a la concentración 10^3 UFC/mL para ambos tipos de yogurt.	88
19. Resumen de reducción de <i>S. choleraesuis</i> ATCC 10708 a la concentración 10^4 UFC/mL para ambos tipos de yogurt.	90
20. Resumen de reducción de <i>S. choleraesuis</i> ATCC 10708 a la concentración 10^5 UFC/mL para ambos tipos de yogurt.	92
21. Resumen de reducción de <i>S. choleraesuis</i> ATCC 10708 a la concentración 10^6 UFC/mL para ambos tipos de yogurt.	93
22. Análisis de varianza para el recuento de <i>Salmonella choleraesuis</i> ATCC 10708 a concentración de 10^6 UFC/mL en ambos tipos de yogurt.	95
23. Resultados de recuento de células viables de mezcla de probióticos ABY-3 frente a las sales biliares y pH ácido del estómago.	98
24. Conteo de bacterias acidolácticas en yogurt con mezcla ABY-3	101
25. Conteo de bacterias acidolácticas en yogurt sin mezcla ABY-3	102
26. Conteo promedio de bacterias acidolácticas de yogurt con mezcla ABY-3 y del yogurt sin mezcla ABY-3.	102
27. Resultados de pH obtenidos del yogurt con mezcla ABY-3 durante los 5 días de muestreo.	105
28. Resumen de resultados promedio de pH obtenidos del	105

yogurt con mezcla ABY-3 durante los 5 días de muestreo.	
29. Resultados de pH obtenidos del yogurt sin mezcla ABY-3 durante los 5 días de muestreo.	106
30. Resumen de resultados promedio de pH obtenidos del yogurt sin mezcla ABY-3 durante los 5 días de muestreo.	106
31. Resultados obtenidos de pH de yogurt con mezcla ABY-3 y yogurt sin mezcla ABY-3 durante los 5 días de muestreo a 10^6 UFC/mL de <i>S. choleraesuis</i> ATCC 10708.	107
32. Resultados obtenidos de pH de yogurt con mezcla ABY-3 y yogurt sin mezcla ABY-3 durante los 5 días de muestreo a 10^5 UFC/mL de <i>S. choleraesuis</i> ATCC 10708.	108
33. Resultados obtenidos de pH de yogurt con mezcla ABY-3 y yogurt sin mezcla ABY-3 durante los 5 días de muestreo a 10^4 UFC/mL de <i>S. choleraesuis</i> ATCC 10708.	109
34. Resultados obtenidos de pH de yogurt con mezcla ABY-3 y yogurt sin mezcla ABY-3 durante los 5 días de muestreo a 10^3 UFC/mL de <i>S. choleraesuis</i> ATCC 10708.	110
35. Resultados de la estandarización de <i>Salmonella choleraesuis</i> ATCC 10708.	112
36. Resultados del recuento de <i>Salmonella choleraesuis</i> ATCC 10708 de las diluciones realizadas al tubo estandarizado.	116
37. Resultados de la estandarización de mezcla de probióticos ABY-3 a partir de la suspensión madre.	117
38. Resultados del recuento de mezcla de probióticos ABY-3 de las diluciones realizadas al tubo estandarizado.	118

ABREVIATURAS

ABY-3 = Mezcla de probióticos que está formada por *Lactobacillus bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus* y *Bifidobacterium*.

ADH = Arginina deshidrolasa

API = Analytical Profile Index = Índice Analítico de Perfil

ATCC = American Type Culture Collection

AVS = Sulfa Verde Brillante

BAL = Bacterias acidolácticas

BHI = Brain Heart Infusion = Caldo Cerebro Corazón

BS = Bismuto sulfito

CECT = Colección Española Cultura Tipo

CENSALUD = Centro de Investigación y Desarrollo en Salud

CIT = Citrato

DNA = Acido desoxirribonucleico

EUA = Estados Unidos de América

FAO = Food and Agriculture Organization = Organización de las Naciones unidas para la Agricultura y la Alimentación.

G. = *Gardenerella*

GLU = Glucosa

GOT = Glutamato-oxalacetato tranferasa

GPT = Glutamato piruvato transaminasa

H₂S = Sulfuro de hidrógeno

HCl= Ácido clorhídrico

HDL = Lipoproteínas de alta densidad

IND = Producción de Indol

Lb. = *Lactobacillus*

LDH = *Lisina descarboxilasa*

LPS = Lipopolisacárido de pared celular

MINSAL = Ministerio de Salud de El Salvador

MRS = Man, Rogosa y Sharpe: Medio de cultivo (agar o caldo).

NaOH = Hidróxido de sodio

NMP = Número más probable

OMS = Organización Mundial para la Salud

S. choleraesuis = *Salmonella choleraesuis*

sp= Especie

spp= Especies

subsp. = subespecie

TSA = Tripticasa Soya Agar

UFC = Unidades formadoras de colonias

UFC/g = Unidades formadoras de colonias por gramo

UFC/mL= Unidades formadoras de colonias por mililitro.

URE = Ureasa

VP = Producción de acetoína (Voges-Proskauer)

XLD = Xilosa-Lisina-Desoxicolato

RESUMEN

Las investigaciones microbiológicas sobre los probióticos y su comportamiento frente a las bacterias patógenas, se han desarrollado en gran medida durante los últimos años, y en particular sobre las bacterias pertenecientes al género *Salmonella*, causantes de salmonelosis, cuya infección bacteriana es una patología que en El Salvador es una de las más comunes debido a que fueron reportados un número de pacientes de 240,925 con diagnóstico de diarrea y gastroenteritis durante el año 2014 ⁽²⁹⁾. Es por ello que se busca medidas alternativas para lograr reducir la cantidad de bacterias patógenas por medio del buen uso de los probióticos a través de diversos alimentos, entre ellos, el yogurt.

En base a lo anterior, se procedió a obtener dos yogurts naturales, uno utilizando una mezcla de probióticos denominada ABY-3 en conjunto con leche de cabra como sustrato y un segundo yogurt utilizando solo un cultivo iniciador y de igual manera, se hizo uso de leche de cabra como sustrato. En ambos yogures se les realizaron diversas determinaciones durante 5 días de muestreo de un mes de control, estos días fueron: 0, 5, 8, 16 y 30. La determinación como el conteo de bacterias acidolácticas se realizó a través del método de placa vertida, donde el yogurt con mezcla de probióticos ABY-3 presentó un comportamiento constante del conteo de las bacterias acidolácticas ya que durante todos los días muestreados los recuentos se mantuvieron en una concentración de 10^6 UFC/mL, lo cual refleja que el yogurt es factible para su refrigeración a 4°C durante un mes; pero a diferencia del yogurt sin mezcla ABY-3, el cual presentó una disminución de 1 logaritmo en los días 16 y 30, es decir, que disminuyó su recuento de 10^6 a 10^5 UFC/mL, a las mismas condiciones de refrigeración.

Consecutivamente se realizó la determinación de la sobrevivencia de *Salmonella choleraesuis* ATCC 10708, frente a las bacterias probióticas de la mezcla ABY-3 y frente al cultivo iniciador en sus respectivos yogures desarrollándola a través del recuento en placa vertida, resultando un comportamiento similar en ambos tipos de yogurt debido a que los resultados presentaron una inhibición completa a los 8 días de la toma de muestras inoculadas con la bacteria patógena a las concentraciones de 10^5 , 10^4 y 10^3 UFC/mL y para las muestras con la concentración 10^6 , demostraron su inhibición completa hasta el día 16. Estos resultados similares en ambos yogurts se confirmaron su comportamiento estadísticamente a través de un análisis ANOVA, no rechazándose la hipótesis nula donde se planteó que el conteo para las diferentes concentraciones de *S. choleraesuis* ATCC 10708 es similar en ambos yogures. Pero a pesar de presentar este comportamiento se evidenció algunas diferencias relativamente significativas entre los dos tipos de yogurt, dado que para las muestras de yogurt con mezcla ABY-3 a la concentración de 10^6 UFC/mL de *S. choleraesuis* entre los días 8 y 16 de muestreo la reducción fue de 2 logaritmos, mientras que para el yogurt sin mezcla ABY-3 a la misma concentración de la cepa patógena la reducción en dichos puntos de muestreo resultó solamente de 1 logaritmo.

También se llevaron a cabo consecutivamente la determinación de pH en ambos tipos de yogurts donde el comportamiento fue constante para los dos pero con diferencia que el yogurt con mezcla ABY-3 presentaron valores relativamente más ácidos que las muestras con yogurt sin mezcla ABY-3, debido que para el primero tipo de yogurt sus resultados se reflejaron entre 4.35-4.32 y para el yogurt con el cultivo iniciador los valores fueron entre 4.47-4.42.

Posteriormente se evaluó la tolerancia de los probióticos pertenecientes de la mezcla ABY-3, frente a las sales biliares y al pH ácido del estómago resultando

un porcentaje de 96.4% para el pH del estómago y un 84.7% frente a las sales biliares, reflejando valores aceptables para que la mezcla ABY-3 y presentando una muy buena capacidad de tolerar a las dos condiciones. Y en base a todo lo anterior es recomendable la elaboración de un yogurt natural utilizando los probióticos pertenecientes a la mezcla ABY-3 y utilizando leche de cabra como sustrato, incluyendo así que es factible su almacenamiento por 30 días a 4°C. Además del consumo de este tipo de yogurt como un tratamiento alternativo contra Salmonelosis por la ingesta de carne contaminada con *Salmonella choleraesuis*.

Y en base a todo lo anterior la obtención del yogurt con mezcla de probióticos ABY-3 y utilizando leche de cabra como sustrato, resultó ser factible, incluyendo que el yogurt presentó una muy buena capacidad de reducción de las colonias inoculadas con *S. choleraesuis* ATCC 10708 durante 30 días controlados, manteniendo también valores de probióticos constantes y aceptables tomando como referencia diferentes normativas especificadas en la investigación.

CAPITULO I
INTRODUCCION

1.0 INTRODUCCIÓN

Por muchos años se han realizado diferentes estudios científicos de manera *In vitro* o *In vivo*, con el fin de demostrar el buen uso de los probióticos para beneficiar directamente o indirectamente la salud del ser humano; pero es notorio que en el país existen pocos.

Hoy en día los alimentos con probióticos están tomando mayor auge y especialmente el yogurt, ya que en El Salvador y en toda Centroamérica se comercializan diferentes marcas de yogurt a base de leche de vaca. En cambio en México se comercializa dicho producto; pero utilizando leche de cabra, lo cual ha alcanzado un mayor desarrollo hasta un nivel industrial ⁽³⁾.

La población salvadoreña tiene poca aceptación por la leche de cabra, debido a la falta de información sobre su composición nutricional, la relativa accesibilidad a esta y a una errónea percepción del sabor; pero diferentes investigaciones internacionales le confieren marcadas diferencias nutricionales en comparación con la leche de vaca, entre ellas, un contenido mayor de vitamina A, un contenido de glóbulos de grasa con un tamaño menor que los presentes en la leche de cabra y sus variantes genéticas en las proteínas de la leche (caseínas), estas dos últimas hacen que sea más digeribles y favorable para la ingesta en las personas que son intolerantes a la lactosa de la leche de vaca. También su sabor es menos amargo debido a la acción pronunciada de las enzimas proteasas sobre las caseínas de la leche y su color blanco es debido a que no posee carotenos como los presentes en la leche de vaca ⁽⁵⁾.

En este estudio se pretendió conocer el posible efecto inhibitorio de una mezcla de probióticos denominada ABY-3, sobre las colonias de la bacteria patógena *Salmonella choleraesuis* ATCC 10708, causante de salmonelosis, ya que la patología en El Salvador no está descartada en los datos epidemiológicos durante el 2014, según el Ministerio de Salud de EL Salvador (MINSAL),

reportándose un total de 240,925 pacientes con diagnóstico de diarrea y gastroenteritis, en un periodo de 52 semanas en pacientes en un rango de niños de menores de un año hasta adultos mayores de 60 años ⁽²⁹⁾. Con base a lo anterior, se realizó una investigación de manera *In vitro* en el laboratorio de Microbiología de Alimentos del Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD), durante los meses de Agosto a Octubre del año 2014, para determinar el efecto inhibitorio que tiene una mezcla de probióticos denominada ABY-3, que fue inoculada en leche de cabra como sustrato para elaborar un yogurt natural, sobre las colonias de *Salmonella choleraesuis* ATCC 10708, causante de salmonelosis en humanos debido al contacto directo con carne de cerdo contaminada ⁽³³⁾. Confirmando así las investigaciones internacionales de algunos probióticos y en específico de las investigaciones de los géneros como *Streptococcus*, *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* y recomendar como tratamiento alternativo el yogurt de origen caprino a pacientes que se sospechen que presenten este tipo de intoxicación alimentaria y aquellos que sean intolerantes a la lactosa de la leche de vaca. También se evaluó la resistencia de la mezcla de probióticos ABY-3 a las sales biliares y pH del estómago para determinar si la mezcla de probiótico cumple con los requisitos según FAO/OMS para que sea nombrada netamente probiótico y un conteo de las bacterias acidolácticas para asegurar que los yogurts se presenten a la concentración de 10^6 UFC/mL. Estas determinaciones se realizaron en cada día de muestreo durante un mes, siendo los días muestreados: 0, 5, 8, 16 y 30. Además se elaboró un yogurt natural sin la mezcla ABY-3 y sólo con los cultivos iniciadores, con el propósito de llevar un control de las determinaciones y posteriormente se comparan los resultados de este, con el yogurt que contiene la mezcla de probióticos ABY-3. Para ambos tipos de yogurt, su elaboración, fraccionamiento de muestras, inoculación y las diferentes determinaciones se desarrollaron en un periodo comprendido entre Agosto a Octubre del año 2014.

CAPITULO II
OBJETIVOS

2.0 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Obtener un yogurt natural utilizando una mezcla de probióticos ABY-3, leche de cabra como sustrato y control de la sobrevivencia de la cepa *Salmonella choleraesuis* ATCC 10708.

2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- 2.2.1 Elaborar un yogurt natural utilizando leche de cabra como sustrato y una mezcla de bacterias probióticas, ABY-3 que contienen bacterias de los géneros *Lactobacillus*, *Streptococcus* y *Bifidobacterium*.
- 2.2.2 Elaborar un yogurt natural utilizando leche de cabra como sustrato, con un cultivo inicial de *Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*.
- 2.2.3 Determinar la sobrevivencia de *Salmonella choleraesuis* ATCC 10708 a diferentes concentraciones, frente a las bacterias de la mezcla ABY-3 y frente a las bacterias del cultivo iniciador por medio de recuento microbiano a través del método de placa vertida.
- 2.2.4 Establecer el tiempo de tolerancia de la mezcla de probióticos, ABY-3, a las sales biliares y pH ácido del estómago de manera *In vitro* por medio de una técnica combinada.
- 2.2.5 Comparar el efecto inhibitorio de ambos yogurts sobre la bacteria patógena *Salmonella choleraesuis* ATCC 10708.

CAPITULO III
MARCO TEORICO

3.0 MARCO TEORICO

3.1 Probióticos ⁽⁷⁾ ⁽²⁰⁾

El término probiótico fue usado por primera vez en el año 1965 por Lilly y Stillwell, para describir aquellas sustancias secretadas por un microorganismo que estimulan el crecimiento de otras, en contraposición al término antibiótico.

El término “probiótico”, derivado de *bios*, palabra griega que significa “vida”, nació a mediados del siglo pasado a partir de la observación de la influencia positiva de determinados microorganismos en la flora intestinal.

3.1.1 Definición ⁽⁷⁾ ⁽²⁰⁾

Los probióticos son definidos por la FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) como “microorganismos vivos que administrados en adecuadas cantidades ejercen un efecto beneficioso sobre el huésped”. ⁽⁷⁾ ⁽²⁰⁾

La mayoría de los probióticos según la tabla N°1, son bacterias del género *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* aunque también se emplean algunos otros géneros como *Enterococcus*, *Streptococcus*, y *Saccharomyces*. ⁽¹⁷⁾

Tabla N° 1. Listado de géneros pertenecientes a los probióticos. ⁽¹⁷⁾

Lactobacillus spp.	Bifidobacterium spp	Lactococcus spp	Streptococcus spp
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>L. lactis</i>	<i>S. thermophilus</i>
<i>L. lactis</i>	<i>B. longum</i>	<i>L. cremoris</i>	Otras especies
<i>L. bulgaricus</i>	<i>B. breve</i>	<i>L. diacetyllactis</i>	<i>Saccharomyce cerevicae</i>
<i>L. rhamnosus</i>	<i>B. lactis/ animalis</i>	Enterococcus spp	<i>Saccharomyces boulandii</i>
<i>L. casei</i>	<i>B. adolescentes</i>	<i>E. faecium</i>	<i>Leuconostoc spp</i>

Tabla N° 1. (Continuación).

Lactobacillus spp.	Bacillus spp.	Enterococcus spp.	
<i>L. kéfir</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>E. faecalis</i>	
<i>L. brevis</i>	<i>B. coagulans</i>		
<i>L. reuteri</i>			
<i>L. helveticus</i>			
<i>L. paltarium</i>			
<i>L. salivarius</i>			
<i>L. johnsonii</i>			

3.2 Bacterias acidolácticas ⁽⁷⁾ (20)

Las bacterias acidolácticas (BAL) son un grupo de bacterias Gram-positivas agrupadas por una gran cantidad de características morfológicas, metabólicas y fisiológicas. La descripción general de este grupo de bacterias se incluye en el grupo de Gram-positivos, no esporulados, cocos o bacilos que producen ácido láctico como producto de la fermentación de carbohidratos.

La clasificación de las bacterias acidolácticas de Orla-Jensen aún se acepta como método estándar de diferenciación de estos microorganismos. Los de forma esférica (cocoidea) se conocen como “*Streptococcus*” y los bacilos se clasifican como *Thermobacterium*, *Streptobacterium* y *Betabacterium*. Según la séptima edición del manual de Bergey’s (1957), todas las bacterias acidolácticas se incluyen en la familia *Lactobacillaceae*, que a su vez se

subdivide en *Streptococcaceae* (de forma esférica u ovoide) y *Lactobacillaceae* (de forma bacilar) ⁽¹⁷⁾.

Los límites de este grupo han sido objeto de controversia pero históricamente los géneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, y *Streptococcus* forman el corazón del grupo. Las revisiones taxonómicas de este género y la descripción de nuevos géneros sugieren que las bacterias acidolácticas comprendan los siguientes géneros: *Aerococcus*, *Alloiococcus*, *Carnobacterium*, *Dolosigranulum*, *Enterococcus*, *Globicatella*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Weissella*. El género *Bifidobacterium*, frecuentemente está considerado en el mismo contexto que las bacterias acidolácticas y posee algunas características comunes ⁽¹⁷⁾.

La clasificación de las bacterias acidolácticas en diferentes géneros está basada en la morfología, modo de fermentar la glucosa, el crecimiento a diferentes temperaturas, la configuración del ácido láctico producido, la habilidad para crecer a elevadas concentraciones de sales y la tolerancia ácido-base.

Las bacterias acidolácticas obtienen energía metabólica esencialmente mediante la fosforilación a nivel de sustrato, durante la oxidación de carbohidratos, formando ácido láctico como principal metabolito. Además, poseen actividad proteolítica, lo que les permite la obtención de aminoácidos a partir de proteínas, en medios ricos en dichos constituyentes; aunque ésta es reconocidamente inferior a otros grupos microbianos como *Bacillus*, *Proteus*, *Pseudomonas*, etc ⁽¹⁷⁾.

3.2.1 Género *Lactobacillus* ⁽¹⁷⁾ ⁽²¹⁾ ⁽²⁵⁾

Los lactobacilos se encuentran ampliamente distribuidos en los vegetales, carnes y pescados. Forman parte de la flora normal de la boca, tracto intestinal y aparato reproductor femenino humano y de muchos animales. No son considerados patógenos (excepto algunas especies que parecen intervenir en la caries dental). Tienen una gran importancia industrial, pues se utilizan en diversos procesos de fermentación láctica (yogur y queso). Intervienen también, en la fabricación de productos derivados de los vegetales (pepinillos y aceitunas).

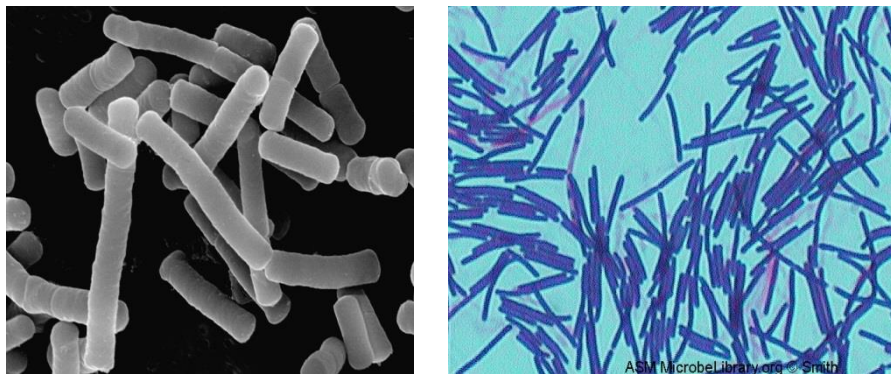
Son bacilos largos con morfología cocobacilar y corineforme (Figura N°1). Es frecuente la formación de cadenas. Son Gram-positivos, inmóviles, aunque existen unas pocas especies móviles por flagelos peritricos. No son esporulados. Son sacarolíticos obligados. Su característica principal es la de fermentar azúcares con producción de ácido láctico, pudiendo ser homofermentadores u heterofermentadores (Tabla N°2).

Su crecimiento se ve favorecido por la anaerobiosis o por tensiones de oxígeno reducidas. Crecen entre 2°C y 53°C, aunque su temperatura óptima es de 30-40°C. Son acidúricos, creciendo óptimamente a pH comprendidos entre 5,5-6,2. Se han descrito siete grupos serológicos (A-G) de lactobacilos, basándose en sus determinantes antigénicos específicos. Se han descrito más de 102 especies y la especie tipo es *Lactobacillus delbrueckii* que pertenece al grupo E.

⁽¹⁷⁾ ⁽²⁵⁾

Tabla N°2. Características del género *Lactobacillus* ⁽¹⁷⁾

CARACTERÍSTICAS	GRUPO I	GRUPO II	GRUPO III
	Homofermentativos obligados	Heterofermentativos facultativos	Heterofermentativos obligados
Fermentación de pentosas	-	+	+
CO ₂ a partir de glucosa	-	-	+
CO ₂ a partir de Gluconato	-	+	+
Presencia de aldolasa	+	+	-
Presencia de fosfoacetolasa	-	+	+
	<i>Lb. acidophilus</i>	<i>Lb. casei</i>	<i>Lb. brevis</i>
	<i>Lb. delbruekii</i>	<i>Lb. curvatus</i>	<i>Lb. buchneri</i>
	<i>Lb. helveticus</i>	<i>Lb. plantarum</i>	<i>Lb. fermentun</i>
	<i>Lb. salivarius</i>	<i>Lb. sake</i>	<i>Lb. reuteri</i>

Figura N°1. Morfología del género *Lactobacillus*

Requieren medios nutricionales complejos, con aminoácidos, péptidos, derivados de ácidos nucleicos, vitaminas, sales, ácidos grasos y carbohidratos

fermentables. El medio de cultivo más empleado es el medio MRS descrito por Man, Rogosa y Sharpe en 1960, este medio contiene además, magnesio, manganeso acetato y polisorbato 80 (Tween 80) que facilitan de gran forma el crecimiento de los bacilos lácticos, incluso de las especies más exigentes, como *Lactobacillus brevis* y *Lactobacillus fermenti*. El medio MRS está especialmente recomendado para la enumeración y mantenimiento de bacilos lácticos, ya sea por la técnica del número más probable (NMP) en caldo o por siembra en masa (8).

3.2.2 Género *Streptococcus* (8) (25)

Existen más de 66 especies y la especie tipo es *Streptococcus pyogenes*, pero la única especie de estreptococos que está asociada a la tecnología alimentaria es *Streptococcus thermophilus*, que se emplea en la fabricación del yogur (junto con *Lactobacillus delbruekii* subsp. *bulgaricus* y con otros microorganismos *Lb. casei*; *Lb. acidophilus*; *Bifidobacterium*). *Streptococcus thermophilus* fue descrito por primera vez por Orla-Jensen en 1919.

Su nombre procede del término griego “*therme*” que significa calor y del término “*philus*” que significa afinidad (8).

Son células esféricas u ovoides de 0,7-0,9 μm de diámetro, distribuidas en parejas o formando cadenas (figura N°2). Son anaerobios facultativos, quimioorganotrofos con metabolismo fermentativo. Son catalasa negativos. Crece con un 2,5% de cloruro sódico pero no con un 4%. No crece a pH superiores a 9,6 ni en leche que posea un 0,1% de azul de metileno. La temperatura mínima de crecimiento es de 19-21°C. La resistencia al calor, la habilidad para crecer a 52°C y el conjunto de carbohidratos que puede fermentar, distingue a *Streptococcus thermophilus* de otros muchos estreptococos, *Streptococcus thermophilus* está incluido dentro del grupo "otros

estreptococos" por Schleifer y Kilpper-Bälz (1987), pero se encuentra actualmente dentro del grupo de los estreptococos orales (Hardie y Whiley, 1995). Farrow y Collins propusieron que *Streptococcus thermophilus* fuera considerado como una subespecie de *Streptococcus salivarius* porque su homología DNA-DNA era mayor del 70%, de esta forma fue aceptado el nombre de *Streptococcus salivarius* subsp. *Thermophilus* ⁽²⁵⁾.

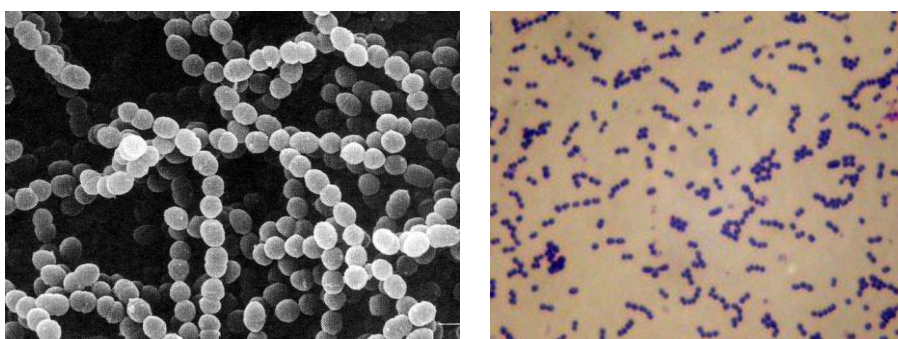


Figura N° 2. Morfología del género *Streptococcus*.

El medio más empleado para el aislamiento, mantenimiento o cultivo e identificación de estreptococos relacionados con productos lácteos es el agar M-17 que fue desarrollado por Teragazhi y Sandine en 1975, pero posteriormente Shankar y Davies (1977) demostraron su eficacia del medio para el aislamiento selectivo de *Streptococcus thermophilus* del yogur, que se debe a la combinación de un fuerte efecto tampón, que facilita el desarrollo de los estreptococos, y una elevada concentración de glicerofosfato, que inhibe el desarrollo de los lactobacilos. Shankar y Davies (1977) observaron que se suprime el crecimiento de *Lactobacillus* si el pH del medio M-17 es de 6,8. El CENAN ha adoptado este medio de forma paralela con MRS para el examen rutinario del yogur ⁽¹⁷⁾.

3.2.3 Género *Bifidobacterium* ⁽⁸⁾ ⁽¹²⁾ ⁽¹⁷⁾

En 1899, en el Instituto Pasteur, Tissier observó y aisló de bebés una bacteria con una morfología inusual y desconocida, en forma de Y. Entonces se planteó el problema de la ubicación de esta bacteria en la clasificación contemporánea.

A principios del siglo, la taxonomía estaba basada por completo en el criterio morfológico y Tissier (1900) denominó a esta bacteria "*Bacillus bifidus*". En ese mismo tiempo, en Italia, Moro descubrió en condiciones similares una bacteria que reconoció como diferente de la que Tissier había observado, y la identificó como perteneciente al género *Lactobacillus*. A pesar de las diferencias entre esas dos bacterias, Holland en 1920, propuso un nombre común "*Lactobacillus bifidus*", que fue desarrollándose y ganando precisión a lo largo del tiempo en paralelo con el progreso científico (Tabla N°4).

Orla-Jensen (1924) fue el responsable de la dirección en la historia de la taxonomía de las bifidobacterias (Tabla N° 3) y reconoció la existencia del género *Bifidobacterium* como un taxón separado, pero con muchas similitudes al género *Lactobacillus*, al que las bifidobacterias fueron incluidas en la 7ª ed. Manual Bergey's ⁽¹²⁾.

La clasificación e identificación de los microorganismos que se basaba en la morfología cambió su criterio; así la fisiología, los requerimientos nutricionales y las características metabólicas y enzimáticas pasaron a tomar una mayor relevancia ⁽⁸⁾.

Tabla N° 3. Taxonomía del género *Bifidobacterium* ⁽⁸⁾

Dominio	Bacteria
Linaje	<i>Firmicutes</i>
Clase	<i>Actinobacteria</i>
Subclase	<i>Actinobacteridae</i>
Orden	<i>Bifidobacteriales</i>
Familia	<i>Bifidobacteraceae</i>
Géneros	<i>Bifidobacterium</i> (28 especies)
	<i>Gardnerella</i> (1 especie)
	<i>Aeriscardovia</i> (1 especie)
	<i>Parascardovia</i> (1 especie)
	<i>Scardovia</i> (2 especies)

Tabla N° 4. Cronología de la taxonomía del género *Bifidobacterium*. (Modificado de Ballogue. Bifidobacteria and Probiotic action. Lactic acid bacteria, Salminen) ⁽⁸⁾

Nombre	Autor	Año
<i>Bacillus bifidus</i>	Tissier	1900
<i>Bacteroides bifidus</i>	Castellani y Chalmers	1919
<i>Lactobacillus bifidus</i>	Manual Bergey's eds. 1-4	1923-1934
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	Holland	1920
<i>Bacterium bifidum</i>	Orla-Jensen	1924
<i>Tisseria bifida</i>	Lehmann y Neumann	1927
<i>Nocardia bifida</i>	Pribam	1929
<i>Actynomices bifidum</i>	Vuillemin	1931
<i>Actinobacterium bifidum</i>	Nannizzi	1934

Tabla N°4. Continuación ⁽⁸⁾

Nombre	Autor	Año
<i>Lactobacillus acidophilus</i> var. <i>Bifidus</i>	Puntoni Weiss y Rettger	1937
<i>Lactobacillus parabifidum</i>	Weiss y Rettger	1938
<i>Cohnistreptothrix bifidus</i>	Manual Bergey's eds 5-7	1938
<i>Corynebacterium bifidum</i>	Negrovi y Fischer	1939- 1957
<i>Lactobacillus bifidus</i>	Olsen	1944
5 grupos de bifidobacterias	Gyorgy	1949
Descripcion de especies humanas	Dehnert	1969
Nuevas especies animales	Reuter, Mitsuoka y Scardovi	1969- 1972
Familia Actinomycetae, Género <i>Bifidobacterium</i> , constituido por 11 especies	Holdemann y Moore Manual Bergey's eds. 8	1974
Género <i>Bifidobacterium</i> constituido por 33 especies.	Manual Bergey's eds. 9	1990
Orden Bifidobacteriales. Familia Bifidobacteriaceae Géneros <i>Bifidobacterium</i> y <i>Gardnerella</i>	Stackebrandt et al.	1997
Géneros <i>Bifidobacterium</i> , <i>Gardenerella</i> , <i>Aeriscardovia</i> , <i>Parascardovia</i> y <i>Scardovia</i>	Jiang et al.	2002
Género <i>Bifidobacterium</i> constituido por 28 especies.	Actualidad	2004

En los últimos años han aparecido nuevas cepas y se han reclasificado, en la actualidad el género se encuentra formado por un total de 29 especies, como se expresa en la Tabla 5 ⁽⁸⁾.

Tabla N° 5. Lista actual de las especies del género *Bifidobacterium* ⁽⁸⁾.

Especie	Subespecie	Referencia
<i>Bifidobacterium adolescentes</i> <i>Bifidobacterium angulatum</i> <i>Bifidobacterium animalis</i>	<i>Subsp. animalis</i> <i>Subsp. Lactis</i>	Reuter, 1963 Scardovi y Crociani, 1974 (Mitsuoka 1969) Scardovi y Trovatelli 1974 (Meile et al. 1997) Masco et al. 2004
<i>Bifidobacterium asteroides</i> <i>Bifidobacterium bifidum</i>		Scardovi y Trovatelli 1969 Tissier, 1900 Orla-Jensen 1924
<i>Bifidobacterium boum</i> <i>Bifidobacterium breve</i> <i>Bifidobacterium catenulatum</i> <i>Bifidobacterium choerinum</i> <i>Bifidobacterium coryneforme</i>		Scardovi et al. 1979 Reuter, 1963 Scardovi y Trovatelli 1974 1974 Scardovi et al 1979 Scardovi y Trovatelli 1969 Biavati et al. 1982

Tabla N°5. Continuación ⁽⁸⁾

Espece	Subespecies	Referencia
<i>Bifidobacterium cuniculi</i> <i>Bifidobacterium dentium</i> <i>Bifidobacterium gallicum</i> <i>Bifidobacterium gallinarum</i> <i>Bifidobacterium indicum</i>		Scardovi et al Scardovi y Trovatelli 1974 Lauer, 1990 Watabe et al. 1983 Sacardovi y Trovatelli 1969 Sakata et al. 2002
<i>Bifidobacterium longum</i>	<i>subsp. Longum</i> <i>subsp. Infantis</i> <i>subsp. suis</i>	Sakata et al. 2002
<i>Bifidobacterium magnum</i> <i>Bifidobacterium merycium</i> <i>Bifidobacterium mínimum</i> <i>Bifidobacterium pseudocatemulatum</i> <i>Bifidobacterium pseudolongum</i>		Scardovi and Zani 1974 Biavati y Mattarelli 1991 Biavati et al. 1982 Scardovi et al 1979
<i>Bifidobacterium pseudolongum</i>	<i>Subsp pseudolongum</i> <i>Subsp globosum</i>	Mitsuoka 1969 Yaeshima et al 1992
<i>Bifidobacterium psychraerophilum</i> <i>Bifidobacterium pullorum</i> <i>Bifidobacterium ruminatum</i> <i>Bifidobacterium saeculare</i> <i>Bifidobacterium scardovii</i> <i>Bifidobacterium subtile</i>		Simpson et al 2004 Trovatelli et al 1974 Biavati y Mattarelli 1991 Biavati et al 1992 Hoyles et al 2002 Biavati et al 1982
<i>Bifidobacterium thermacidophilum</i>	<i>subsp porcinum</i> <i>subsp thermacidophilum</i>	Zhu et al 2003 Dong et al 2000
<i>Bifidobacterium thermophilum</i>		Mitsuoka 1969

6.2.3.1 Morfología ^{(8) (12)}

La morfología de la familia consiste en bacilos pleomórficos que se presentan individualmente, en cadenas o en grupos. ⁽⁷⁾ Las células no tienen cápsula y no forman esporas, no son móviles ni presentan filamentos. Todas las especies son Gram positivos a excepción de *G. vaginalis* que presenta un Gram variable. Son anaerobios, algunas especies de *Bifidobacterium* pueden tolerar el oxígeno

únicamente en presencia de CO₂, y *Gardnerella* es anaerobia facultativa. No utilizan el indol, no hidrolizan la gelatina, catalasa y oxidasa negativas. El crecimiento óptimo se sitúa entre 35–39°C ⁽⁸⁾.

Actualmente la familia *Bifidobacteriaceae* se encuentra formada por los géneros *Bifidobacterium*, *Gardnerella*, *Aeriscardovia*, *Parascardovia*, *Scardovia* y son clasificadas por sus características bioquímicas, tal y como se detallan en la Tabla N° 6 ⁽¹²⁾.

Tabla N° 6. Principales características que permiten la diferenciación de los géneros *Aeriscardovia*, *Bifidobacterium* y *Scardovia* pertenecientes a la familia *Bifidobacteriaceae* ⁽¹²⁾.

	<i>Aeriscardovia</i>	<i>Bifidobacterium</i>	<i>Parascardovia</i>	<i>Scardovia</i>
Crecimiento en anaerobiosis	+	(+)	-	-
Temperatura de crecimiento (°C)	30-46	25-46	27-44	27-44
Alargamiento de las células después de exposición al oxígeno	+	D	+	+
Arabinosa	+	D	D	-
Celobiosa	-	D	+	-
Lactosa	-	D	+	D

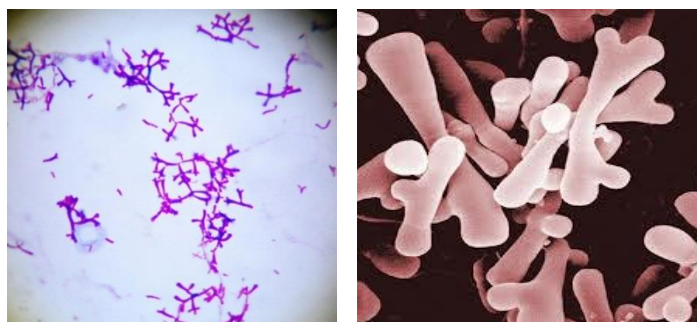
+: Respuesta positiva (+): Respuesta débilmente positiva -: Respuesta negativa d: Respuesta variable

Tabla N°6. Continuación ⁽¹²⁾

	<i>Aeriscardovia</i>	<i>Bifidobacterium</i>	<i>Parascardovia</i>	<i>Scardovia</i>
Maltosa	+	D	+	+
Mannitol	-	D	-	-
Mannosa	(+)	D	-	-
Melezitosa	D	D	-	d
Rafinosa	+	D	D	d
Sacarosa	D	+	+	+
Salicina	+	D	+	d
Sorbitol	-	D		
Trehalosa	-	D	D	-
Xylosa	D	D	-	+

+: Respuesta positiva (+): Respuesta débilmente positiva -: Respuesta negativa d: Respuesta variable

Son bacilos, con una pared externa irregular, son usualmente cóncavos y sus extremidades pueden adquirir diversas morfologías con extremos en forma de espátula (Figura N°3). En algunos casos incluso pueden presentar morfología cocoidea. Se disponen aislados, en cadenas, en empalizada o en forma de V, Y, T. La morfología es muy variable y depende del medio de cultivo donde se desarrollen ^{(8) (12)}.

Figura N° 3. Morfología del género *Bifidobacterium*

Su temperatura óptima de crecimiento oscila entre 36-38°C para las especies de origen humano y 41-43°C para las especies de origen animal ⁽⁵⁾. No existe crecimiento a temperaturas menores de 20°C y las bacterias pertenecientes a este género no resisten bien temperaturas mayores de 46°C. Por ejemplo, *Bifidobacterium bifidum* muere a 60°C, (Rasic y Kurmann, 1983).

La apariencia de las colonias de este género bajo condiciones de anaerobiosis puede variar mucho en función del medio que se emplee. En general, las colonias que se forman son redondeadas, pueden ser brillantes y de diámetro muy variable, pero Scardovi (1986) distinguió dos diferentes tipos de colonias de *Bifidobacterium bifidum*, algunas colonias son muy lisas, convexas, blancas, y brillantes, mientras que otras son rugosas, con bordes desiguales. Por ello, la morfología de colonia no es una buena referencia para la identificación del género ⁽⁸⁾.

3.2.3.2 Hábitats ^{(8) (12)}

Las bifidobacterias son habitantes normales del tracto gastrointestinal humano y de diversos animales y están presentes durante toda la vida pero en distintas cantidades, apareciendo a los pocos días después del nacimiento. Constituyen una de las especies predominantes de la microflora del colon, junto con *Peptostreptococcus*, *Eubacterias*, *Clostridia* y *Bacteroides*, las cuales se encuentran presentes en niveles que van desde 10^8 a 10^{11} bacterias por gramo de material del colon ⁽¹²⁾.

Tabla N°7. Lista actual de especies pertenecientes al género *Bifidobacterium* en diferentes hábitats ⁽⁸⁾.

Humanos	Animal	Medioambiental y alimentos
<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	<i>Bifidobacterium animalis</i>	<i>Bifidobacterium adolescentes</i>
<i>Bifidobacterium agulatum</i>	<i>Bifidobacterium asteroides</i>	<i>Bifidobacterium angulatum</i>
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	<i>Bifidobacterium boum</i>	<i>Bifidobacterium animalis</i>
<i>Bifidobacterium breve</i>	<i>Bifidobacterium choerinum</i>	<i>Bifidobacterium breve</i>
<i>Bifidobacterium catenulatum</i>	<i>Bifidobacterium coryneforme</i>	<i>Bifidobacterium catenulatum</i>
<i>Bifidobacterium dentium</i>	<i>Bifidobacterium cuniculi</i>	<i>Bifidobacterium choerinum</i>
<i>Bifidobacterium gallicum</i>	<i>Bifidobacterium gallicum</i>	<i>Bifidobacterium longum</i>
<i>Bifidobacterium longum</i>	<i>Bifidobacterium gallinarum</i>	<i>Bifidobacterium mínimum</i>
<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i>	<i>Bifidobacterium indicum</i>	<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i>
<i>Bifidobacterium pseudolongum</i>	<i>Bifidobacterium longum</i>	<i>Bifidobacterium pseudolongum</i>
<i>Bifidobacterium scardovii</i>	<i>Bifidobacterium magnum</i>	<i>Bifidobacterium subtile</i>
	<i>Bifidobacterium merycium</i>	<i>Bifidobacterium thermophilum</i>
	<i>Bifidobacterium pseudolongum</i>	
	<i>Bifidobacterium psychaerophilum</i>	
	<i>Bifidobacterium pullorum</i>	
	<i>Bifidobacterium ruminarium</i>	
	<i>Bifidobacterium saeculare</i>	
	<i>Bifidobacterium subtile</i>	
	<i>Bifidobacterium thermacidophilum</i>	
	<i>Bifidobacterium thermophilum</i>	

En cuanto a los medios de cultivo se distinguen dos tipos para el aislamiento, cultivo y caracterización de las bifidobacterias: medios no selectivos y medios selectivos.

3.2.3.3 Medios no selectivos: Estos medios suelen estar constituidos por diversas sustancias tales como extracto de carne, peptonas, extracto de levadura, zumo de tomate, sangre de caballo, leche, etc. que permiten el crecimiento de muchas especies de bifidobacterias. Estos medios pueden ser adicionados con sustancias con bajo potencial redox, como puede ser la cisteína, cistina, ácido ascórbico, sulfato de sodio, etc ⁽⁸⁾.

Existe un amplio abanico de medios de cultivo (Tabla N°8), desarrollados en su mayoría en estos últimos años. Destacar el medio TPY (Tryptona, Peptona y extracto de levadura), fue descrito inicialmente por Scardovi (1986), como el más adecuado para el aislamiento y cultivo de las bifidobacterias de cualquiera que fuese su origen, ya que todas crecen bien en él. Sin embargo, su riqueza y su falta de selectividad hacen que también aparezcan profusamente lactobacilos, estreptococos y otras bacterias afines. Para conseguir un medio más selectivo, Samona y Robinson (1991) propusieron la adición de mezclas inhibitoras como 3 g/l de cloruro de litio con 0,1 g/l de sulfato de Neomicina y con 15 mg/l de ácido nalidíxico, que se añaden al medio en forma de solución, esterilizada por filtración ⁽⁸⁾.

Tabla N°8. Medios no selectivos empleados para el cultivo del género *Bifidobacterium* ⁽⁸⁾.

Medio	Descubridor
Man Rogosa y Sharp (RMS)	Man et al. 1960
Agar jugo de tomate	
Reinforced Clostridia agar	Wilis et al. 1973
Briggs Liver (BL)	Mitsouka et al
Columbia blood agar	Comercial
Tryptona- Peptona- Extracto de Levadura (TPY) agar	Scardovi 1986

3.2.3.4 Medios Selectivos: Los requerimientos físicos de las bifidobacterias son extremadamente variados, es difícil definir un medio selectivo apropiado para todas las especies. El reciente entusiasmo de la incorporación de las bifidobacterias a los productos lácteos fermentados ha favorecido la propuesta de medios selectivos para diferenciar el género *Bifidobacterium* de otros géneros que están relacionados con los productos lácteos y además para aislar las bifidobacterias del resto de flora intestinal. Inicialmente el ácido ascórbico y el sodio son empleados como sustancias selectivas ⁽⁸⁾.

Chang *et al.* (1983) modificó el MRS agar, el medio contenía cisteína y tinta china para aislar numerosas especies de bifidobacterias y Matteuzzi *et al.* (1983) sugirió la adición de 80 µg de kanamicina/ml. Sonoike *et al.* (1986) emplearon el principio de que las bifidobacterias son capaces de metabolizar carbohidratos tales como los fructo-oligosacáridos y galactosil-oligosacáridos. Treinta y dos especies de bifidobacterias han podido desarrollarse en este medio que contiene oligosacáridos *trans*-galactosilados como fuente de carbono ⁽⁸⁾.

Tabla N° 9. Medios selectivos empleados para el aislamiento del género *Bifidobacterium* ⁽⁸⁾.

Nombre	Referencia
RCA Reinforced Clostridial agar (pH 5.0)	Willis et al 1973
BSI (Panomomicina, neomicina, propionato sódico, cloruro de litio)	Mitsuoka et al 1965
NPLN (Panomomicina, neomicina, ácido nalidixico, cloruro de litio)	Teraguchi et al 1978
Ácido nalidixico, riboflavina, ácido pívurico	Tanaka y Mutai 1980
YN-6 (ácido nalidixico, neomicina y verde de Bormocresol)	Resnick y Levin 1981
TOS (Transgalacto-oligosacárido agar)	Sonoike et al 1986

Tabla N° 9. Continuación

Nombre	Referencia
BIM-25 (a. nalidixico, polimixina, Kanamicina, ácido iodoácetico)	Munoz y Pares 1988
Ácido propionico pH 5.0	Beerens 1990
Dicloxalicina	Sozzi et al 1990
X-αGal	Chevalier et al 1991
LP (cloruro de litio y propionato sódico)	Lapierre et al 1992
Mmrs	Arroyo et al 1994
RCA con azul Prussia	Ghoddusi y Robinson 1996
Transgalacto-oligosacáridos y propionato sódico	Ji et al 1994
Sangre, glucosa agar con oxgall y Gentamicina	Lim et al 1995
BFM	Nebra et al 1999

3.3 Yogurt ^{(10) (14) (16) (17)}

2.3.1 Definición

Es el producto lácteo obtenido de la fermentación láctica mediante la acción de *Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus* a partir de leche entera, descremada, semidescremada, fortificada o no con sólidos de leche. Los microorganismos vivos presentes en el producto final deben ser de los tipos antes mencionados y su contenido abundante. Pueden contener cultivos probióticos mantenidos en pleno vigor. ⁽¹⁶⁾

Si bien se puede emplear cualquier tipo de leche, la producción actual usa predominantemente leche de vaca. La fermentación de la lactosa (el azúcar de la leche) en ácido es lo que da al yogur su textura y sabor tan distintivo. A menudo, se le añade chocolate, fruta, vainilla y otros saborizantes, pero también puede elaborarse sin añadirlos ⁽¹⁶⁾.

La definición legal francesa indica que la fermentación del yogurt se produce por *Lactobacillus delbrukeii subsp. bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus* y que estas bacterias deben encontrarse vivas en una concentración de 1000000/g o mL solo puede prepararse a partir de leche fresca, pudiéndose enriquecer con leche en polvo o gelatina, con un máximo de 5%, según sea el tipo de leche. Además debe contener 0.8% de ácido láctico ⁽¹⁷⁾.

La elaboración de yogur requiere la introducción de bacterias “benignas” específicas en la leche bajo una temperatura y condiciones ambientales controladas (muy cuidadosamente en el entorno industrial). El yogur natural o de sabores de textura firme, requiere de una temperatura de envasado de aproximadamente 43 °C, y pasar por un proceso de fermentación en cámaras calientes a 43 °C para obtener el grado óptimo de acidez; este proceso puede llegar a durar aproximadamente cuatro horas. Una vez obtenida, debe enfriarse hasta los 5 grados para detener la fermentación.

La composición química del yogurt está basada en la composición de la leche y en los sucesivos cambios de esta, que ocurren durante la fermentación láctica. Estos cambios resultan con la reducción de la lactosa y la formación del ácido láctico, péptidos libres, aminoácidos y ácidos grasos.

Las bacterias utilizan como fuente de energía la lactosa o azúcar de la leche, y liberan ácido láctico como producto de desecho; este provoca un incremento de la acidez que hace a su vez que las proteínas de la leche precipiten, formando un gel. La mayor acidez (pH 4-5) también evita la proliferación de otras bacterias potencialmente patógenas. La vida comercial del yogur estando en refrigeración es de 3 semanas, con la finalidad de mejorar la capacidad de conservación del mismo se crea el yogur pasteurizado o de larga duración, que tiene un periodo de conservación de meses y no necesita refrigeración.

3.3.2 Clasificación ⁽¹⁴⁾ ⁽¹⁶⁾

Se clasifica

De acuerdo a sus ingredientes:

- Yogurt natural: Es el que tiene el sabor, olor y textura que da exclusivamente el proceso de fermentación sin ningún aditamento.
- Yogurt azucarado: Es el yogurt natural al que se le añadido azucares como sacarosa o glucosa.
- Yogurt edulcorado: Es el yogurt natural al que se le añadido edulcorantes como sorbitol, sacarina
- Yogurt con frutas: Es el yogurt natural al que se le añadido frutas de origen natural.
- Yogurt aromatizado: Es el yogurt natural al que se le añadido aromatizantes permitidos.

De acuerdo a la textura:

- Yogur firme: incubado y enfriado en el mismo envase.
- Yogur batido: es incubado en depósitos y enfriado antes de su envasado
- Yogur líquido: similar al batido aunque el coágulo se rompe hasta obtener una forma líquida antes del envasado.
- Yogur congelado: incubado en tanques y congelado como un helado en crema.
- Yogur concentrado: incubado en tanques, concentrado y enfriado antes de ser envasado.
-

3.4 Leche de cabra y su composición. ^{(3) (5)}

Es una emulsión de grasa en una solución de agua, cuya composición varía según la especie (Tabla N° 10).

La mayoría de los componentes son similares a la leche de vaca en el contenido de sólidos totales, grasa, lactosa y los componentes nitrogenados que se dividen en componentes no-nitrogenados y proteínas. En las proteínas se encuentran las proteínas del suero (proteínas solubles, β -lactoglobulinas y α -lactoalbúminas) y las caseínas. Las proteínas solubles se encuentran en pequeñas cantidades junto con las proteasas-peptonas. Por su parte, las caseínas, que son las proteínas que coagulan en la leche, presentan marcadas diferencias respecto a la leche de vaca, esencialmente estas diferencias ocurren en el polimorfismo genético así como en la estructura, composición y tamaños de las micelas de las caseínas. ⁽⁵⁾

Tabla N° 10. Comparación de la leche de cabra y leche de vaca. ⁽⁵⁾

	Vaca	Cabra
Rendimiento (litros)	500-1000	3500-5000
Materia seca (g)	115-130	115-130
Lactosa (%)	40-50	45-50
Nitrógeno (%)	28-35	30-35
Grasa (%)	30-38	35-40
Minerales (%)	7-9	7-9

Sawaya y colaboradores (1984), destacan la importancia del aporte mineral de la leche de cabra, según la Tabla N° 10, señalando que 100g de esta contiene los minerales que aconsejan las recomendaciones dietarías para niños de 1 a 3 años.

Tabla N° 11. Composición vitamínica de la leche de diferentes especies. (5)

Vitamina	Mujer	Cabra	Vaca
A (UI)	2410	2030	1260
D (µg/ L)	0.5	0.6	-
E (mg/L)	2.3	-	-
K (µg/L)	2.1	12.0	-
B₁ (mg/L)	0.21	0.5	0.1
B₂ (mg/L)	0.34	1.4	1.4
Niacina (mg/L)	1.5	2.7	0.8
Ácido ascórbico (mg/L)	40	12.6	21
Ácido pantoténico (mg/L)	1.8	3.0	3.0
B₆ (mg/L)	0.1	0.5	0.7
B₁₂ (µg/ L)	1.0	0.7	3.5
Ácido fólico (µg/ L)	50	6	50
Colina (mg/L)	90	150	120
Insotisol (mg/L)	330	210	110

La leche de cabra contiene niveles más altos de vitaminas del grupo B, que la leche de vaca, especialmente de Riboflavina, con la salvedad de que las concentraciones de vitaminas B₆ y B₁₂ son más bajas (Jaubert y Kalantzopoulos, 1996). En cuanto a la concentración de folato en la leche de cabra, Donnelly-Vanderloo y colaboradores (1994) mostraron que es usualmente baja (21,9 nmol/litro) vs, al existente en la de vaca (142,8) o frente a la leche humana (113,7 nmol/litro), aunque la de cabra contiene folato unido a proteínas (12 jig/ml), lo cual hace que se detecte un menor contenido en este nutriente que el que aparece en la leche de vaca (Chandan y col .1992), así como que el folato

de la leche de cabra no se ve afectado por la pasteurización, cosa que si sucede con el presente en la leche de vaca (Donnelly-Vanderloo y col.,1994). Una característica importante de la leche de cabra es su elevado contenido en vitamina A y, a diferencia de la leche de vaca, no contiene precursores de esta vitamina, ésta se presenta como tal (Devendrá y McLeroy, 1986). ⁽⁵⁾

3.4.1 Principales diferencias de la leche de vaca con la leche de cabra. ^{(3) (5)}

- En la leche de vaca la α -S1 caseína es la principal caseína con 6 diferentes tipos A, B, C, E, F y “nula”. Por otro lado, las caseínas en la leche de cabra están constituidas por cuatro fracciones principales: α -S1, α -S2, beta y kappa. En la leche de vaca es la α -S1 la caseína más abundante, mientras que en la leche de cabra es la variante α -S2. Las diferencias en los tipos de variantes genéticas son debidas a los aminoácidos presentes en las cadenas de las proteínas, los cuales son los responsables de las diferencias en la digestibilidad, en las propiedades para la elaboración de quesos y en los sabores generados a los productos de la leche de cabra.
- La acción de las proteasas sobre las caseínas de la leche de cabra genera péptidos de sabor menos amargo que los obtenidos de las caseínas de leche de vaca.
- Las micelas de las caseínas de leche de cabra tienen un rango de dispersión más elevado, mayor mineralización y un nivel más bajo de hidratación que las micelas de la leche de vaca.
- La acidez de la leche de cabra (6.4%) es ligeramente menos ácida que la de vaca (6.7%).
- La leche de cabra no contiene carotenos por lo que sus productos no son de color amarillos como ocurre con los productos de la leche de vaca.

- En relación a la grasa, la leche de cabra contiene glóbulos de grasa más pequeños que los de la leche de vaca. La presencia de estos glóbulos de grasa pequeños en la leche de cabra se ha relacionado con una leche más digerible y con propiedades nutricionales importantes.
- El contenido de los ácidos: butírico (C4:0), caproico (C6:0), caprílico (C8:0), cáprico (C10:0), laúrico (C12:0), mirístico (C14:0), palmítico (C16:0) y linoleico (C18:0) es mayor, pero menor en los ácidos esteáricos (C18:0) y oleico (C18:1). Tres de los triglicéridos de cadena media (C6-C14) son llamados de “cabra” debido a que predominan en la leche de cabra.

3.4.2 Beneficios sobre la salud ⁽⁵⁾

- Los tres triglicéridos de cadena media (C6-C14) han sido utilizados clínicamente en tratamientos médicos de diversos desórdenes clínicos como: Síndrome de la mala absorción, alimentación de bebés prematuros, desnutrición infantil, fibrosis quística, epilepsia, etc. debido a que estos ácidos proveen directamente la energía en lugar de ser depositados en tejido adiposo.
- El consumo de leche de cabra reduce los niveles de colesterol y mantiene normales los niveles de triglicéridos, HDL, GOT y GPT.
- La leche por contener su Lactosa parcialmente degradada es utilizada para la preparación de yogurt, lo que lo hace más digerible para niños y personas de la tercera edad.

3.4.3 Yogurt a base de leche de cabra ⁽³⁵⁾

En general los métodos de procesamiento en la leche cabra son los mismos que los utilizados en la leche de vaca, los cuales consisten en la reducción del pH y la actividad del agua para prolongar su vida de anaquel.

Así, la leche de cabra puede ser pasteurizada o esterilizada, siendo la pasteurización el método más efectivo y barato para destruir microorganismos sin afectar los nutrientes en la leche, especialmente las proteínas.

El yogurt se elabora de leche pasteurizada por razones de seguridad y es obtenido por acidificación de la leche mediante cultivos de *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus*, aunque también se han empleado otros microorganismos del tipo probiótico, es decir, que proporcionan beneficios a quien los ingiere.

3.4.4 Desventaja ⁽³⁵⁾

El yogurt de leche de cabra ha sido caracterizado por dureza, adhesividad y fuerza de extrusión más baja y una mayor susceptibilidad a la sinéresis que los yogurts de leche de vaca y de oveja, tales propiedades son atribuibles al total de proteína en la leche de cabra comparada con el contenido de las leches de vaca y oveja.

3.5 Situación mundial de la producción caprina. ⁽³⁾

Para 1986, la FAO estimaba la población mundial en 1,500 millones caprinos. El 95% de las cabezas corresponden a países subdesarrollados. De ese total el 90% de los caprinos se hallaban en Asia y África; en Europa el 3% y en Norte y Centro América el 2% finalizando con un 4.2% en Sur América. ⁽¹⁵⁾

Actualmente, se estima que existe una población mundial de 720 millones de cabras las cuales están distribuidas de la siguiente manera: 55.4% en Asia, 29.8% en África, 7.3% en Sudamérica, 4.4% en Europa, 3% en Norte y Centroamérica, 0.1% en las Islas del Pacífico.

La cría de cabras tiene un importante papel en la alimentación humana con una gran importancia social sobre todo en los países subdesarrollados, ya que la

ingestión de proteína animal por habitante en estos países rara vez excede los 10 gramos por día, cuando en los desarrollados alcanza alrededor de los 55 gramos. Las cabras proporcionan más de 280,000 toneladas de carne y 7.2 millones de toneladas de leche, constituyendo así una fuente muy importante de alimentos para muchos países ⁽³⁾.

En México existen 494,000 unidades de producción caprina y aproximadamente 1.5 millones de mexicanos tienen como actividad productiva primaria o complementaria a la caprinocultura. Los estados con mayor población caprina son: Puebla con el 15.4 % de la población total nacional, Oaxaca con el 12%, San Luís Potosí con el 10.5, Guerrero con el 7.9 y Zacatecas con el 6.1 %. Dentro de los Estados más productores de leche, sobresalen Coahuila con el 37.2 % del total nacional, Durango 21%, Guanajuato 16.8%, Nuevo León 9.9%, Jalisco 3.7% y Zacatecas 3.2 % ⁽³⁾.

Entre las estrategias a largo plazo que los países desarrollados han implementado en el desarrollo de sus sistemas de producción de leche caprina se enumeran:

- a) Mejorar los sistemas de monitoreo de la calidad de la leche y de producción de manera permanente.
- b) Implementar la inseminación artificial (IA) y demás tecnologías reproductivas.
- c) Implementar programas eficientes de sanidad caprina.
- d) Desarrollar y comercializar productos caprinos novedosos y con mayor plusvalía. ⁽⁵⁾

Según el CATIE (1987), la población caprina de El Salvador se estimaba en 14,000 cabezas, ubicándose en el tercer lugar en Centro América después de Guatemala (105.000 cabezas) y Honduras (22,000 cabezas) siendo Costa Rica

el cuarto lugar (7,000 cabezas) y Nicaragua el último lugar con 6,000 cabezas de caprinos ⁽¹⁹⁾.

Para Galdámez (1988), en El Salvador debido al crecimiento acelerado en cuanto a promoción y reproducción de la misma se considera un incremento entre el 10 – 15% ⁽¹⁹⁾.

La tendencia productiva natural de un hato caprino en nuestro país, tal como se muestra en la Figura N°4, no influye el potencial genético, es decir las cabras recién paridas varían solamente la cantidad de leche producida así: a mayor potencial genético, mayor cantidad de leche.

El pico o máxima producción de leche en el año se da para el mes de marzo y la mínima en septiembre para iniciar subsecuentemente el alza productiva en el mes de octubre. ⁽¹⁹⁾

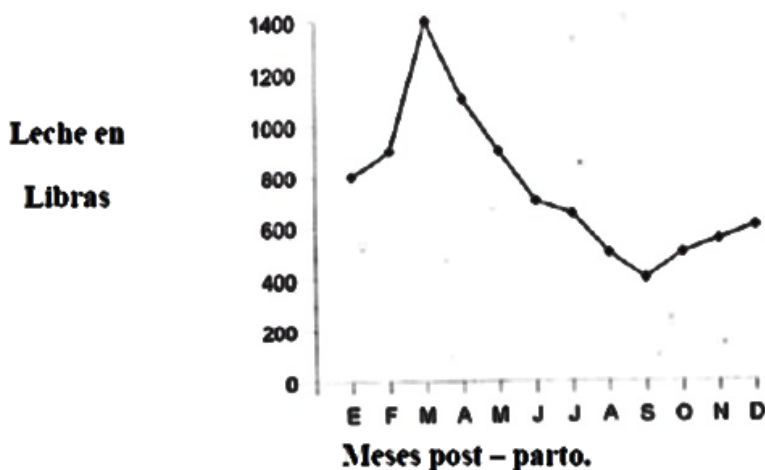


Figura N°4. Curva de Lactancia de un hato caprino cualquiera en El Salvador ⁽¹⁹⁾

3.6 Género *Salmonella* ^{(2) (9) (25) (33)}

3.6.1 Características microbiológicas y bioquímicas ⁽⁹⁾

Es un género de bacteria que pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, denominado en honor a un microbiólogo estadounidense, D. E. Salmon ⁽⁹⁾.

formado por bacilos gram-negativos, anaerobios facultativos, móviles con flagelos peritricos (Excepto *S. gallinarum*) y que no desarrollan cápsula ni esporas. La diferencia entre las especies y subespecies se realiza tomando en cuenta las pruebas bioquímicas. No fermentan la lactosa, excepto la *Salmonella choleraesuis subsp Arizonae* y *Salmonella choleraesuis subsp diarizonae*, fermentan glucosa con producción de gas (excepto *S. thyphi*), no producen indol, no degradan la urea, descarboxilan Lisina y Ornitina. Las salmonellas se desarrollan entre 8 y 45°C, a un pH de 4 a 8; no sobreviven a temperaturas mayores de 70°C.

Las bacterias de este género poseen metabolismo fermentativo y oxidativo; fermenta glucosa con producción de ácido y gas (excepto *S. thyphi*) también fermentan L-arabinosa, maltosa, D-manitol, D-manosa, L-ramnosa, D-sorbitol, trehalosa, D-xilosa y D- dulcitol. Son oxidasa negativo, catalasa positivo, Indol y Voges-Proskauer negativos, rojo de metileno y citrato de Simmons positivo. Entre otras características bioquímicas se encuentran la reducción de nitratos a nitritos, no desaminan la fenilamina y son tetrionato reductasa. Crecen en un amplio rango de temperatura (7-28°C), el rango de su pH ideal para su crecimiento es entre 6.6 y 8.7; son incapaces de tolerar altas concentraciones de sal y sobreviven en agua congeladas durante periodos prolongados. ⁽²⁵⁾

Salmonella es resistente a ciertas sustancias químicas (por ejemplo, verde brillante, tetrionato de sodio, desoxicolato sódico) que inhiben otras bacterias entéricas.

Inicialmente se agruparon más de 2000 especies (serotipos) en función de sus antígenos flagelares (H) y somáticos (O).

3.6.2 Clasificación ⁽⁹⁾

A través de los años se han propuesto varios esquemas de clasificación que introdujeron controversias y confusión en una compleja taxonomía de *Salmonella*. Cuando se identificaron las primeras cepas de este género, fue clasificada en tres especies *Salmonella thypi*, *Salmonella choleraesuis* y *Salmonella entérica*, ubicándose en esta última la mayoría de serovares. La siguiente nomenclatura fue utilizada donde se reconocían por métodos serológicos e hibridaciones ADN-ADN, la existencia de dos especies la *Salmonella bongori* y *Salmonella choleraesuis*. Esta última especie a la vez se subdividía en 6 subespecies, las cuales *Salmonella choleraesuis subespecie choleraesuis* incluía la mayoría de serovares. Sin embargo, al haber un serotipo de *S. choleraesuis* que podía causar confusión, el Comité Internacional de Bacterología Sistemática de XIV congreso Internacional de Microbiología, recomendó cambiar el nombre de *S. choleraesuis* a *S. entérica*, porque de esta última no había ningún serotipo. ⁽⁹⁾

El género *Salmonella* está dividido en dos especies:

1. *Salmonella entérica*, dividida en seis subespecies:
 - a. Subespecie I. *S. entérica subespecie entérica*: Humanos y animales de sangre caliente.
 - b. Subespecie II. *S. entérica subespecie salamae*: Animales de sangre fría y de ambiente.
 - c. Subespecie IIIa. *S. entérica subespecie arizonae*: Animales de sangre fría y de ambiente.
 - d. Subespecie IIIb. *S. entérica subespecie diarizonae*: Animales de sangre fría y de ambiente.
 - e. Subespecie IV. *S. entérica subespecie houtenae*: Animales de sangre fría y de ambiente.

- f. Subespecie V. *S. entérica* subespecie indica: Animales de sangre fría y de ambiente.
- 2. *Salmonella bongori* subespecie V. No constituye un patógeno para los humanos pero si ha sido implicada en ciertas patologías de animales. ⁽²³⁾

Cada subespecie, a su vez está dividida en serotipos o aserovares que surgen como consecuencia de una asociación particular de factores antígenos somáticos (O), flagelares (H) y del antígeno capsular Vi. Los antígenos somáticos están compuestos por complejos de fosfolípidos y polisacáridos. Son cadenas laterales de polisacáridos del lipopolisacárido de pared celular (LPS) que se encuentran en la membrana externa de las bacterias gram negativas y actúan como barrera protectora ante agentes externos ⁽³²⁾.

Los Flagelos son estructuras compleja y sensible al calor, cuerpo basal, un segmento de unión y un filamento. El antígeno capsular Vi, se encuentra solo en *S. thypi*, *S. parathypi* y algunas cepas de *S. dublin* ⁽³²⁾.

3.6.3 Reservorio ⁽¹⁵⁾

El principal reservorio de *Salmonella* son las aves de corral, el ganado vacuno y el porcino; por lo tanto, son fuentes de infección importantes las carnes de estos animales y los huevos.

Tradicionalmente, los ovoproductos y los preparados a base de huevo han sido los alimentos que han causado el mayor índice de brotes de *Salmonella* y los de mayor riesgo sanitario, especialmente aquellos que contienen huevo crudo, como la mayonesa, las salsas, los helados, las cremas, las masas de pastelería, etc. Otros alimentos implicados son la leche no pasteurizada, el chocolate, así como los brotes de semillas de soja o alfalfa y las carnes poco cocinadas, principalmente de cerdo, de ave y carnes fermentadas.

Los serotipos más frecuentemente implicados en brotes en las granjas son:

- En cerdos: *Salmonella typhimurium* (en Europa) y *Salmonella choleraesuis* (en América).
- En aves: *Salmonella pullorum* y *Salmonella gallinarum* (declaración obligatoria)
- En bovino: *Salmonella dublin*

3.6.4 Patogenia ⁽¹⁵⁾ ⁽²⁵⁾

La principal puerta de entrada de la *Salmonella* es la vía oral, por contacto con heces de animales infectados, vía fecal-oral. Resistente al pH del estómago, sales biliares y peristaltismo, coloniza el intestino delgado e invade los ganglios linfáticos mesentéricos, provocando una infección localizada ⁽²⁵⁾.

La *Salmonella* evade las defensas intracelulares de las células intestinales sin ser destruida y comienza a dividirse dentro de la célula. Posteriormente, pasa a la sangre y produce una infección sistémica, multiplicándose en macrófagos, y localizándose en hígado, bazo, médula ósea, etc. Se elimina por las heces, y se multiplica en el ambiente, donde es muy resistente. En caso de entrada por vía aerógena, se produce una invasión en las amígdalas y los pulmones ⁽²⁵⁾.

Los numerosos serotipos de *Salmonellas* manifiestan distinta patogenicidad y virulencia, y se pueden dividir también, según su adaptación al hospedador:

Serotipos adaptados al hombre:

Salmonella typhi

Salmonella paratyphi A, B (aves) y *C*

Salmonella sendai

Serotipos adaptados a animales:

Aves: *Salmonella pullorum* y *Salmonella gallinarum*

Vacuno: *Salmonella dublin*

Ovino: *Salmonella abortusovis* (declaración obligatoria)

Equino: *Salmonella abortusequi*

Cerdo: *Salmonella choleraesuis*

Conejos: una serovariedad perteneciente a la subespecie *IIIa*, típica de animales de sangre fría, ha conseguido adaptarse a los conejos y produce cuadros clínicos graves.

Otros serotipos no adaptados a hospedadores específicos (infectan a muchos animales, entre ellos al conejo, y también a personas): *Salmonella typhimurium* y *Salmonella enteritidis*

3.6.5 Salmonelosis ⁽¹⁵⁾ ⁽²⁵⁾

Constituye un grupo de infecciones producidas por microorganismos del género *Salmonella* sp. adquiridas por la ingestión de alimentos o bebidas contaminadas, caracterizadas por presentar síndromes febriles asociadas a las manifestaciones gastrointestinales sistémicas, con frecuencias severas. Las manifestaciones clínicas de la salmonelosis en humanos y animales se presentan básicamente bajo tres modalidades: ⁽¹⁵⁾

- Fiebres entéricas (fiebre tifoidea)

Sólo unos cuantos tipos de salmonella producen este síndrome, entre ellos la *Salmonella typhi* es el más importante. Las salmonellas ingeridas alcanzan el intestino delgado, desde el cual penetran a los ganglios linfáticos y luego al torrente sanguíneo. Se transportan a la sangre a muchos órganos, incluso el

intestino. Los microorganismos se multiplican en el tejido linfoide intestinal y se excretan en las heces.

Luego de un periodo de incubación de 10 días a 14 días se presentan fiebre, cefalea, estreñimiento, bradicardia y mialgia. La fiebre se eleva hasta una meseta máxima y el bazo y el hígado se hipertrofian. Con frecuencia se observan sobre la piel del abdomen y del tórax manchas de color rosáceos, fugaces en pocos casos.

- Bacteriemia con lesiones focales

Ésta se asocia por lo común con *S. choleraesuis*, pero puede ser causada por cualquier otro tipo de serotipo de salmonela. Posteriormente a la infección bucal, hay una invasión temprana de la circulación (con posibles lesiones focales en pulmones, huesos, meninges, etc), pero las manifestaciones intestinales están, a menudo ausentes.

- Enterocolitis

Ésta es la infección más común por salmonela. En EUA, *Salmonella thyphimorium* y *Salmonella enteritidis* son de los microorganismos casuales más sobresalientes, aunque también puede ser causada por cualquier otro serotipo. En 8 a 48 horas después de la ingestión de las salmonelas aparecen náuseas, cefalea, vómito, diarrea profusa, con pocos leucocitos en las heces; es común la fiebre de poca intensidad, pero por lo general los síntomas desaparecen en 2 a 3 días.

3.6.6 *Salmonella Choleraesuis* ⁽⁹⁾

Serotipo o especie del género *Salmonella* que generalmente es encontrada en la carne infectada del cerdo o productos derivados de esta. También es agente

causante de la salmonelosis; pero su infección es muy asociada a la bacteriemia con lesiones focales.

Es un serotipo con poca frecuencia de aislamiento en los países de Estado Unidos, Canada y el Reino Unido; en contraste con algunos países asiáticos como Taiwan y Tailandia donde ha llegado a ser el décimo serotipo causante de salmonelosis. Es altamente adaptable e invasivo al ambiente.

Existen pocas investigaciones con este serotipo de *Salmonella* a comparación del serotipo *S. thyphimuriunm* en términos de patogénesis bacteriana ⁽⁹⁾.

CAPITULO IV
DISEÑO METODOLOGICO

4.0 DISEÑO METODOLOGICO

4.1 Tipo de Estudio

4.1.1 Estudio experimental: Fue una investigación *In vitro*, donde se realizó la determinación de la sobrevivencia de *Salmonella choleraesuis* ATCC 10708 a diferentes concentraciones, a través del método de cuantificación, recuento en placa vertida en el Laboratorio de Microbiología de Alimentos del Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD).

4.1.2 Estudio transversal: Se evaluó la sobrevivencia de *Salmonella choleraesuis* ATCC 10708, la tolerancia de la mezcla de probióticos ABY-3 a las sales biliares y al pH del estómago, durante los meses de Abril a Octubre del año 2014.

4.1.3 Estudio prospectivo: Es una investigación que se plantea como un antecedente para investigaciones futuras, donde posiblemente puede desarrollarse o continuarse el estudio de forma in vivo.

4.2 Investigación bibliográfica:

La recopilación de información bibliográfica se llevará a cabo en las bibliotecas:

- “Dr. Benjamín Orozco”, Facultad de Química y Farmacia, Universidad de El Salvador.
- Central de la Universidad de El Salvador
- Ciencias Agronómicas de la Universidad de El Salvador.
- Biblioteca Facultad de Medicina, Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Salvadoreña Alberto Masferrer.
- Biblioteca Central de Universidad Centroamericana José Simeón Cañas.

- Ministerio de Salud de El Salvador
- Internet

4.3 Investigación de campo: Obtención de materias primas.

Las materias primas para la elaboración del yogurt con mezcla de probióticos ABY-3 y del yogurt sin mezcla ABY-3, se adquirieron de la siguiente manera:

La leche de cabra se seleccionó y se obtuvo en la zona paracentral del país, específicamente en el municipio de Zacatecoluca, realizando previamente una investigación del origen de las cabras, es decir, conociendo si estas fueron tratadas con antibióticos o si estas habían presentado alguna enfermedad como mastitis u otra que pudiese afectar la calidad de la leche. Para ello se le realizó una breve entrevista a las personas comerciantes de este tipo de leche y se observaron previamente cada una de las cabras utilizadas para la obtención de la leche.

La mezcla ABY-3 se obtuvo de una empresa importadora y exportadora de probióticos en diferentes presentaciones que suministran a fabricantes de yogurt en el país, anexando en esta investigación el certificado extendido (ver Anexo N° 13). Los cultivos iniciadores utilizados para la elaboración de yogurt sin mezcla de probióticos ABY-3 fueron facilitados por los docentes asesores de esta investigación.

La cepa patógena *Salmonella choleraesuis* ATCC 10708, se obtuvo a través de una empresa privada encargada de análisis microbiológicos de diferentes alimentos para lo cual permitió el acceso a las instalaciones y al uso de la bacteria.

La gelatina en polvo se adquirió por medio de un proveedor de materias primas y el azúcar fue adquirida por medio de un supermercado cercano a las instalaciones donde se llevó a cabo la investigación.

4.4 Parte Experimental

4.4.1 Mantenimiento de cultivo de *Salmonella choleraesuis* ATCC 10708 ⁽¹⁸⁾ ⁽²⁵⁾ (Anexo N° 3)

- A partir de un criovial que contenía la cepa *Salmonella choleraesuis* ATCC 10708 y que estuvo en congelación, se tomó una colonia y se colocó en un tubo que contenía 10 ml de caldo Cerebro Corazón (BHI).
- Se repitió la operación para obtener una cantidad viable de bacterias.
- Se incubaron los tubos por 72 horas a 35 ± 2 °C.
- Se revisaron los tubos y se observaron aquellos que presentaron turbidez, desarrollando crecimiento de bacteria.
- Se transfirió una asada de cada tubo a una placa de agar TSA.
- Se incubaron las placas por 24 - 48 horas a 35 ± 2 °C.
- Se revisaron las placas de agar TSA que presentaron colonias traslucidas y con relativa mucosidad. Estas seguidamente fueron conservadas en refrigeración.
- Posteriormente se realizó una suspensión con 10 ml de solución salina estéril al 0.9%, tomando de 2 a 3 colonias aisladas de las placas.

4.4.2 Identificación de *Salmonella choleraesuis* ATCC 10708. ⁽⁷⁾ ⁽⁹⁾ ⁽¹⁸⁾ ⁽²⁵⁾ ⁽³²⁾ (Anexo N°4)

A partir de las placas de agar TSA que fueron conservadas en refrigeración se realizaron las siguientes pruebas:

4.4.2.1 Triple Sugar Iron Agar (TSI) ⁽⁷⁾ ⁽²⁵⁾

- Se tomaron colonias aisladas de la placa de TSA y se colocaron en un tubo inclinado con agar TSI e incubándolo a 37°C por 18-24 horas.

- Después de transcurrido el tiempo de incubación, se observó un cambio de color en el medio inclinado: amarillo en el bisel y azul en el fondo (A/K), con producción de gas y sulfuro de hidrógeno (H₂S).

4.4.2.2 Caldo UREA (7) (25) (32)

- Se tomaron las colonias aisladas de la placa de TSA y se colocaron en 3 mL de caldo urea.
- Se incubaron a 37°C por 18-24 horas.
- Después de transcurrido el tiempo de incubación, se observó que el caldo no había cambiado de color, lo cual indicaba urea negativo.

4.4.2.3 Agar Xilosa-Lisina-Desoxicolato (XLD), Bismuto sulfito (BS) y Agar Sulfa Verde Brillante (AVS) (7) (18) (32)

- Se tomaron colonias aisladas de la placa con agar TSA y se estirió en placa de 3 que contenga cada uno de los agares.
- Se incubó la placa a 37°C por 18-24 horas.
- Después de transcurrido el tiempo de incubación, se observó en el agar XLD colonias rosadas con bordes amarillos, sin centros negros. En el agar BS se presentaron colonias negras con espejo plateado sobre y alrededor de ellas. Observando también en el agar AVS colonias rojas.

4.4.2.4 Tinción de Gram (7) (25) (32)

- Se tomaron de 2-3 colonias y se realizó la fijación del frotis utilizando una gota de agua estéril en un portaobjetos y la aplicación de calor por medio de la llama de un mechero, cuidadosamente.
- Se agregó 1 ó 2 gotas de solución de cristal violeta sobre el frotis y se esperó por 1 minuto.

- Seguidamente se lavó el portaobjetos con agua desmineralizada, secando suavemente las orillas con papel o algodón y con cuidado de no arrastrar el frotis.
- Se agregó 1 ó 2 gotas de Lugol sobre el frotis y se esperó por 1 minuto.
- Continuamente se lavó el portaobjetos con agua desmineralizada, secando suavemente las orillas con papel o algodón y con cuidado de no arrastrar el frotis.
- Se colocó una gota de alcohol sobre el frotis y rápidamente se lavó con agua desmineralizada, secando suavemente las orillas con papel o algodón y con cuidado de no arrastrar el frotis.
- Posteriormente se colocó 1 ó 2 gotas de Safranina sobre el frotis y se esperó por 1 minuto.
- Se lavó el portaobjetos con agua desmineralizada, secando suavemente las orillas con papel o algodón y con cuidado de no arrastrar el frotis.
- Finalmente se observó con el microscopio con el objetivo de inmersión.

4.4.2.5 Prueba API (9) (18) (32)

- Primeramente se seleccionaron de las placas con agar TSA, colonias aisladas y se realizó una suspensión con 10mL solución salina estéril 0.9%.
- Se obtuvo una suspensión comparable con un tubo de concentración 0.5 MacFarland.
- Seguidamente se preparó una cámara de incubación API 20E colocando en cada espacio gotas de agua desmineralizada, rotulando la cámara y colocando su respectiva galería de reactivos API 20E.
- Se procedió a colocar gotas de la suspensión en cada uno de los tubos del set, evitando dejar burbujas en el interior y evitando llenar la cúpula de cada tubo. Teniendo el cuidado de llenar completamente (pocillo y cúpula) los tubos CIT, VP y GEL.

- Se cubrió con aceite mineral las cúpulas de los tubos ADH, LDC, ODC, URE y H₂S.
- Posteriormente se incubó la cámara a 37°C por 18-24 horas.
- Después del periodo de incubación se realizó la lectura de la prueba y se ingresaron los resultados a una base de datos hasta obtener los resultados.

4.4.3 Estandarización de bacteria patógena *Salmonella choleraesuis* ATCC 10708 ⁽¹⁾ (Anexo N°5).

La estandarización se realizó por el método espectrofotométrico, Dilución-Neutralización de la siguiente manera:

- Primeramente se sembró la bacteria en placas que contienen agar TSA y se incubaron a 35 ± 2 °C por 24-48 horas.
- Después del periodo de incubación, se sembraron las colonias en tubos con agar TSA inclinado e incubándolos a 35 ± 2 °C por 24-48 horas.
- Luego del periodo de incubación, se preparó una suspensión madre y se realizó la lectura del valor de su absorbancia a 620nm en un espectrómetro uv-visible.
- Se procedió a diluir o concentrar la suspensión hasta obtener un valor entre 0.2-0.3 de absorbancia, equivalente a $1-3 \times 10^8$ bacterias/mL para bacilos Gram negativos.
- Se pipeteó 1 mL del tubo con absorbancia ajustada y se inoculó en un tubo que contiene 9mL de solución salina al 0.9%, el cual correspondía a una concentración de 10^7 UFC/mL.
- Continuamente se tomó 1 mL del tubo anterior y se inoculó en un tubo que contiene 9mL de solución salina al 0.9%, el cual correspondía a una concentración de 10^6 UFC/mL.

- Consecutivamente se realizó las diluciones necesarias hasta llegar a la concentración 10^2 UFC/mL de *S. choleraesuis* ATCC 10708. Esto se llevó a cabo tanto para el tubo 10^7 y 10^6 UFC/mL.
- De las dos últimas diluciones se colocó 1mL por duplicado en placas Petri y se agregó aproximadamente 20mL de agar XLD, removiendo en ocho para homogenizar y dejando que se solidifiquen adecuadamente.
- Posteriormente se incubaron las placas por 24-48 horas a 35 ± 2 °C.
- Luego del periodo de incubación se realizaron las lecturas de las colonias para determinar la concentración de cada dilución hasta obtener un recuento de 10^6 UFC/mL para poder preparar la bacteria a las diluciones de trabajo (10^3 , 10^4 y 10^5).

4.4.4 Estandarización de la mezcla de probióticos ABY-3 ₍₁₎ (Anexo N°6).

- Primeramente se pesó 0.1 g de la mezcla ABY-3 de probióticos adicionándolo a un tubo que contenía 10 ml de caldo MRS.
- El tubo se incubó por 72 horas a $35^\circ\text{C} \pm 2$ °C en condiciones de anaerobiosis.
- Luego del periodo de incubación se preparó una suspensión madre y se llevó a cabo la lectura de su absorbancia a 620nm en un espectrofotómetro UV-visible.
- Tras su lectura se procedió a diluir o concentrar la suspensión hasta obtener un valor entre 0.3-0.4 de absorbancia, equivalente a $1-3 \times 10^8$ bacterias/mL para cocos Gram positivos.
- Se pipeteó 1 mL del tubo con absorbancia ajustada y se inoculó en un tubo que contenía 9mL de solución salina al 0.9%, el cual correspondía a una concentración de 10^7 UFC/mL.

- Del tubo anterior se tomó 1 mL y se inoculó en un tubo que contenía 9mL de solución salina al 0.9%, el cual correspondía a una concentración de 10^6 UFC/mL.
- Consecutivamente se realizaron las diluciones necesarias hasta llegar a la concentración 10^2 UFC/mL de bacterias acidolácticas. Esto tanto para el tubo 10^7 y 10^6 UFC/mL.
- De las dos últimas de las diluciones se pipeteó 1 mL y se inoculó en placas Petri, agregando aproximadamente 20mL de agar MRS y removiendo en ocho para homogenizar. Esto se realizó por duplicado y permitiendo que las placas se solidificaran adecuadamente.
- Las placas se incubaron por 72 horas a 35 ± 2 °C, en condiciones de anaerobiosis.
- Luego del periodo de incubación se realizó las lecturas de las colonias para determinar la concentración de cada dilución.

4.4.5 Elaboración de yogurt con mezcla ABY-3 ^{(17) (22) (25)} (Anexo N°7).

La elaboración del yogurt con mezcla ABY-3 se realizaron utilizando ingredientes naturales, de la siguiente manera:

- 2 litros de leche de cabra se colocaron en un recipiente adecuado y resistente al calor. Este se calentó a una temperatura de 85°C por 5 minutos y se enfrió rápidamente a 43°C en un baño de agua fría.
- Se pesó 2.35 g de gelatina como agente de consistencia y 100.0 g de azúcar.
- Se agregó primeramente la gelatina previamente pesada, disolviendo y humectando sobre la leche de cabra pasteurizada por 10 minutos aproximadamente.

- Se agregaron los 100 g de azúcar y se disolvieron sobre la leche de cabra pasteurizada por 5 minutos aproximadamente.
- Seguidamente se pesó 0.001 g de la mezcla los probióticos ABY-3 y se disolvió agitando por 3 minutos aproximadamente sobre los 2 litros de leche de cabra.
- Posteriormente el recipiente se incubó a una temperatura de 40-45°C durante 8 horas para obtener la fermentación completa de la leche.
- Después transcurrido el tiempo de incubación, se removi6 suavemente el recipiente para romper el cuajo formado.
- Se colocó la cantidad de yogurt en los recipientes finales y se refrigeraron a una temperatura de 4°C.

4.4.6 Elaboración de yogurt sin mezcla ABY-3 (17) (22) (25) (Anexo N° 8).

- 2 Litros de leche de cabra se colocaron en un recipiente adecuado y resistente al calor.
- Se calentó el recipiente a una temperatura de 85°C por 5 minutos y se enfrió rápidamente a 43°C en un baño de agua fría.
- Se pesaron 2.35 g de gelatina como agente de consistencia y 100.0 g de azúcar, donde primeramente la gelatina se disolvió y se humectó sobre la leche de cabra pasteurizada por 10 minutos aproximadamente.
- Se agregaron los 100 g de azúcar y se disolvieron sobre la leche de cabra pasteurizada por 5 minutos aproximadamente.
- Se pesaron g de cultivos iniciadores y se disolvieron agitando por 3 minutos aproximadamente.
- El recipiente incubó una temperatura de 40-45°C durante 8 horas para obtener la fermentación completa de la leche.

- Posteriormente se removió suavemente el contenido del recipiente para romper el cuajo formado, después de transcurrido el tiempo de incubación.
- Se colocó la cantidad de yogurt en los recipientes finales y se refrigeraron a una temperatura de 4°C.

4.4.7 Preparación de muestras de yogurt con mezcla ABY-3 y yogurt sin mezcla ABY-3 ⁽²⁵⁾ (Anexo N°1)

- Se lavaron 40 recipientes plásticos, se tararon y se identificaron adecuadamente. (Anexo N°1).
- El contenido de yogurt con mezcla ABY-3 se fraccionó pesando en balanza granataria. Haciendo un total de 20 muestras iguales en peso, elaborando 5 muestras por día de monitoreo y 4 muestras por concentración de inóculo de *Salmonella choleraesuis* ATCC 10708.
- Se procedió a fraccionar de igual manera para el yogurt sin mezcla ABY-3.

4.4.8 Inoculación de *Salmonella choleraesuis* ATCC 10708 en muestras de yogurt con mezcla ABY-3 y muestras de yogurt sin mezcla ABY-3 ⁽²⁵⁾ (Anexo N° 9).

- A partir del tubo que contiene el *Salmonella choleraesuis* ATCC 10708 previamente estandarizado a 10^6 UFC/mL, se pipeteó 1mL y se transfirió a un tubo con 9mL de agua peptonada, el cual correspondía a la dilución 10^5 , agitando el tubo hasta homogenizar.
- Se transfirió 1mL de la dilución anterior a otro tubo con 9mL de agua peptonada y se agitó hasta homogenizar, el cual correspondía a la

dilución 10^4 UFC/mL. Y desarrollando de la misma manera la dilución 10^3 UFC/mL.

- Una vez hechas las concentraciones se inoculó 1 mL de la dilución 10^6 de *S. choleraesuis* ATCC 10708 para cada una de las muestras de yogurt con mezcla ABY-3, correspondiente a los días 0, 5, 8, 16 y 30. Agitando previamente cada muestra antes de su inoculación.
- Se inoculó las muestras con yogurt con mezcla ABY-3 de igual manera para las concentraciones 10^5 , 10^4 , y 10^3 UFC/mL de *Salmonella choleraesuis* ATCC 10708.
- Posteriormente se refrigeraron las muestras inoculadas a 4°C .
- Se procedió de igual forma para las muestras preparadas de yogurt sin mezcla ABY-3.

4.4.9 Conteo de bacterias acidolácticas en el yogurt con mezcla ABY-3 y en el yogurt sin mezcla ABY-3 durante 0, 5, 8, 16 y 30 días ⁽¹⁸⁾ ⁽²⁵⁾ (Anexo N° 10).

- Primeramente se agitó cada una de las muestras hasta su completa homogenización.
- Se tomó una alícuota de 1 mL de la muestra y se transfirió a un tubo conteniendo 9 mL de agua peptonada estéril, el cual correspondía a la dilución 10^1 y se homogenizó el contenido del tubo.
- Se transfirió 1 mL del tubo anterior a otro tubo que contiene 9 mL de agua peptonada y se homogenizó correctamente, el cual correspondía a la dilución 10^2 .
- Se procedió de la misma forma para las diluciones 10^3 , 10^4 y 10^5 .
- Seguidamente se tomó 1 mL de cada tubo de las últimas dos diluciones, y se transfirió a una placa Petri, realizándolo por duplicado.

- Consecutivamente se vertió sobre la placa Petri aproximadamente 20mL de agar MRS y se agitó con movimientos en forma de 8.
- Se permitió que se solidificaran las placas a temperatura ambiente. Para que posteriormente se incubaran las placas a 37°C en una jarra de anaerobiosis al 5% de CO₂ durante 72 horas.
- Posteriormente se realizó el conteo de bacterias acidolácticas por medio del contador de colonias y su respectivo cálculo.
- Realizando todo el procedimiento anterior para cada una de las muestras a los días 0, 5, 8, 16 y 30 de un mes.

4.4.10 Medición de pH en el yogurt con mezcla ABY-3 y yogurt sin mezcla ABY-3 durante los días 0, 5, 8, 16 y 30 días. ⁽²⁵⁾ ⁽³⁴⁾ (Anexo N° 14)

- El pHmetro fue calibrado previamente con Buffer fosfato pH 7.0 y Buffer fosfato pH 4.0
- Luego se agitó la muestra hasta su completa homogenización.
- Se sumergió adecuadamente el electrodo del equipo en el recipiente que contiene la muestra y se realizó la lectura esperando que se estabilice el equipo y anotando el dato.
- Se retiró el electrodo de la muestra y se llevó a cabo su limpieza del después de su uso con agua destilada y secando con papel Klenex cuidadosamente. Esto se realizó para cada una de las muestras de los días 0, 5, 8, 16 y 30.

4.4.11 Determinación de la sobrevivencia de *Salmonella choleraesuis* ATCC 10708 frente a las bacterias acidolácticas del yogurt con mezcla ABY-3 y yogurt sin mezcla ABY-3. ⁽²⁰⁾ ⁽²⁵⁾ (Ver anexo 11)

A cada una de las muestras de un día de monitoreo y de cada concentración de *Salmonella choleraesuis* ATCC 10708 inoculada, se realizaron las diluciones

necesarias hasta llegar a la dilución de 10^1 (Anexo N° 11) de la siguiente manera:

- Se pipeteó 1mL de muestra de yogurt con mezcla ABY-3 y se transfirió a un tubo con 9mL de agua peptonada, el cual correspondía a la dilución siguiente de la que rotula la muestra. Agitando el tubo hasta completa homogenización.
- Consecutivamente se transfirió 1mL del tubo anterior a otro tubo con 9mL de agua peptonada y se agitó hasta homogenizar, el cual correspondía a la dilución siguiente.
- Se procedió de igual forma hasta llegar a la dilución 10^1 .
- Posteriormente se pipeteó 1mL de cada una de las últimas dos diluciones preparadas y se transfirió a una placa Petri. Llevando a cabo esto por duplicado.
- Seguidamente se vertió sobre las placas aproximadamente 20mL de agar XLD y se agitaron con movimientos en forma de ocho hasta homogenizar.
- Se permitió que se solidificaran las placas y se incubaran a $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 24-48 horas.
- Se realizó el conteo de las colonias de *Salmonella choleraesuis* ATCC 10708 después del tiempo de incubación por medio de un contador de colonia. Y se realizó el procedimiento anterior para cada una de las muestras del yogurt sin mezcla ABY-3 en un día de monitoreo.

4.4.12 Evaluación de la tolerancia de la mezcla de probióticos ABY-3 a las sales biliares y al pH ácido del estómago. ⁽²⁵⁾ ⁽³¹⁾ (Anexo N° 12)

- Inicialmente se preparó 30mL de Caldo MRS y se repartieron en 2 Erlenmeyer en volúmenes iguales.

- Se rotuló un Erlenmeyer como Sistema A y al otro como Sistema B, siendo el primero el que se evaluó el pH ácido del estómago y el último donde se evaluó la tolerancia a las sales biliares.
- Al sistema A se le ajustó el pH hasta un valor de 2.0, utilizando HCL 3M o NaOH 3M.
- Posteriormente se esterilizaron los dos sistemas en autoclave a 125°C por 15 minutos a 15 libras de presión.
- Luego se prepararon las sales biliares de origen bovino al 0.3% y se adicionaron 0.3mL (300µL) solamente al sistema B.
- Se transfirió 1.0 mL de mezcla de probióticos ABY-3 estandarizada previamente a 10^6 UFC/mL, sobre los dos sistemas preparados.
- Los sistemas se incubaron a 37°C por 2 horas en jarra de anaerobiosis al 5% de CO₂.
- Luego de tiempo transcurrido se pipeteó 1mL de cada sistema incubado a una placa Petri y se adicionaron aproximadamente 20mL de agar MRS, rotulando previamente cada placa. Esto se procedió por duplicado para cada sistema.
- Se agitaron las placas con movimientos en forma de 8 hasta completa homogenización y se permitió que se solidificaran.
- Seguidamente se incubaron las placas de los dos sistemas por 72 horas en jarra de anaerobiosis a 5% de CO₂.
- Después del tiempo de incubación se realizó el conteo de las bacterias acidolácticas utilizando un contador de colonias.

CAPITULO V
RESULTADOS Y DISCUSION DE RESULTADOS

5.0 RESULTADOS Y DISCUSION DE RESULTADOS

5.1 Elaboración de yogurt con mezcla ABY-3

El primer lote elaborado de yogurt con mezcla ABY-3 fue observado después del tiempo de incubación, resultando una correcta formación de coágulos pero después del rompimiento de este y su respectiva refrigeración a 4°C, su textura fue ligeramente viscosa la cual correspondía a un yogurt semisólido y que durante los 30 días fue constante. Además la percepción del sabor era ligeramente ácida y su olor característico a un producto fermentado, resultando un pH inicial ligeramente más ácido que el primer lote de yogurt sin mezcla de ABY-3.

El segundo lote elaborado de yogurt con mezcla ABY-3 de igual manera presentó similares características que el lote número uno.

Teóricamente se esperaba una textura del yogurt con mezcla ABY-3, más fluida debido a la forma degradada de la Lactosa de la leche de cabra; pero su constante textura durante los 30 días controlados es posible que se haya desarrollado por la viscosidad aportada por parte de la gelatina en polvo agregada, la cual también evitó a que se desarrollase la sinéresis del yogurt elaborado en ambos lotes, en conjunto con la formación correcta de los coágulos. Su sabor ligeramente más ácido que el del yogurt sin mezcla ABY-3 fue debido a la naturaleza relativamente ácida de la leche de cabra, incluyendo también el aporte de la formación de ácido láctico por parte de la degradación de lactosa que ejercieron los probióticos en el yogurt elaborado, lo cual hacen que su acidez aumente relativamente.

Los resultados en ambos lotes de yogurt elaborados son basados en una correcta humectación y agitación de la gelatina por 5 minutos, debido a que se comprobó experimentalmente que a una constante agitación de la leche de

cabra pasteurizada a dicho periodo de tiempo y con una cantidad de 2.33 gramos, su consistencia es la adecuada, ya que a mayor de 2.33 gramos de gelatina que fue agregada, la consistencia aumentaba hasta un grado muy viscoso, lo cual complica los posteriores análisis y a la apariencia misma del yogurt. También la agitación constante por 3 minutos de la cantidad agregada de mezcla de probióticos ABY-3, es importante para la correcta formación de coágulos en la leche de cabra. Prácticamente otro factor que es influido en la textura del yogurt elaborado es el tiempo de incubación a 45°C el cual fue de 8 horas siendo un periodo de tiempo mayor al descrito en la metodología del procedimiento 4.3.5, ya que a menos de este tiempo el yogurt no lograba la formación de los coágulos.



Figura N°5 Elaboración de yogurt con mezcla ABY-3

5.2 Elaboración de yogurt sin mezcla ABY-3

La elaboración del primer lote con leche de cabra y cultivos iniciadores fue realizada tal cual se expresa en la metodología del numeral 4.3.6 resultando una correcta formación de coágulos y después del rompimiento de estos y su respectiva refrigeración a 4°C, se observó un yogurt con una textura semisólida que presentó un sabor ligeramente ácido; pero no menor que el yogurt elaborado con mezcla ABY-3 y un olor característicos de un producto

fermentado. Este lote presentó una sinéresis a los 16 días ya que las muestras tomadas se podían observar una consistencia más fluida que las muestras del yogurt con mezcla ABY-3.

El segundo lote elaborado de yogurt sin mezcla ABY-3 presentó iguales características a diferencia que la sinéresis se desarrolló a los 30 días.

5.3 Determinación de la sobrevivencia de *Salmonella choleraesuis* ATCC 10708 frente a las bacterias acidolácticas del yogurt con mezcla ABY-3 y yogurt sin mezcla ABY-3.

5.3.1 Resultados de la reducción de *S. choleraesuis* ATCC 10708 en yogurt con mezcla ABY-3.

Tabla No. 12. Resultados de reducción de *S. choleraesuis* ATCC 10708 del yogurt con mezcla ABY-3: Lote 1

Lote N°1 de Yogurt con mezcla ABY-3				
Concentración (UFC/mL)	1.00x10 ⁶	1.00x10 ⁵	1.00x10 ⁴	1.00x10 ³
Tiempo (Días)				
0	1.6x10 ⁶	1.1x10 ⁵	1.3x10 ⁴	1.2x10 ³
5	1.3x10 ⁶	1.2x10 ⁴	1.8x10 ³	1.3x10 ²
8	1.2x10 ⁴	-----	-----	-----
16	-----	-----	-----	-----
30	-----	-----	-----	-----

Tabla No. 13 Resultados de reducción de *S. choleraesuis* ATCC 10708 del yogurt con mezcla ABY-3: Lote 2

Lote N°2 de Yogurt con mezcla ABY-3				
Concentración (UFC/mL)	1.00x10⁶	1.00x10⁵	1.00x10⁴	1.00x10³
Tiempo (Días)				
0	1.5x10 ⁶	1.2x10 ⁵	1.2x10 ⁴	1.2x10 ³
5	1.1x10 ⁶	1.1x10 ⁴	1.1x10 ³	1.1x10 ²
8	1.1x10 ⁴	-----	-----	-----
16	-----	-----	-----	-----
30	-----	-----	-----	-----

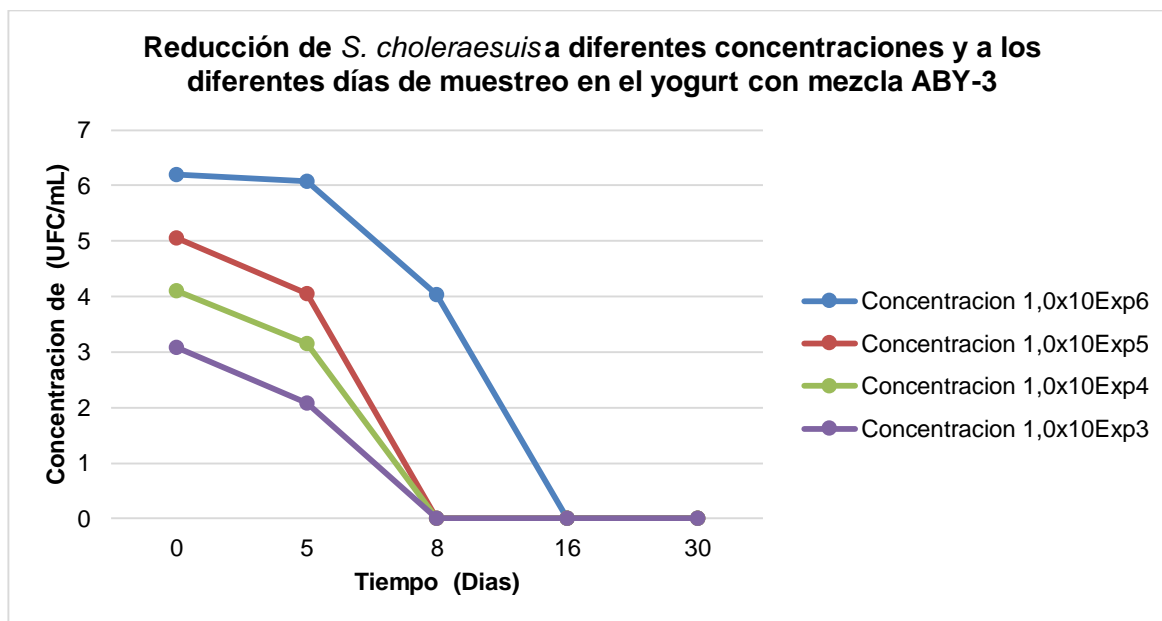
Tabla No. 14 Resumen de reducción de *S. choleraesuis* ATCC 10708 del yogurt con mezcla ABY-3.

Yogurt con mezcla ABY-3				
Concentración (UFC/mL)	1.00x10⁶	1.00x10⁵	1.00x10⁴	1.00x10³
Tiempo (Días)	Datos Log	Datos Log	Datos Log	Datos Log
0	6.190331698	5.06069784	4.096910013	3.079181246
5	6.079181246	4.06069784	3.161368002	2.079181246
8	4.041392685	-----	-----	-----
16	-----	-----	-----	-----
30	-----	-----	-----	-----

Comparando las tablas No 12 y 13 puede observarse que a una concentración de 1.00x10⁶ UFC/mL fue inhibido el crecimiento totalmente de la bacteria patógena a los 16 días en ambos lotes. Mientras que las concentraciones de

1.0×10^3 , 1.0×10^4 y 1.0×10^5 UFC/mL la bacteria patógena fue inhibida hasta el día 8 en ambos lotes. Posteriormente se promedió los valores de ambas tablas y se realizó una conversión de datos a base logarítmica con el fin de observar de mejor forma el comportamiento de este tipo de yogurt, expresándose detalladamente en la tabla N° 14 los valores promediados, donde las concentraciones diferentes a 10^6 UFC/mL de *S. choleraesuis* ATCC 10708 fueron reducidos sus recuentos en un logaritmo durante los días 0 y 5 de muestreo; pero a la mayor concentración de la cepa patógena la mezcla ABY-3, logró reducirla en dos logaritmos, entre los días 8 y 16.

Por lo antes descrito es notable que el yogurt elaborado con los probióticos pertenecientes a la mezcla ABY-3 presenta una muy buena capacidad de inhibición sobre la cepa patógena durante los 30 días controlados y es posible que sea haya desarrollado por la acción sinérgica de la cepa *Bifidobacterium* en conjunto con los probióticos *Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus* presentes en la mezcla ABY-3, que hicieron que la reducción de la cepa patógena haya sido más marcada en las muestras de yogurt inoculadas con la concentración 10^6 UFC/mL.



Nota: 1,0xExp5 es equivalente a 1.0×10^5

Figura N° 6. Reducción de *S. choleraesuis* a diferentes concentraciones y a los diferentes días de muestreo en el yogurt con mezcla de probióticos ABY-3.

En la figura No 6 se confirma claramente el comportamiento que presenta el yogurt con mezcla ABY-3 sobre *S. choleraesuis* debido a que las concentraciones diferentes a 10^6 UFC/mL presentan una tendencia similar, es decir, estas decrecen en una unidad logarítmica desde el día 0 hasta el día 5 y posteriormente un rápido descenso hasta un valor cero en el día 8 de muestreo, presentando a partir de este día un comportamiento constante a cero hasta el día 30. Mientras que para la concentración 10^6 de la bacteria patógena el comportamiento es relativamente constante durante los primeros dos días de muestreo, seguidamente se presenta el descenso significativo de 2 unidades logarítmicas de la cantidad de *S. choleraesuis* presente en las muestras, entre los días 5 y 8, presentando a partir de este día un comportamiento constante a cero hasta el día 30.

5.3.2 Resultados de Reducción de *S. choleraesuis* ATCC 10708 en yogurt sin mezcla ABY-3.

Tabla No. 15. Resultados de reducción de *S. choleraesuis* ATCC 10708 del yogurt sin mezcla ABY-3: Lote 1

Lote N°1 de Yogurt sin mezcla ABY-3				
Concentración (UFC/mL)	1.00x10 ⁶	1.00x10 ⁵	1.00x10 ⁴	1.00x10 ³
Tiempo (Días)				
0	1.2x10 ⁶	1.3x10 ⁵	1.3x10 ⁴	1.1x10 ³
5	1.1x10 ⁶	1.1x10 ⁵	1.2x10 ⁴	1.1x10 ²
8	1.1x10 ⁵	-----	-----	-----
16	-----	-----	-----	-----
30	-----	-----	-----	-----

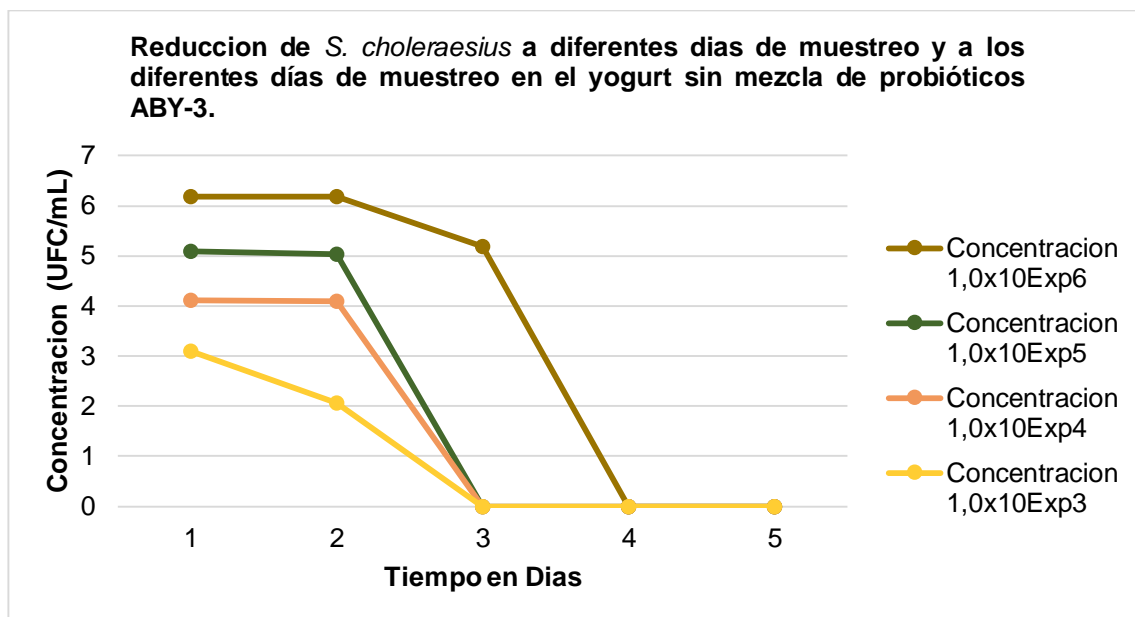
Tabla No. 16. Resultados de reducción de *S. choleraesuis* ATCC 10708 del yogurt sin mezcla ABY-3: Lote 2

Lote N°2 de Yogurt sin mezcla ABY-3				
Concentración (UFC/mL)	1.00x10 ⁶	1.00x10 ⁵	1.00x10 ⁴	1.00x10 ³
Tiempo (Días)				
0	1.1x10 ⁶	1.1x10 ⁵	1.3x10 ⁴	1.4x10 ³
5	1.2x10 ⁶	1.1x10 ⁵	1.3x10 ⁴	1.2x10 ²
8	1.2x10 ⁵	-----	-----	-----
16	-----	-----	-----	-----
30	-----	-----	-----	-----

Tabla No. 17. Resumen de reducción de *S. choleraesuis* ATCC 10708 del yogurt sin mezcla ABY-3.

Yogurt sin mezcla ABY-3				
Concentración (UFC/mL)	1.00x10 ⁶	1.00x10 ⁵	1.00x10 ⁴	1.00x10 ³
Tiempo (Días)	Datos Log	Datos Log	Datos Log	Datos Log
0	6.190331698	5.096910013	4.113943352	3.096910013
5	6.190331698	5.041392685	4.096910013	2.060699784
8	5.190331698	-----	-----	-----
16	-----	-----	-----	-----
30	-----	-----	-----	-----

Comparando las tablas No 15 y 16 puede observarse que a una concentración de 1.00x10⁶ UFC/mL fue inhibido el crecimiento totalmente de la bacteria patógena a los 16 días en ambos lotes. Mientras que las concentraciones de 1.0x10³, 1.0x10⁴ y 1.0x10⁵ UFC/mL la bacteria patógena fue inhibida hasta el día 8 en ambos lotes. Posteriormente también se promediaron los valores de ambas tablas y se realizó una conversión de datos a base logarítmica con el fin de observar de mejor forma el comportamiento de este tipo de yogurt, expresándose detalladamente los valores promediados en la tabla N° 17, donde la concentración 10³ de *S. choleraesuis* ATCC 10708 su recuento fue reducido en un logaritmo durante los días 0 y 5 de muestreo; pero a las concentraciones 10⁴ y 10⁵ de la cepa patógena, la mezcla ABY-3 no logró reducir sus recuentos a dichos dos días de muestreo sino su total inhibición hasta el octavo día. En las muestras con *S. choleraesuis* a 10⁶ UFC/mL fueron reducidas en un logaritmo entre los días 5 y 8, continuamente con su total inhibición hasta el día 16.



Nota: 1,0xExp5 es equivalente a 1.0×10^5

Figura No 7. Reducción de *S. choleraesuis* a diferentes concentraciones y a los diferentes días de muestreo en el yogurt sin mezcla de probióticos ABY-3.

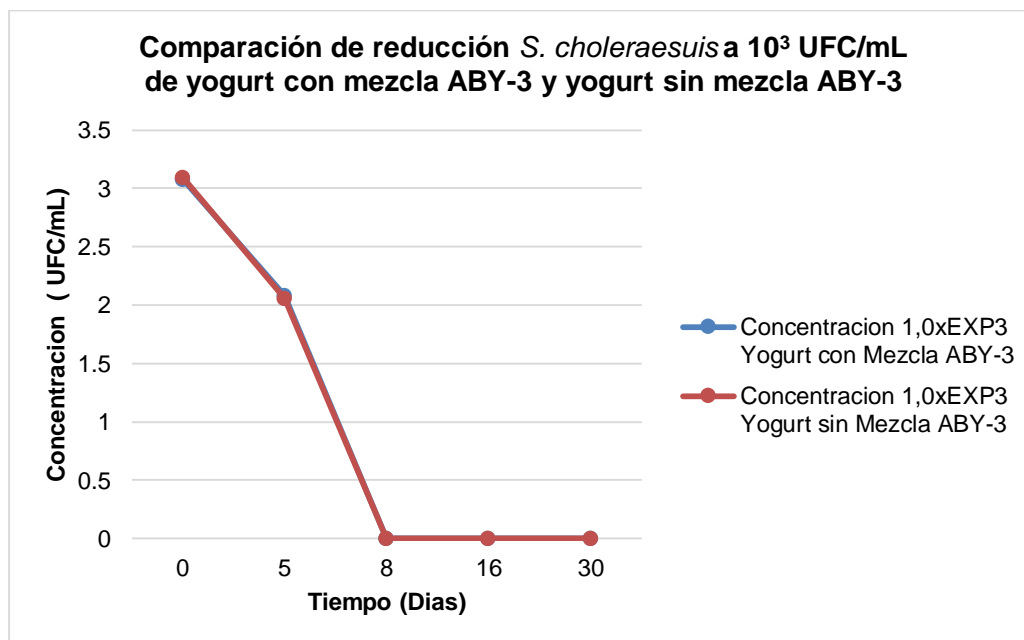
En la figura No 7 se confirma claramente el comportamiento que presenta el yogurt sin mezcla ABY-3 sobre *S. choleraesuis* debido a que las concentraciones diferentes a 10^5 y 10^4 UFC/mL presentan una tendencia similar, es decir, estas permanecen casi constantes para los primeros dos días de muestreo y un rápido decrecimiento hasta un valor de cero al día 8, permaneciendo constante esta tendencia hasta el día 30. Caso contrario es el comportamiento de las muestras con concentración 10^3 UFC/mL, ya que su descenso en una unidad logarítmica desde el día 0 hasta el día 5 es notable en la figura No 5 y posteriormente un rápido descenso hasta un valor cero en el día 8 de muestreo, presentando también a partir de este día un comportamiento constante a cero hasta el día 30. Mientras que para la concentración 10^6 de la bacteria patógena el comportamiento es relativamente constante durante los

primeros dos días de muestreo, seguidamente se presenta el descenso significativo de una unidad logarítmica de la cantidad de *S. choleraesuis* presente en las muestras, entre los días 5 y 8, presentando a partir de este día un comportamiento constante a cero hasta el día 30.

5.3.3 Comparación de la reducción de *S. choleraesuis* ATCC 10708 del yogurt con mezcla ABY-3 y del yogurt sin mezcla ABY-3.

Tabla N° 18. Resumen de reducción de *S. choleraesuis* ATCC 10708 a la concentración 10^3 UFC/mL para ambos yogurts.

Tiempo (Día) / Concentración (UFC/mL)	10^3 Yogurt con mezcla ABY-3 ^{Datos Log}	10^3 Yogurt sin mezcla ABY-3 ^{Datos Log}
0	3.079181246	3.096910013
5	2.079181246	2.06069784
8	0.0	0.0
16	0.0	0.0
30	0.0	0.0



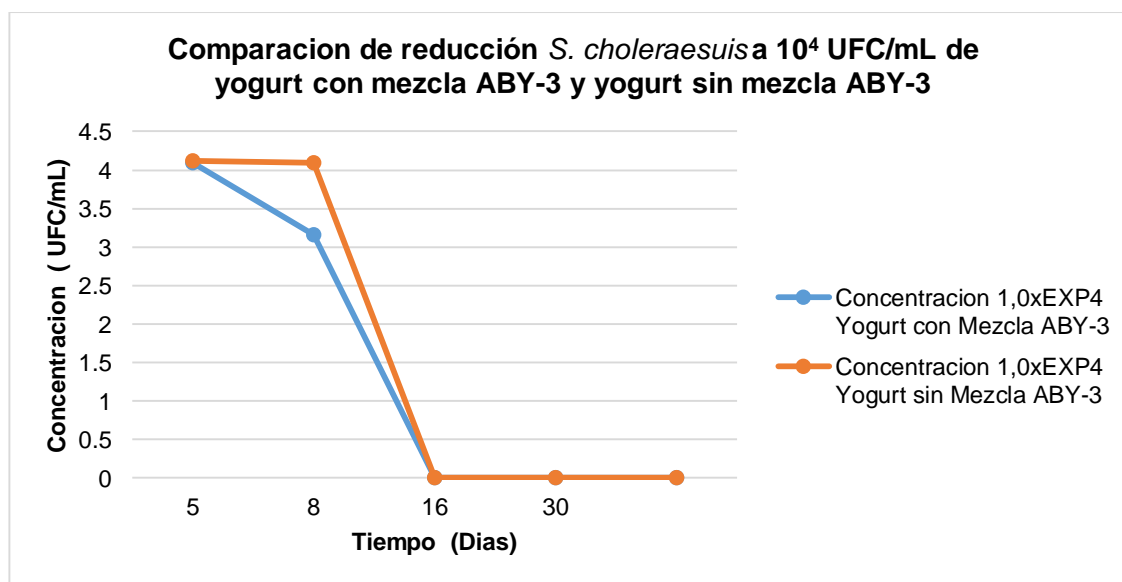
Nota: 1,0xExp5 es equivalente a 1.0×10^5

Figura N° 8. Comparación de reducción de *S. choleraesuis* ATCC 10708 a 10^3 UFC/mL de yogurt con mezcla ABY-3 y yogurt sin mezcla ABY-3.

En la Tabla N°18 y Figura N°8, se observó un comportamiento similar tanto para los valores tabulados y graficados del yogurt con mezcla ABY-3 y los del yogurt sin mezcla ABY-3, ya que en ambos se presentó una tendencia a decrecer desde el día 0 hasta el día 8, donde prácticamente los gráficos tienen el mismo recorrido durante los 5 días de muestreo, encerrando también que ambos tipos de yogurt presentaron el efecto de reducir la cantidad de bacteria en los primeros dos días, en 1 logaritmo.

Tabla N° 19. Resumen de reducción de *S. choleraesuis* ATCC 10708 a la concentración 10^4 UFC/mL para ambos yogurts.

Tiempo (Día) / Concentración (UFC/mL)	10 ⁴ Yogurt con mezcla ABY-3 Datos Log	10 ⁴ Yogurt sin mezcla ABY-3 Datos Log
0	4.096910013	4.113943352
5	3.161368002	4.096910013
8	0.0	0.0
16	0.0	0.0
30	0.0	0.0



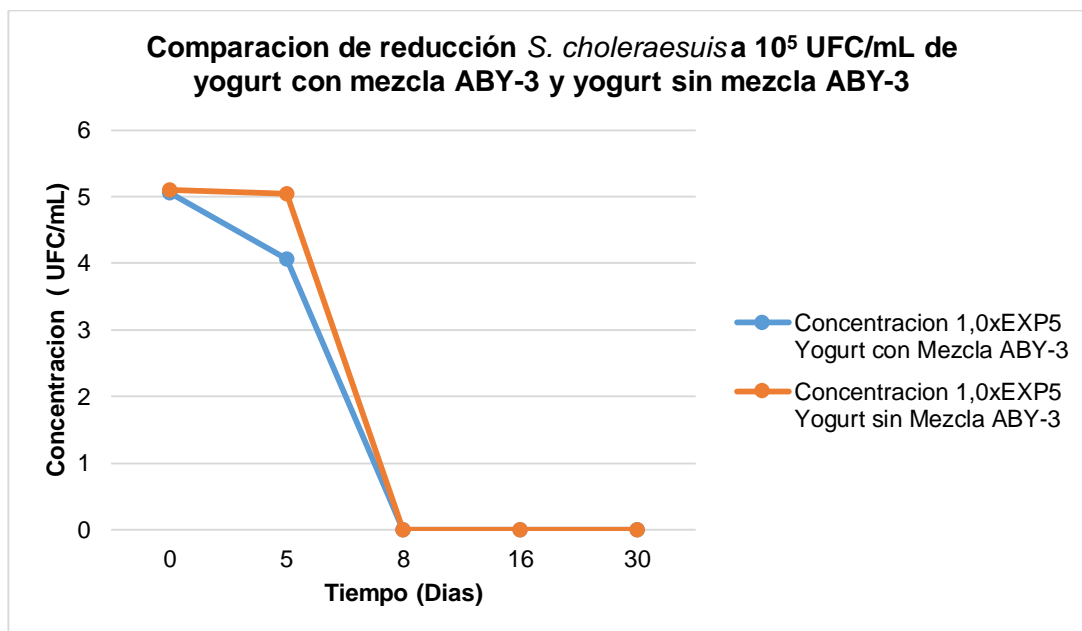
Nota: 1,0xExp5 es equivalente a 1.0×10^5

Figura N°9. Comparación de reducción de *S. choleraesuis* ATCC 10708 a 10^4 UFC/mL de yogurt con mezcla ABY-3 y yogurt sin mezcla ABY-3.

Para las muestras de los tipos de yogurt inoculas con *S. choleraesuis* ATCC 10708 a una concentración de 10^4 UFC/mL, se obtienen unos valores donde se observa en el figura N° 9 un comportamiento similar pero con diferencia notable en dos puntos de muestreo, es decir, entre los días 0 y 5 , ya que la reducción logarítmica no se hizo presente en las muestras con yogurt sin mezcla ABY-3 ya que estas mantuvieron sus recuentos en la unidad logarítmica de 4, lográndose observar en su respectiva gráfica que permanece constante en dichos puntos. Caso contrario sucedió con los resultados del yogurt con mezcla ABY-3 ya que en ambos puntos de muestreo se observó una reducción logarítmica de 1, expresándose de mejor manera por su tendencia al decrecimiento entre esos dos días. Es así que para los restantes días de muestreo para ambos tipos de yogurt la tendencia es a cero y constante hasta el día 30.

Tabla N° 20. Resumen de reducción de *S. choleraesuis* ATCC 10708 a la concentración 10^5 UFC/mL para ambos yogurts.

Tiempo (Día) / Concentración (UFC/mL)	10^5	10^5
	Yogurt con mezcla ABY-3 Datos Log	Yogurt sin mezcla ABY-3 Datos Log
0	5.09069784	5.096910013
5	4.09069784	5.041392685
8	0.0	0.0
16	0.0	0.0
30	0.0	0.0



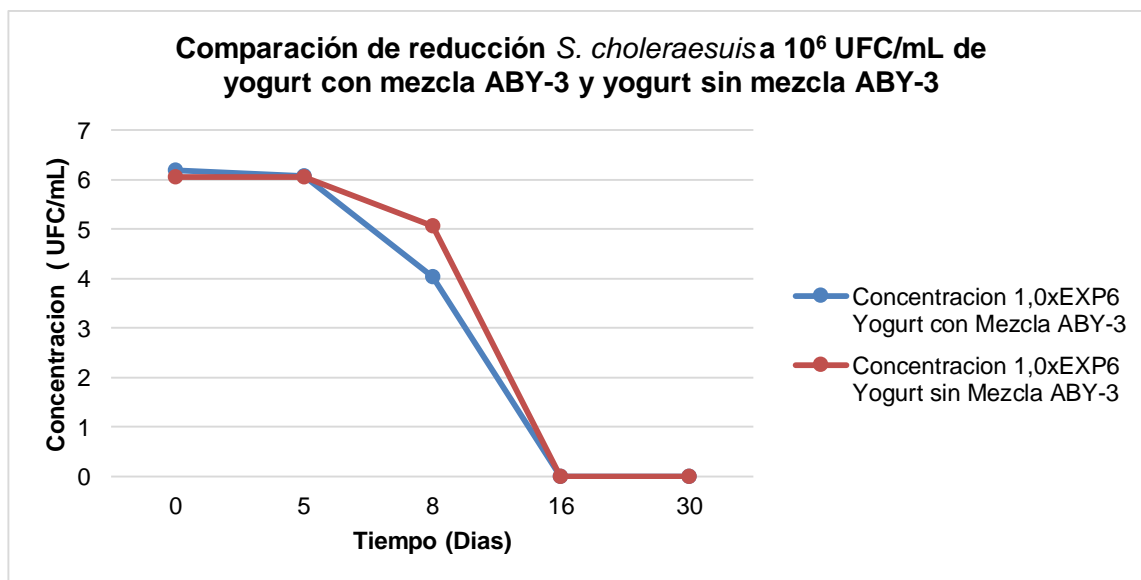
Nota: 1,0xExp5 es equivalente a 1.0×10^5

Figura N°10. Comparación de reducción de *S. choleraesuis* ATCC 10708 a 10^5 UFC/mL de yogurt con mezcla ABY-3 y yogurt sin mezcla ABY-3.

El comportamiento de los resultados en las muestras de ambos tipos de yogurt inoculadas con *S. choleraesuis* ATCC 10708 a 10^5 UFC/mL, es similar a los graficados en la figura N°9 de la concentración 10^4 UFC/mL, ya que se desarrolla de la misma forma, debido a que para los valores graficados del yogurt sin mezcla ABY-3, la tendencia es constante para los primeros dos días de muestreo, porque permanecen los valores en la unidad logarítmica de 5 y su descenso rápido a partir del día 5 hasta el día 8. Presentando el yogurt con mezcla ABY-3, en su respectivo grafico un comportamiento de descenso en una unidad logarítmica para los primeros dos días y su rápido descenso a cero hasta el día 8. Ambos tipos de yogurt presentaron el comportamiento constante sobre 0 de sus gráficos a partir del día 8 hasta el día 30.

Tabla N° 21 Resumen de reducción de *S. choleraesuis* ATCC 10708 a la concentración 10^6 UFC/mL para ambos yogurts.

Tiempo (Día) / Concentración (UFC/mL)	10^5	10^5
	Yogurt con mezcla ABY-3 Datos Log	Yogurt sin mezcla ABY-3 Datos Log
0	6.190331698	6.06069784
5	6.079181246	6.06069784
8	4.041392685	5.06069784
16	0.0	0.0
30	0.0	0.0



Nota: 1,0xExp5 es equivalente a 1.0×10^5

Figura N° 11 Comparación de reducción de *S. choleraesuis* ATCC 10708 a 10^6 UFC/mL de yogurt con mezcla ABY-3 y yogurt sin mezcla ABY-3.

Es notable que para las muestras de ambos tipos de yogurt inoculados con la bacteria patógena a 10^6 UFC/mL, presentan comportamientos similares durante los 30 días, debido a que desde el día 0 hasta el día 16 se muestra una tendencia muy marcada a decrecer y una tendencia a cero en los dos últimos días de muestreo. Pero que existe una marcada diferencia en ambos comportamientos, ya que entre los días 5 y 8, para el yogurt sin mezcla ABY-3 presentó una reducción logarítmica de 1 y para el yogurt con mezcla ABY-3, su reducción fue de 2 logaritmos. Es por ello que se manifestó que en el caso de la bacteria patógena a la mayor concentración evaluada, su efecto inhibitorio fue relativamente mayor para el yogurt con mezcla ABY-3 que el yogurt sin mezcla ABY-3, tal cual y se muestra en la figura No 11.

5.4 Análisis estadístico de la reducción de *Salmonella choleraesuis* ATCC 10708. ⁽³⁶⁾

Debido a la semejanza observada en los datos se realizó un análisis estadístico para determinar si ambos yogures poseen la misma capacidad inhibitoria frente a *S. choleraesuis* o existe diferencias significativas entre ambos tipos de yogurt para ello se utilizó el análisis de varianza ANOVA para seleccionar el tipo de yogurt que presenta mejor efectividad en cuanto a la reducción de la bacteria patógena.

En el análisis de varianza, se realizó una serie de pasos, siendo el primero de ellos el planteamiento de hipótesis, con la finalidad de poder aceptar o rechazar lo planteado, utilizando la prueba F como herramienta estadística de contraste

⁽³⁷⁾.

La variable dependiente es el conteo de la bacteria patógena a diferentes concentraciones, el factor o variable independiente fue el tiempo en días, en

cuatro niveles y se analizaron 20 muestras por cada tipo de yogurt, haciendo un total de 40 muestras analizadas (Ver Anexo N° 1).

- Planteamiento de hipótesis nula:

$H_0: [10^6] \text{ UFC/mL yogurt con mezcla ABY-3} = [10^6] \text{ UFC/mL yogurt sin mezcla ABY-3}$

El conteo de la bacteria patógena a la concentración de 10^6 UFC/mL es el mismo en ambos tipos de yogurt.

- Planteamiento de hipótesis alternativa:

$H_a: [10^6] \text{ UFC/mL yogurt con mezcla ABY-3} \neq [10^6] \text{ UFC/mL yogurt sin mezcla ABY-3}$

El conteo de la bacteria patógena a la concentración de 10^6 UFC/mL no es el mismo en ambos tipos de yogurt.

De modo que la hipótesis nula se rechaza si los datos indican que una o varias de las medias es o son diferentes significativamente de las otras. Se hace la decisión sobre el rechazo o no rechazo de H_0 utilizando la distribución F y la estadística F .

-Criterios del contraste

Nivel de significancia: 0.05 Estadística de prueba o de contraste: Distribución F .
(Ver los valores críticos de la distribución F en Anexo No. 15)

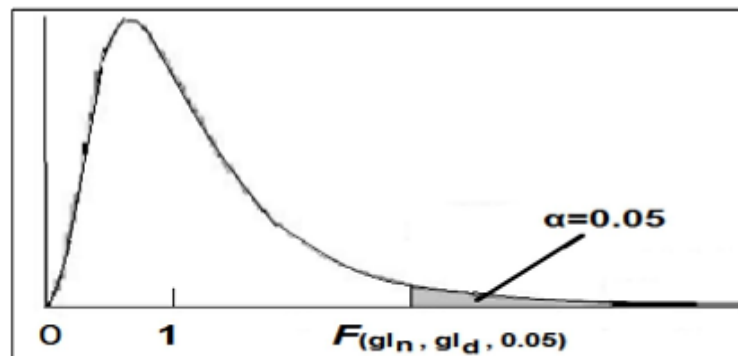


Figura N° 12 Curva de Distribución F.

En la figura N° 12 se observa la curva de distribución F , en donde todos los valores que caen en la región crítica se rechazan y los que caen fuera se aceptan. Los valores críticos de F registrados en la tabla del anexo N° 15 presentan un área bajo la curva a la derecha de 0.05, donde:

$gl_{(n)}$ = Grados de libertad del numerador

$gl_{(d)}$ = Grados de libertad del denominador

$\alpha = 0.05$ = Nivel de confianza

- Resultados estadísticos para la concentración de 10^6 UFC/mL. (15). Para rechazar o aceptar la hipótesis se calcula el valor F con la siguiente ecuación:

$$F = \frac{CM(\text{factor})}{CM(\text{error})}$$

Dónde:

F = Valor calculado de F para el factor en análisis.

$CM(\text{factor})$ = Media de cuadrados del factor.

$CM(\text{error})$ = Media de cuadrados del error.

Tabla N° 22. Análisis de varianza para el recuento de *Salmonella choleraesuis* ATCC 10708 a concentración de 10^6 ufc/mL en ambos tipos de yogurt.

ANÁLISIS DE VARIANZA						
<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	705675000 0	1	7056750 000	0,0169693 6	0,898938777	4,96460 274
Dentro de los grupos	4,1585E+1 2	10	4,1585E +11			
Dentro de los grupos	4,1585E+1 2	10				

Según los datos obtenidos en el Análisis de Varianza (ANOVA) del programa de Excel se obtienen resultados que permiten indicar que si el valor de F calculado es de 0.01696936 y el valor de F crítica es de 4.96460274, por lo tanto el valor de F calculado es menor que el F crítica, por lo que no existe evidencia suficiente para rechazar la hipótesis nula y expresándose que la medida de variabilidad dentro de cada uno de los niveles que se están contrastando son significativamente similares, o dicho de otra manera el yogurt con mezcla ABY-3 es tan efectivo como el yogurt sin mezcla ABY-3.

5.5 Evaluación de la mezcla de probióticos ABY-3 a las sales biliares y al pH ácido del estómago. ⁽²⁵⁾

Uno de los requisitos importantes para que la mezcla ABY-3 sea considerada netamente probiótico por la FAO/OMS es que esta debe ser tolerante a la

presencia de las sales biliares y al pH ácido del estómago. Es por ello que la mezcla ABY-3 fue sometida por 2 horas a las dos condiciones, representadas como Sistema A (ajustada a pH de 2) y Sistema B (enriquecida con sales biliares al 0.3%), tal cual como lo expresa la metodología del anexo N° 12. que posteriormente se confirmó con un recuento microbiano en placa vertida.

Tabla N° 23. Resultados de recuento de células viables de mezcla de probióticos ABY-3 frente a sales biliares y pH ácido del estómago.

Condición	pH ácido del estómago	Sales biliares
Concentración inicial (UFC/mL)	1.1x10 ⁶	1.1x10 ⁶
Concentración final (UFC/mL)	2.4x10 ⁵	3.2x10 ⁴

-Determinación del porcentaje de células viables de mezcla de probióticos ABY-3

$$\% = \frac{\text{Log UFC } N_i}{\text{Log } N_o} \times 100$$

Donde:

N_i = El total de células viables después del tratamiento.

N_o = El número iniciales de células de BAL inoculadas.

-Porcentajes de sobrevivencia de las bacterias acidolácticas a pH de 2.0

$$\% = \frac{\text{Log UFC } N_i}{\text{Log } N_o} \times 100$$

$$\% = \frac{\text{Log } 2.4 \cdot 10^5}{\text{Log } 1.1 \cdot 10^6} \times 100$$

$$\% = 96.393269$$

-Porcentajes de sobrevivencia de las bacterias acidolácticas a sales biliares.

$$\% = \frac{\text{Log UFC Ni}}{\text{Log UFC No}} \times 100$$

$$\% = \frac{\text{Log } 3.2 \times 10^4}{\text{Log } 1.1 \times 10^6} \times 100$$

$$\% = 84.706941$$

Los resultados que expresan la Tabla No. 25 reflejan que la mezcla ABY-3 de probióticos presenta la capacidad de resistir de manera *In vitro* al pH ácido del estómago ya que a una cantidad inicial de 1.1×10^6 UFC/mL inoculada solo fue reducida a una cantidad de 2.4×10^5 UFC/mL presentando un porcentaje de sobrevivencia del 96.393269%; mientras que ante la presencia de las sales biliares de bovino al 0.3% la cantidad final fue de 3.2×10^4 UFC/mL con un porcentaje de sobrevivencia del 84.706941% . Por lo tanto la mezcla cumple con lo que especifica la FAO/OMS durante dos horas que es el tiempo que tarda la comida para atravesar el sistema. Es por ello que la mezcla de probióticos ABY-3 es capaz de resistir a las dos condiciones de estrés y lograr colonizar la mucosa intestinal y ejercer el efecto benéfico sobre la salud humana y por lo tanto es propicio incluir la mezcla de probióticos para la elaboración del yogurt natural de leche cabra.

Tabla No. 24 Conteo de bacterias acidolácticas en yogurt con mezcla ABY-3

Tiempo (días)	Yogurt con mezcla ABY-3		Promedio (UFC/mL)
	Lote N°1 (UFC/mL)	Lote N°2 (UFC/mL)	
0	1.90 x10 ⁶	1.81 x10 ⁶	1.86 x10 ⁶
5	1.43 x10 ⁶	1.54 x10 ⁶	1.49 x10 ⁶
8	1.60 x10 ⁶	1.87 x10 ⁶	1.74 x10 ⁶
16	1.65 x10 ⁶	1.43 x10 ⁶	1.54 x10 ⁶
30	1.20 x10 ⁶	1.10 x10 ⁶	1.15 x10 ⁶

Tabla No. 25 Conteo de bacterias acidolácticas en yogurt sin mezcla ABY-3

Tiempo (días)	Yogurt sin mezcla ABY-3		Promedio (UFC/mL)
	Lote N°1 (UFC/mL)	Lote N°2 (UFC/mL)	
0	2.34 x10⁶	2.11 x10⁶	2.23 x10⁶
5	1.67 x10⁶	1.23 x10⁶	1.45 x10⁶
8	1.55 x10⁶	1.18 x10⁶	1.37 x10⁶
16	1.78 x10⁵	1.32 x10⁵	1.55 x10⁵
30	1.33 x10⁵	1.42 x10⁵	1.38 x10⁵

Tabla No. 26 Conteo promedio de bacterias acidolácticas del yogurt con mezcla ABY-3 y del yogurt sin mezcla ABY.3

Tiempo (días)	Yogurt sin mezcla ABY-3 (UFC/mL) Datos Log	Yogurt con mezcla ABY-3 (UFC/mL) Datos Log
0	6.348304863	6.269512944
5	6.161368002	6.173186268
8	6.136720567	6.240549248
16	5.190331698	6.187520721
30	5.139879086	6.06069784

El conteo de bacterias acidolácticas pertenecientes en el yogurt con mezcla de probióticos ABY-3, se realizó de manera adecuada resultando valores que confirman la correcta elaboración del yogurt y estandarización de probióticos, debido a que en la Tabla N° 24, se tabulan los resultados que describen que los valores de UFC/mL de probióticos están presentes con un exponencial de 10^6 durante los 30 días controlados, tanto para el lote N°1 y lote N°2 de yogurt elaborado, lo cual cumple con la especificación de la Organización Panamericana de la Salud en el Código Alimentario Argentino^(x) que describe que la carga de células viables debe estar comprendida entre 10^6 y 10^9 UFC, y como se establece en la Norma del Codex para leches fermentadas Codex Stand 243-2003^(x) que detalla que para yogurt con cultivos alternativos debe estar presente como mínimo un conteo de 10^6 UFC. Por el contrario en la tabla N°25, se observa que para el conteo en el yogurt sin mezcla ABY-3, los resultados se mantuvieron con valores favorables para las especificaciones

mencionadas hasta el día 16; donde los valores de UFC de probióticos descendieron a un exponencial de 10^5 en los dos últimos días de muestreo.

En la tabla No 26, se expresan el promedio de los valores de los recuentos para ambos tipos de yogurt con su respectiva conversión a base logarítmica, para observar y analizar de mejor forma el comportamiento de ambos tipos de yogurt, confirmando así que el comportamiento para ambos yogurt persiste debido a que los valores para el yogurt con mezcla ABY-3, se mantuvieron en la unidad logarítmica de 6 y para el yogurt sin mezcla ABY-3 permanecieron los valores en esta unidad logarítmica para los primeros 3 días pero no así para los últimos dos días, ya que descendieron a una unidad de 5.

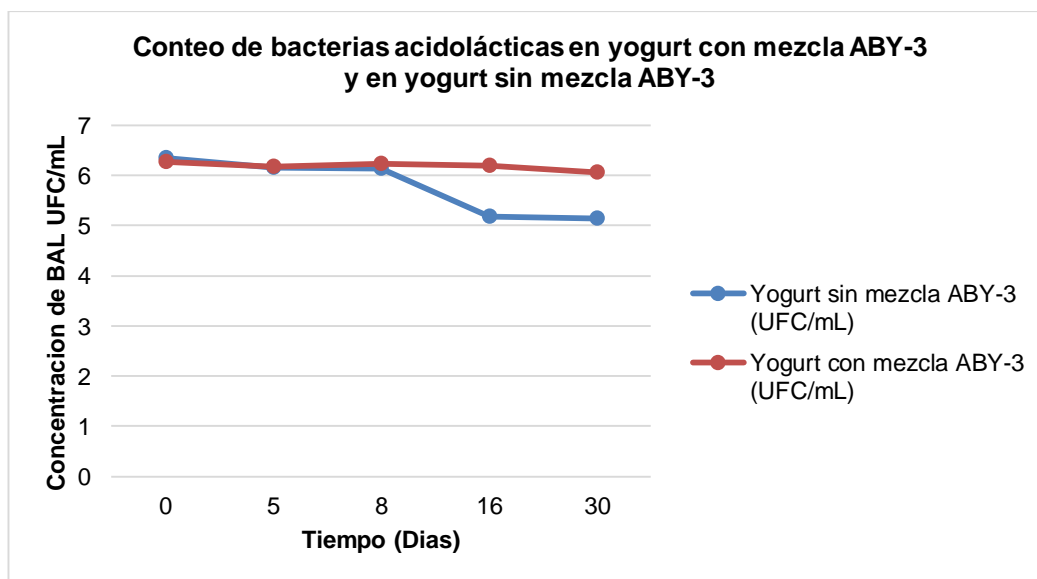


Figura No. 13 Conteo de bacterias acidolácticas en yogurt con mezcla ABY-3 y en yogurt sin mezcla ABY-3.

En la figura N°13 se logra observar una clara tendencia para el conteo de probióticos en el yogurt con mezcla ABY-3, manteniéndose la gráfica constante en la unidad logarítmica de 5, sin ningún descenso durante los 5 días de

muestreos. Caso contrario se desarrolló con la gráfica del conteo de yogurt sin mezcla de probióticos ABY-3 ya que su tendencia fue relativamente al descenso alcanzando valores debajo de la unidad logarítmica de 6, en los dos últimos días de muestreo.

Es importante mencionar que los resultados para el yogurt con mezcla ABY-3 expresan que las condiciones de almacenamiento, a 4°C, es un factor importante para la vida útil del producto fermentado, ya que esto favorece a una correcta acción de los probióticos sobre la bacteria patógena.

5.6 Medición de pH en el yogurt con mezcla ABY-3 y yogurt sin mezcla ABY-3 durante los días 0, 5, 8, 16 y 30.

5.6.1 Resultados de medición de pH en el yogurt con mezcla ABY-3

Tabla No. 27 Resultados de pH obtenidos del yogurt con mezcla ABY-3 durante los 5 días de muestreo.

Tiempo (días)	0			5			8			16			30		
Concentración de inóculo de <i>S. choleraesuis</i>	Lote 1	Lote 2	X	Lote 1	Lote 2	X	Lote 1	Lote 2	X	Lote 1	Lote 2	X	Lote 1	Lote 2	X
10 ⁶	4.36	4.35	4.35	4.36	4.35	4.35	4.35	4.36	4.35	4.37	4.36	4.36	4.35	4.37	4.36
10 ⁵	4.36	4.35	4.35	4.37	4.35	4.36	4.36	4.35	4.35	4.36	4.35	4.35	4.36	4.36	4.36
10 ⁴	4.36	4.35	4.35	4.37	4.35	4.36	4.36	4.37	4.36	4.35	4.37	4.36	4.37	4.37	4.37
10 ³	4.36	4.35	4.35	4.36	4.34	4.35	4.36	4.35	4.35	4.36	4.35	4.35	4.37	4.37	4.37

Tabla No. 28. Resumen de resultados promedio de pH obtenido del yogurt con mezcla ABY-3 durante los 5 días de muestreo.

Tiempo (días)	0	5	8	16	30
Concentración de inóculo de <i>S. choleraesuis</i>					
10 ⁶	4.35	4.35	4.35	4.36	4.36
10 ⁵	4.35	4.36	4.35	4.35	4.36
10 ⁴	4.35	4.36	4.36	4.36	4.37
10 ³	4.35	4.35	4.35	4.35	4.37

5.6.2 Resultados de medición de pH en el yogurt sin mezcla ABY-3

Tabla No. 29 Resultados de pH de yogurt sin mezcla ABY-3 durante los 5 días de muestreo.

Tiempo (días)	0			5			8			16			30		
	Lote 1	Lote 2	\bar{X}	Lote 1	Lote 2	\bar{X}	Lote 1	Lote 2	\bar{X}	Lote 1	Lote 2	\bar{X}	Lote 1	Lote 2	\bar{X}
10^6	4.44	4.43	4.43	4.44	4.44	4.44	4.43	4.42	4.42	4.46	4.44	4.45	4.43	4.43	4.43
10^5	4.44	4.42	4.43	4.44	4.45	4.44	4.44	4.43	4.43	4.45	4.45	4.45	4.44	4.45	4.44
10^4	4.44	4.44	4.44	4.44	4.44	4.44	4.43	4.44	4.43	4.42	4.43	4.42	4.43	4.43	4.43
10^3	4.44	4.44	4.44	4.43	4.45	4.44	4.43	4.44	4.43	4.44	4.43	4.43	4.45	4.44	4.44

Tabla No. 30 Resumen de resultados promedio de pH de yogurt sin mezcla ABY-3 durante los 5 días de muestreo

Tiempo (días)	0	5	8	16	30
Concentración de inóculo de <i>S. choleraesuis</i>					
10^6	4.43	4.44	4.42	4.45	4.43
10^5	4.43	4.44	4.43	4.45	4.44
10^4	4.44	4.44	4.43	4.42	4.43
10^3	4.44	4.44	4.43	4.43	4.44

Los valores presentes en la tabla N° 28, detallan que el yogurt elaborado con mezcla ABY-3, mantuvo un pH aceptable durante los 30 días, ya que resultaron valores entre 4.35-4.37 para ambos lotes realizados, y cumpliendo así la Norma mexicana NMX-F-444-1983, que determina que el pH debe ser menor de 4.50 para yogures semisólidos. Pero en comparación con los valores obtenidos para el yogurt sin mezcla ABY-3, es apreciable en la tabla N°30 que los valores están presentes entre 4.42-4.45, lo cual de igual manera cumple con la Norma mexicana. Siendo notorio una leve diferencia entre los valores para ambos tipos de yogurt; donde el yogurt con mezcla ABY-3 mantuvo un pH durante los 30 días, ligeramente más ácido que el yogurt sin mezcla ABY-3, lográndose evidenciar que los probióticos pertenecientes a la mezcla ABY-3 tienen mayor capacidad de fermentar los carbohidratos presentes en la leche de cabra que los probióticos presentes en los cultivos iniciadores utilizados en la elaboración del yogurt sin mezcla ABY-3, esto teniendo en cuenta que para ambos tipos de yogurt se utilizó leche de cabra que naturalmente es levemente más ácida que leche de vaca.

5.6.3 Comparación del pH ambos tipos de yogurt durante los 5 días de monitoreo.

Tabla No. 31. Resultados obtenidos de pH de yogurt con mezcla ABY-3 y yogurt sin mezcla ABY-3 durante los 5 días de muestreo a 10^6 UFC/mL de *S. choleraesuis*. ATCC 10708.

10 ⁶ UFC/ML de <i>Salmonella choleraesuis</i>		
Tiempo (Días)	Yogurt con Mezcla ABY-3	Yogurt sin Mezcla ABY-3
0	4.35	4.43
5	4.35	4.44

Tabla N° 31. Continuación

Tiempo (Días)	Yogurt con Mezcla ABY-3	Yogurt sin Mezcla ABY-3
8	4.35	4.42
16	4.36	4.45
30	4.36	4.43

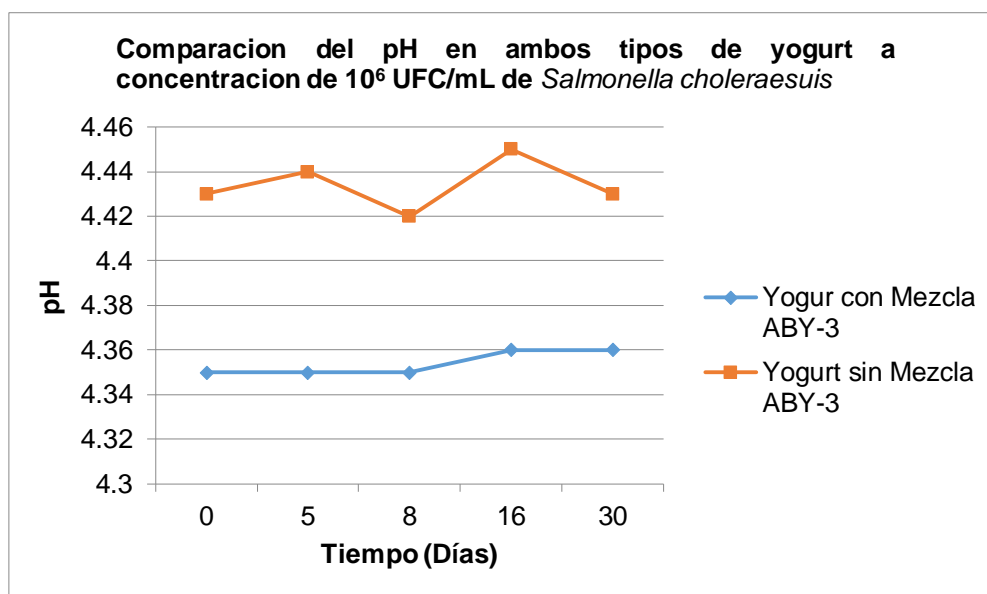


Figura No. 14 Comparación del pH en ambos tipos de yogurt a concentración de 10^6 UFC/mL de *S. choleraesuis* ATCC 10708.

Para ambos tipos de Yogurt, es notable que los valores de pH durante los 5 tiempos de muestreo a la concentración 10^6 UFC/mL de *S. choleraesuis* 10708 presentan diferencia en sus tendencias a medida que transcurre el tiempo, ya que se muestra tanto en la Tabla N°31 y Figura N°14 que los valores para el yogurt con mezcla ABY-3 son cercanos entre 4.35 y 4.36, ya que el primer valor se mantuvo constante durante los primeros tres tiempos de muestreos, donde

es claro que a esos días se evidencio levemente la fermentación de los carbohidratos y que para los dos últimos tiempos de muestreos el valor de pH ascendió ligeramente, debido a que no se logró desarrollarse más la formación de ácido láctico en el yogurt y manteniéndose constante el valor ácido del yogurt. No siendo así para el yogurt sin mezcla ABY-3 donde su tendencia es alterna, ya que sus valores de pH no son constantes sino con un comportamiento ascendente y descendiente entre dos tiempos de muestreo próximos, logrando alcanzar un valor mínimo de pH de 4.42 y un máximo de 4.45. Esto pudo haberse desarrollado debido a una incorrecta toma de pH en las muestras tomadas o no homogenizarse adecuadamente dichas muestras y no lográndose observar en los resultados la producción máxima de ácido láctico en el yogurt en un punto de muestreo.

La tendencia al alza, tanto para los valores de pH del yogurt con mezcla ABY-3 y para los del yogurt sin mezcla ABY-3, es posible que se haya desarrollado porque los probióticos pertenecientes tanto a la mezcla ABY-3 como a los del cultivo iniciador presentaron una capacidad de fermentación de carbohidratos muy acelerada y similares entre sí, para los primeros tres días de muestreo, llegando así a su máxima capacidad al día 8 y su posterior comportamiento ascendente por falta de carbohidratos.

Tabla No. 32. Resultados obtenidos de pH de yogurt con mezcla ABY-3 y yogurt sin mezcla ABY-3 durante los 5 días de muestreo a 10^5 UFC/mL de *S. choleraesuis* ATCC 10708.

10 ⁵ UFC/ML de <i>Salmonella choleraesuis</i>		
Tiempo (Días)	Yogurt con Mezcla ABY-3	Yogurt sin Mezcla ABY-3
0	4.36	4.43
5	4.36	4.44

Tabla N° 32. Continuación

Tiempo (Días)	Yogurt con Mezcla ABY-3	Yogurt sin Mezcla ABY-3
8	4.35	4.43
16	4.35	4.45
30	4.36	4.44

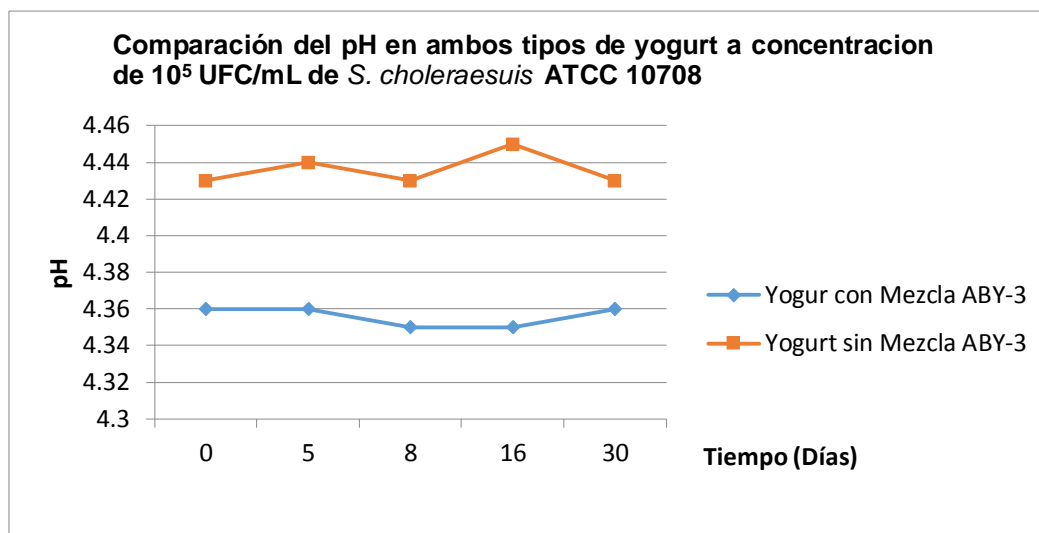


Figura No. 15 Comparación del pH en ambos tipos de yogurt a concentración de 10^5 UFC/mL de *S. choleraesuis* ATCC 10708.

Para el yogurt con mezcla ABY-3 a una concentración de 10^5 UFC/mL, la tendencia de pH durante transcurre el tiempo es casi constante ya que los valores son cercanos pero que muestran de igual manera una diferencia con la tendencia del pH para yogurt sin mezcla ABY-3 ya que este presenta valores no constantes pero cercanos entre sí. De igual manera en ambos yogures no se

logra evidenciar la máxima producción de ácido láctico por la fermentación de carbohidratos ni el ascenso o constancia de este por la falta de carbohidratos.

Tabla No. 33. Resultados obtenidos de pH de yogurt con Mezcla ABY-3 y yogurt sin mezcla ABY-3 durante los 5 días de muestreo a 10^4 UFC/mL de *S. choleraesuis* ATCC 10708.

10 ⁴ UFC/ML de <i>Salmonella choleraesuis</i>		
Tiempo (Días)	Yogurt con Mezcla ABY-3	Yogurt sin Mezcla ABY-3
0	4.35	4.44
5	4.36	4.44
8	4.36	4.43
16	4.36	4.42
30	4.37	4.43

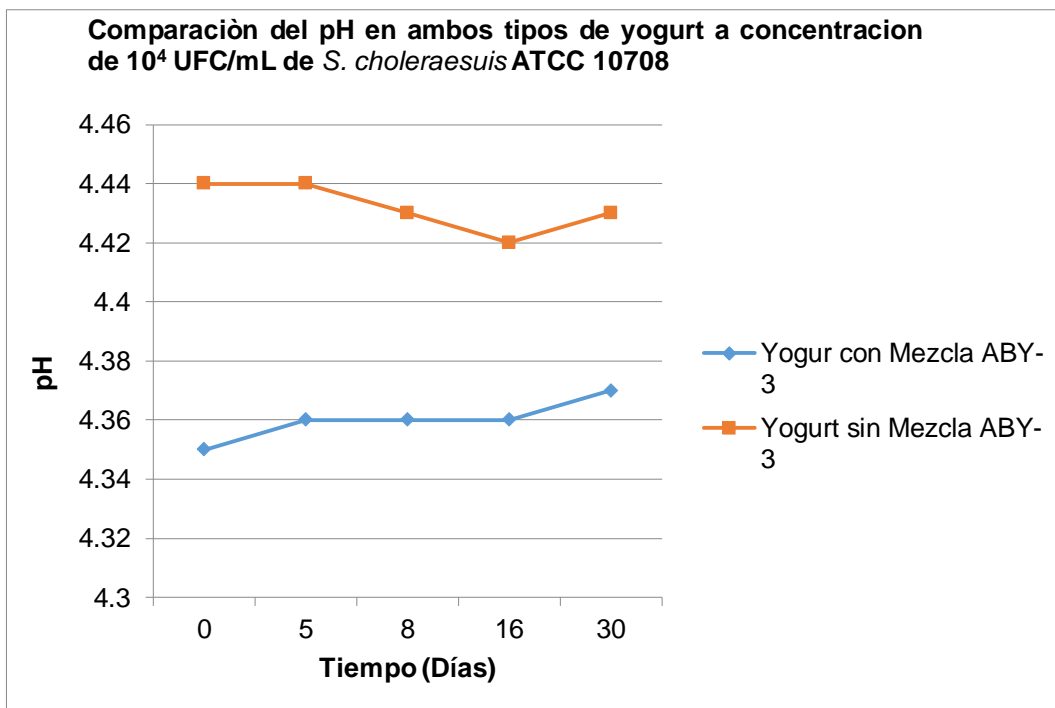


Figura No. 16 Comparación del pH en ambos tipos de yogurt a concentración de 10^4 UFC/mL de *S. choleraesuis* ATCC 10708

En la figura N°16 y tabla N°33, es más evidenciable que en el yogurt sin mezcla ABY-3 se desarrolló la tendencia descendente de pH desde el día 5 hasta el día 16, alcanzando posiblemente la máxima producción de ácido láctico a un pH de 4.42 y se observa el inicio de una fase estacionaria al día 30, donde posiblemente la falta de carbohidrato empezaba a notarse. Por otra parte en el yogurt con mezcla ABY-3 se mantiene la tendencia casi constante, con diferencia que a la concentración de 10^4 UFC de *Salmonella c.* el pH parece ascender.

Tabla No. 34. Resultados obtenidos de pH de yogurt con mezcla ABY-3 y yogurt sin mezcla ABY-3 durante los 5 días de muestreo a 10^3 UFC/mL de *S. choleraesuis* ATCC 10708.

10 ³ UFC/ML de <i>Salmonella choleraesuis</i>		
Tiempo (Días)	Yogurt con Mezcla ABY-3	Yogurt sin Mezcla ABY-3
0	4.35	4.44
5	4.35	4.44
8	4.35	4.43
16	4.35	4.43
30	4.37	4.44

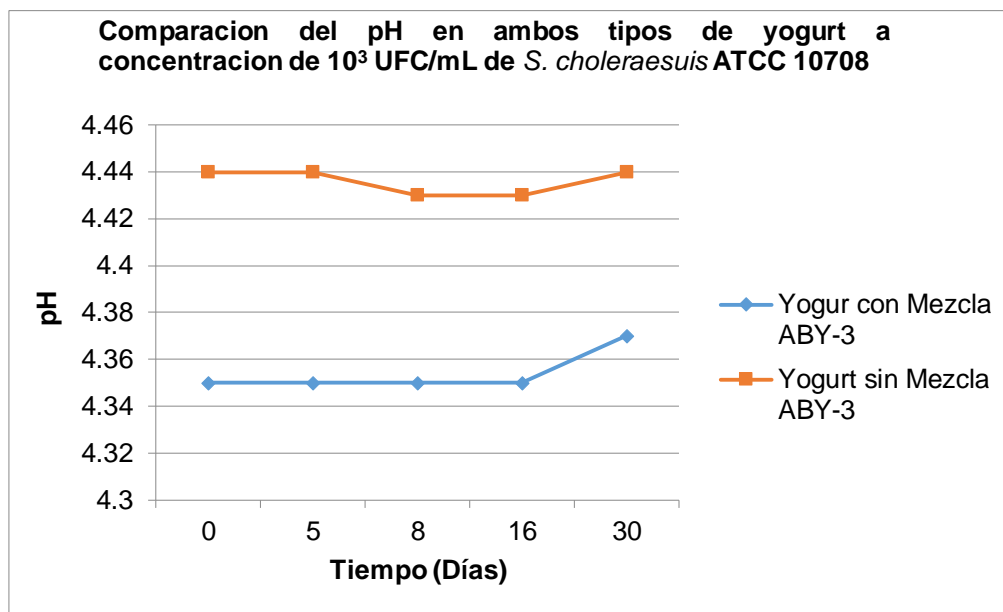


Figura No. 17 Comparación del pH en ambos tipos de yogurt a concentración de 10^3 UFC/mL de *S. choleraesuis* ATCC 10708

Para ambos tipos de yogures inoculados con *S. choleraesuis* a una concentración de 10^3 UFC/mL, la tendencia para el yogurt con mezcla ABY-3 es constante donde muestra un ascenso en el día 30 en el cual presenta un valor de pH de 4.37; sin embargo para el yogurt sin mezcla ABY-3 la tendencia a la formación máxima de ácido láctico se pone de manifiesto nuevamente en los días 8 y 16 con valores de 4.43 y un ascenso por falta de carbohidratos para fermentar al día 30. Según resultados comparativos para ambos tipos de yogurt se manifiesta que los factores que influenciaron en los resultados de pH, son una toma incorrecta de pH en las muestras, la incorrecta homogenización de cada una de las muestras antes de tomar el valor en el pHmetro, la poca cantidad de muestra. Es por ello que no se logra desarrollar la tendencia descendente de pH que expresa la formación de ácido láctico por la fermentación de los carbohidratos para el yogurt sin mezcla ABY-3, caso

contrario para el yogurt sin mezcla ABY-3 donde los valores reflejan la tendencia descendente de pH pero no por completo.

5.7 Mantenimiento de cultivo de *Salmonella choleraesuis* ATCC 10708.

El mantenimiento de la cepa patógena *Salmonella choleraesuis* ATCC 10708, se realizó como se describe en el anexo N° 3, recuperando la bacteria viable en 24 horas de incubación en caldo BHI, a partir de estas se comenzó la identificación de la bacteria.



Figura No 18. Crecimiento de *S. choleraesuis* ATCC 10708 en BHI y en Agar XLD.

5.8 Identificación de *Salmonella choleraesuis* ATCC 10708.

A partir de la bacteria viable recuperada en BHI se procedió a su análisis sembrando en tubo con agar TSI para observar un resultado a las 24 horas de amarillo en el bisel y rosado en la base del tubo sin producción de gas y producción sulfuro de hidrógeno (H_2S), es decir, alrededor de la zona de crecimiento de la bacteria se desarrolló una coloración negra, tal cual se puede observar en la figura N° 19. Además se sembró la bacteria en caldo urea obteniendo como resultado a las 24 horas ningún cambio de color, es decir, mantuvo el color amarillo del medio, lo cual confirma que corresponde a su característica bioquímica, urea negativo; ya que la cepa no tiene la capacidad

de degradar la urea del medio por su deficiencia de no poseer la enzima ureasa. Siguiendo con la identificación de la bacteria esta también se sembró en agar XLD, BS y AVS, observando en XLD colonias de color rosadas con bordes amarillos y sin producción de H₂S, en agar BS se observó colonias negras con espejo plateado alrededor, así en agar AVS no se observó cambio de color en el medio y crecieron bacterias de color rosado.

Como prueba de identificación se realizó una tinción al Gram, observando al microscopio bacilos cortos gram negativos, los cuales corresponden a la morfología típica del género *Salmonella*, tal cual y se muestra en la figura N°2.

Para finalizar se realizó una prueba bioquímica rápida API, que después de incubar 24 horas concluyo con el programa API web que la bacteria en análisis corresponde a *Salmonella entérica choleraesuis* con un nivel de confianza de 99.9%. De esta forma se aseguró que la bacteria de trabajo corresponde a la cepa de interés.

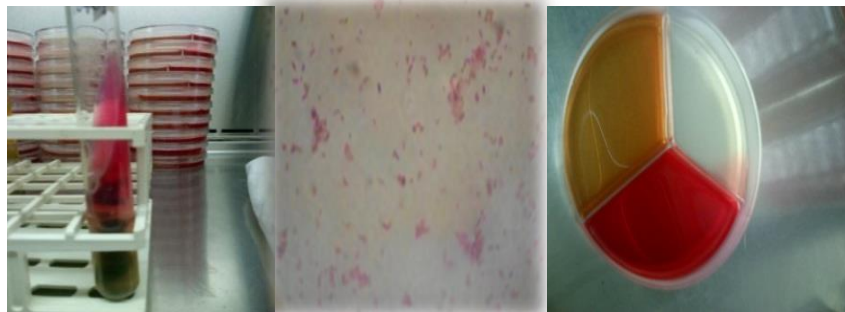


Figura N°19. Identificación de *S. choleraesuis* 10708 en TSI, tinción al Gram y agar XLD, BS y AVS.

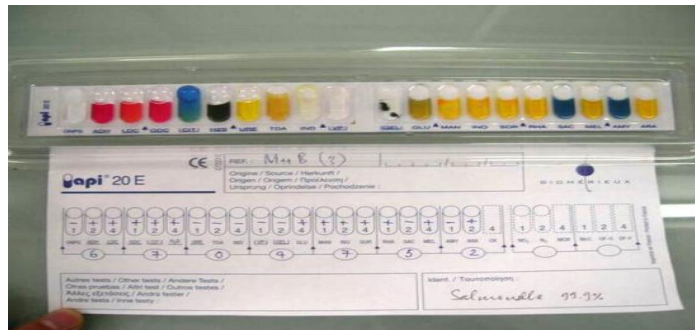


Figura N°20. Identificación de *S. choleraesuis* 10708 en prueba API

4.3 Estandarización de bacteria patógena *Salmonella choleraesuis* ATCC 10708.

La estandarización de bacteria patógena *Salmonella choleraesuis* ATCC 10708 se realizó por el método espectrofotométrico que se expresa en la metodología del anexo N°5, tomando bacterias identificadas como *Salmonella choleraesuis* ATCC 10708 desde agar TSA de 24 horas de incubación, para realizar una suspensión bacteriana con 9 mL de solución salina estéril 0.9%. A esta suspensión se le identificó como suspensión madre y se procedió a su lectura, presentándose los resultados en la Tabla No. 35 donde se expresan los valores de absorbancia que se obtuvieron de las diferentes diluciones realizadas a partir del tubo que contenía la suspensión madre, incluyendo los valores de las diferentes alícuotas tomadas de la dilución anterior. Por lo tanto a la dilución 10^5 se llegó a una absorbancia de 0.300 con una alícuota de 0.80 mL de la dilución anterior, donde se obtuvo una concentración de 1×10^9 UFC/mL de *S. choleraesuis* ATCC 10708 por medio del posterior recuento en placa vertida. Es también así que la dilución 10^6 se obtuvo una absorbancia de 0.224 con una alícuota de 0.50 mL, encontrándose a una concentración de 1.2×10^8 UFC/mL. Y según la metodología antes descrita a valores de 0.3-0.2 de absorbancia es equivalente a $1-3 \times 10^8$ bacterias/mL para bacilos Gram negativos. Por lo tanto se seleccionaron los dos últimos tubos que sus valores de absorbancias

estuvieron dentro del rango. Comprobándose por medio de un recuento microbiano en placa vertida la cantidad equivalente en UFC/mL, tal cual están tabulados. Y resultando el tubo N°6 a una absorbancia de 0.224 que fue equivalente a 1.2×10^8 UFC/mL. Posteriormente se realizaron dos diluciones al tubo estandarizado hasta obtener una concentración de 1.0×10^6 UFC/mL teóricamente, confirmando esto con un recuento microbiano por placa vertida donde los resultados obtenidos se expresan en la tabla No.36.

Tabla N° 35. Resultados de la estandarización de *S. choleraesuis* ATCC 10708.

N° de Tubo	1	2	3	4	5	6
Dilución	10^1	10^2	10^3	10^4	10^5	10^6
Alícuota (mL)	3.0	2.0	1.5	1.0	0.80	0.5
Absorbancia	0.557	0.436	0.410	0.358	0.300	0.224
Concentración (UFC/mL)					1.0E+9	1.2E+8

1.0E+9 es equivalente a 1.0×10^9

Tabla N°36. Resultados del recuento de *S. choleraesuis* ATCC 10708 de las diluciones realizadas al tubo estandarizado.

N°. de Tubo	1	2
Dilución	1/10	1/10
Concentración (UFC/mL)	1.2×10^7	1.1×10^6

El método de dilución-neutralización según las técnicas normalizadas (AENOR, 1997; AFNOR 1995) es un método espectrofotométrico, rápido y adaptado a la presente investigación ya que generalmente se utiliza para la estandarización de microorganismos utilizados para el método de dilución-neutralización de desinfectantes; pero que para el fin de estandarizar *S. choleraesuis* es muy factible y comprobándose por medio de un recuento microbiano en Placa vertida que es aplicable ya que los resultados que se obtuvieron de la estandarización están dentro del rango de $1-3 \times 10^8$ UFC/mL; pero que presenta la desventaja que el conteo es tanto para células vivas y muertas y no se puede aplicar el método a células bacterianas que forman segregados fácilmente. A diferencia de otros métodos espectrofotométricos donde se utilizan valores de transmitancia, el método de neutralización-dilución es factible debido a que los microorganismos de interés se estandarizan a valores de $1-3 \times 10^8$ bacterias/mL y no a valores de 1×10^6 , por lo que fácilmente se puede lograr llegar a la concentración de 10^6 UFC/mL por medio de dos diluciones consecuentes y evitarse así mayor número de diluciones de la suspensión madre y sus respectivas lecturas.

5.9 Estandarización de la mezcla de probióticos ABY-3

Previo a la estandarización de la mezcla de probióticos ABY-3 se determinó la concentración de probióticos equivalente a 1 gramo de la mezcla, debido a que en su empaque no se detallaba esta información, tal y cual se expresa en el Anexo N°15, resultando un valor de 1×10^{11} UFC por gramo de mezcla ABY-3. A de este valor, se estandarizó a un valor de 1.0×10^8 UFC/mL según metodología descrita en el anexo N°6, reflejando así los resultados en la Tabla No. 3 en la cual se detallan 6 diluciones seriadas, donde las dos últimas diluciones se

obtienen valores de absorbancia de 0.311 para el tubo N°5 y 0.258 para el tubo N°6, que posteriormente a través de un recuento en placa vertida se determinó su equivalente a UFC/mL, siendo estas 1.1×10^8 y 1.2×10^7 , respectivamente.

Tabla N° 37. Resultados de estandarización de mezcla de probióticos ABY-3 a partir de la suspensión madre.

N° de tubo	1	2	3	4	5	6
Dilución	10^1	10^2	10^3	10^4	10^5	10^6
Alícuota (mL)	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Absorbancia	0.595	0.473	0.399	0.351	0.311	0.258
Concentración (UFC/mL)					$1.1E+8$	$1.2E+7$

Seguidamente se realizaron dos diluciones al tubo estandarizado correspondiente a 1.0×10^7 y 1.0×10^6 UFC/mL teóricamente, confirmando esto a través de un recuento microbiano por placa vertida, tabulados los resultados en la tabla N° 38

Tabla N° 38. Resultados del recuento de mezcla de probióticos ABY-3 de las diluciones realizadas al tubo estandarizado.

N°. de tubo	1	2
Dilución	1/10	1/10
Concentración (UFC/mL)	1.2×10^7	1.16×10^6

El método de dilución-neutralización, es un método espectrofotométrico aplicable para la estandarización de los probióticos pertenecientes a la mezcla

ABY-3, ya que se comprobó por medio de los recuentos microbianos realizados en placa vertida que los resultados de absorbancias obtenidas están dentro del rango de $1-3 \times 10^8$ bacterias/mL, según metodología, para microorganismos cocos gram positivos; pero que presenta la desventaja que el recuento en placa vertida se realizó en un medio de cultivo no específico para *Bifidobacterium*, siendo este probiótico uno de los componentes de la mezcla ABY-3.

CAPITULO VI
CONCLUSIONES

6.0 CONCLUSIONES

1. La elaboración tanto del yogurt natural con las bacterias probióticas de la mezcla ABY-3 y del yogurt con un cultivo iniciador fue desarrollado correctamente ya que sus propiedades organolépticas resultaron pertenecientes a las de un producto fermentado semisólido, incluyendo que estas no fueron afectadas por la utilización de leche de cabra como sustrato.
2. La mezcla de probióticos ABY-3 presentó un efecto inhibitorio muy importante sobre las diferentes concentraciones de *S. choleraesuis* ATCC 10708, debido a que las concentraciones más bajas fueron inhibidas completamente al día 8 y a la de mayor concentración se desarrolló al día 16. Por lo tanto posee mayor capacidad de inhibir el crecimiento de *S. choleraesuis* a menores concentraciones que a la mayor concentración analizada.
3. Por la diferencia de la reducción logarítmica de *S. choleraesuis* ATCC 10708 en los días 8 y 16 de muestreo a una concentración de 10^6 UFC/mL, se concluye que el yogurt con el cultivo iniciador posee menor capacidad de inhibición que el yogurt con mezcla ABY-3.
4. La sobrevivencia de *Salmonella choleraesuis* ATCC 10708 frente a las bacterias probióticas presentes en el yogurt con un cultivo iniciador, fue mayor que la sobrevivencia frente a las bacterias probióticas de la mezcla ABY-3 en los días 8 y 16 de muestreo a la mayor concentración inoculada. Por lo tanto la bacteria patógena tiene mayor capacidad de resistir el efecto inhibitorio de los cultivos iniciadores que el efecto inhibitorio de los probióticos de la mezcla ABY-3.

5. En base a los resultados del análisis de varianza estadístico ANOVA, el comportamiento inhibitorio para los dos tipos de yogurt sobre *S. choleraesuis* ATCC 10708, es similar, o dicho de otra forma el yogurt con mezcla ABY-3 es tan efectivo como el yogurt sin mezcla ABY-3.
6. La mezcla de probióticos ABY-3 cumple con el requisito que especifica FAO/OMS para ser nombrada netamente probiótico, presentando valores de porcentajes de sobrevivencia considerables frente a las sales biliares y al pH ácido del estómago: 84.7%, y 96.4%, respectivamente.
7. Los dos tipos de yogurt elaborados presentaron valores de pH entre 4.35 a 4.45, cumpliendo con la norma mexicana NMX-F-444-1983 y por tanto es posible el almacenamiento durante un periodo de 30 días y a una temperatura de refrigeración de 4°C.
8. El yogurt con mezcla ABY-3 presentó valores de bacterias acidolácticas (BAL) constantes a una concentración de 10^6 UFC/mL, durante un período de 30 días. Por lo cual cumple con lo que especifican la Organización Panamericana de la Salud en el Código Alimentario Argentino y como se establece en la norma del Codex para leches fermentadas Codex Stand 243-2003 y por consiguiente favorece su estabilidad durante un mes.
9. El yogurt sin mezcla ABY-3 presentó valores de bacterias acidolácticas relativamente constantes, a una concentración de 10^6 UFC/mL hasta el día 16. Por lo cual cumple con lo que especifican la Organización Panamericana de la Salud en el Código Alimentario Argentino y como se establece en la Norma del Codex para leches fermentadas Codex Stand 243-2003; pero que no tiene mayor influencia sobre el efecto inhibitorio del mismo ya que la bacteria patógena queda inhibida al día 8.

CAPITULO VII
RECOMENDACIONES

7.0 RECOMENDACIONES

1. Concientizar a la población salvadoreña sobre consumo de yogurt natural, utilizando la mezcla de probióticos ABY-3 y leche de cabra como sustrato, a través de las competentes instituciones por medio de campañas informativas en escuelas, radio y televisión, haciendo énfasis sobre el buen uso de probióticos y los beneficios sobre la salud humana.
2. Desarrollar una investigación comparando el efecto inhibitorio que podrían tener los yogurts preparados a base de leche de cabra y de leche de vaca con la mezcla de probióticos ABY-3, para lograr evidenciar si existe diferencia significativa entre ellos.
3. Desarrollar el recuento de bacterias probióticas pertenecientes a la mezcla ABY-3, con medios de cultivos específicos no sólo para las bacterias acidolácticas; sino también al probiótico *Bifidobacterium*, para mejorar los resultados de los diferentes procedimientos realizados en la investigación y observar de mejor forma el comportamiento de estos durante el tiempo de análisis.
4. Desarrollar la investigación en un siguiente nivel, es decir, de manera *In vivo*, debido a la existencia de esta investigación como un antecedente del efecto inhibitorio *In vitro* de yogurts con probióticos contra cepas patógenas de *Salmonella spp.*, para poder evidenciar si el efecto inhibitorio se mantiene o presenta alguna variante.
5. Realizar investigaciones con diferentes marcas comerciales de yogurt que se comercializan en el país para comprobar el efecto inhibitorio sobre diferentes cepas patógenas representativas de las patologías gastrointestinales.

6. Aplicar el método espectrofotométrico para el recuento microbiano de la cepa patógena en el análisis de reducción de *S. choleraesuis* y analizar así si existe alguna varianza significativa entre este y el método de recuento microbiano por placa vertida.
7. Realizar un control de calidad a cada una de las materias primas utilizadas previo a la elaboración de ambos tipos de yogurts, a través de los correspondientes análisis fisicoquímicos y microbiológicos que requiere para cada materia prima, con el fin de asegurar y favorecer la calidad misma del producto y su aceptable consumo.

VIII. BIBLIOGRAFIA

1. Alcántara A. A., Rodríguez E. E. y Vargas R. G. (2001) Valoración de desinfectantes. Método de dilución –neutralización. Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública. Facultad de Medicina. Avenida de Madrid, 11. 18012 Granada, España. Disponible (Online): <http://www.bvsde.paho.org/bvsacd/cd27/higsand14.pdf>
2. Alonso M. María. R. (1994). Madrid. Nuevo Marcador Epidemiológico en Salmonella enterica subespecie I serotipo Enteritis. Tesis para optar al grado de Doctor en Medicina Preventiva y Salud Ocupacional. Facultad de Medicina. Universidad de Complutense. Disponible (online): <http://biblioteca.ucm.es/tesis/19911996/D/0/D0007601.pdf>
3. Aréchiga C.F., Aguilera J. I., Rincón R.M., S. Méndez de Lara, V.R. et al. (2008). *Situación actual y perspectivas de la producción caprina ante el reto de la Globalización Tropical and Subtropical Agroecosystems*. Vol. 9, núm. 1. México D.F.: Universidad Autónoma México. [Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal]. [Acceso 15-03-2014] [On line] Disponible: <http://www.redalyc.org/pdf/939/93911227001.pdf>.
4. Beers Mark H. y Fletcher Adrew J. (1997). *Manual Merck de Información Médica para el Hogar*. España: OCEANO. Páginas: 529-535
5. Boza J. y Sanz Sampelayo M R. *Aspectos Nutricionales de la leche de Cabra*. Granada España: Estación Experimental del Zaidín C SI C. [Acceso 08-02-2014] Disponible en: www.insacan.org/racvao/anales/1997/articulos/10-1997-07.pdf

6. Brown L. M. (2000). *Helicobacter pylori: epidemiology and routes of transmission* (pdf). *Epidemiol Rev* 22 (2). Páginas: 283–297.
7. Caffer María I., Terragno R., Binsztein N. (2008). Manual de Procedimientos Diagnostico y caracterización de *Salmonella spp.* Departamento Bacteriología Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas A.N.L.I.S. “Dr. Carlos G. Malbrán” Centro Regional de Referencia del WHO Global Salm Surv para América del Sur. Disponible (Online):
http://bvs.panalimentos.org/local/File/manual_salmonella_2008.pdf
8. Casinos B., Chenoll E., Balbarie P., Echevarria J. et al. (2010). *Probiótico Bifidobacterium biffidum CECT 7366 Strain activa contra la patógena Helicobacter pylori.* *Journal of Applied and Environmental Microbiology.*
9. Cheng-Hsun Chiu, Lin-Hui Su, Chishih Chu. (2004). *Salmonella enterica* Serotype Choleraesuis: Epidemiology, Pathogenesis, Clinical Disease, and Treatment. *Clinical Microbiology Reviews.* Disponible (Online): <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC387403/>
10. Chr. Hansen. Aseal de El Salvador S.A. de C.V (2004). *The Probiotic effects of LA-5® and BB-12®.* [On line]. Disponible en: www.chr-hansen.com
11. Codex Alimentarius. (2003). *Normas del Codex para Leches Fermentadas. CODEX STAN 243-2003.* Autor
12. Collado A. María C. (2004). *Caracterización de cepas del género Bifidobacterium con carácter probiótico.* España: Universidad Politécnica de Valencia. [On line]. Disponible en: <http://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/1907/tesisUPV2209.pdf>

13. Díaz, M. y Montes, M. (2012). *Efecto de probióticos a base de bacillus sp., enterococcus sp., pediococcus sp. y lactobacillus sp., en la sobrevivencia y crecimiento larval del camarón blanco litopenaeus vannamei, en la estación de maricultura los Cóbano, Sonsonate.* Trabajo de graduación para optar al título de licenciada en medicina veterinaria y zootecnia. San Salvador: Universidad de El Salvador. Facultad de Ciencias Agronomicas.
14. Dirección General de Normas de México. (1983). *NMX-F-444-1983. Alimentos. yoghurt o leche búlgara. Foods. Yoghurt or bulgarian milk. Normas mexicanas.* México. Autor
15. Dr. Rodríguez U. Carlos. *Úlcera Péptica, Tópicos Selectos en Medicina Interna – Gastroenterología.* Capítulo 11. [On line] [Acceso 10-02-2014] Disponible : http://www.cmp.org.pe/documentos/librosLibres/tsmi/Cap11_Ulcera_peptica.pdf
16. *El yogurt y las leches fermentadas.* Tema 6, del Congreso Latinoamericano de ciencias y tecnología. [Artículo en Internet] [Acceso: 15-02-2014] Disponible en http://www.revistavirtualpro.com/files/ti13_200512.pdf
17. Estrada, J. (2007). *Efecto de los probióticos Lactobacillus acidophilus y Bifidobacterium bifidum en la características físico-químicas y sensoriales del yogur de fresa Zamorano.* Proyecto de Graduación del Programa de Ingeniería en Agroindustria Alimentaria. Honduras: Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano.
18. Food and Drug Administration. (1992). *Bacteriological Analytical Manual.* 7th Edition. Arlington, VA: AOAC International. Autor

19. Galdámez L. Juan E. (2007). *El papel de la Producción Caprina Tecnificada en la Seguridad Alimentaria Láctea Familiar*. USAM. Trabajo publicado en la Revista SOMOS. Año IX; No. 27. Páginas 16-17. [Online]. [Acceso: 20-02-2014] Disponible: www.usam.edu.sv/usam/images/stories/ARTICULOSICTUSAM/LA%20PRODUCCION%20CAPRINA.pdf
20. Hsui Chi, Cheng. Ai Wen, Kao. Bor Shyang, Sheu. Shan Tair, Wang. (2006). *Pretratamiento con Lactobacillus y Bifidumbacterium contenido en yogurt puede mejorar la eficacia de la terapia cuádruple en la erradicación de Helicobacter pylori después del tratamiento*. The American Journal of Clinical Nutrition.
21. II Simposio Internacional de Patología Gastroduodenal. (2000). "Helicobacter pylori" Primer Consenso Argentino para su diagnóstico y tratamiento. [Online]. [Acceso: 18-09-2004]. Disponible en: http://www.caded.org/helicobacter_pylori.htm
22. Karl F. (1998). *Elaboración artesanal de mantequilla, yogurt y queso*. 1ra ed. Zaragoza, España: Editorial Acribia S.A.
23. López Brea M. y Col, Correa P, Skirrow M. B., Marshall B. J. (2004). *"Helicobacter Pylori. Retos para el siglo XXI"*. [Online]. [Acceso: 15-02-2014]. Disponible en: <http://www.helicobacterspain.com/index800.htm>
24. López, B. y Villagomez, L. (2011). *Elaboración de un probiótico a base de microorganismos y evaluación de su efecto benéfico al proceso digestivo de la tilapia roja (oreochromis spp.) en etapa de engorde en la zona de rio Lempa, Chalatenango*. Trabajo de graduación para optar al título de Master en Gestión Medio Ambiental. El Salvador: Universidad Centroamericana José Simeón Cañas.

25. Maldonado L Erika Y. (2013). Determinación del efecto de *Lactobacillus acidophilus* con potencial probiótico sobre la bacteria patógena: *Salmonella typhimurium* y su tiempo de sobrevivencia a los ácidos biliares y pH ácido del estómago. Trabajo de Graduación para optar al grado de Licenciatura en Química y Farmacia. Universidad de El Salvador. El Salvador.
26. Marshall BJ, Warren JR (1984). *Unidentified curved bacilli in the stomach patients with gastritis and peptic ulceration*. *Lancet* (8390): Páginas. 1311–1315
27. Marshall BJ. (1983). *Unidentified curved bacilli in gastric epithelium in active chronic gastritis*. *Lancet*; Capítulo I. Páginas:1273-1275
28. Ministerio de Gobernación de El Salvador. (2009). *Diario oficial, Tomo N°384: Norma Salvadoreña Obligatoria: NSO.67.01.10:08. Productos Lácteos. Yogurt. Especificaciones*. Primera actualización. San Salvador: Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, CONCACYT. Autor.
29. Ministerio de Salud Pública de El Salvador (MINSAL). Datos epidemiológicos consolidados en El Salvador durante 2014. Dirección de Vigilancia Sanitaria. Disponible online en: http://www.salud.gob.sv/archivos/vigi_epide2014/depto_consolidado342014.pdf. Autor
30. Ministerio de Salud Pública. Instituto de Salud Pública. Gobierno de Chile Procedimiento Detección de Salmonella en Alimentos por Método Convencional. Disponible (online) : http://www.ispch.cl/lab_amb/doc/microbiologia_alimentos/PRT-012.pdf
31. Montiel B. Alexandra. (2010). *Evaluación in vitro de acción de cultivos probióticos (Bifidobacteria) sobre cepas de enterobacterias (E. coli,*

Klebsiella pneumoniae y *Enterobacter*) nosocomiales con resistencia *microbiana*. Trabajo Final presentado para optar al título de Especialista en Ciencia y Tecnología de Alimentos. Colombia: Universidad Nacional de Colombia.

32. Pachón C. Diana A. (2009). Bogotá Colombia. Aislamiento, identificación y Serotipificación de Enterobacterias del Género Salmonella en una población de *Crocodylus intermedius* y Testudinos mantenidos en cautiverio en la Estación de Biología Tropical Roberto Franco E.B.T.R.B.. Facultad de Ciencias en la Universidad de la Universidad de Colombia en Villavicencio. Páginas: 20-27 Disponible en: <http://javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis198.pdf>
33. Pineda Yuraima. (2005). Revista Digital del Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias de Venezuela. Salmonelosis porcina. Laboratorio de Bacteriología, Sanidad Animal, INIA-CENIAP, Maracay. Disponible (Online) en: http://sian.inia.gob.ve/repositorio/revistas_tec/ceniaphoy/articulos/n8/arti/pineda_y/pineda_y.htm
34. Santos A. y Vega D. (2012). *Estandarización del proceso de fermentación de leche ultrapasteurizada con gránulos de kéfir*. [Tesis de grado.] San Salvador: Universidad de El Salvador. Facultad de Química y Farmacia. Página: 102.
35. Secretaría de Agricultura Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, SAGARPA. *Manual de Buenas Prácticas en Producción de Leche Caprina*. México. Autor. [On line]. [Acceso: 12-02-2014]. Disponible en : http://www.sagarpa.gob.mx/ganaderia/Publicaciones/Lists/Manuales%20de%20Buenas%20Prcticas/Attachments/3/manual_cabra.pdf

36. Silva H. Eryck R, Herrera L. Rosa G, Hernández O. Esther D, Cruz H. Elvia, Galán M. Frixia, Aquino B. Elia, et al. (2010) *Productos no tradicionales de la leche de cabra: helados y yogurt*. Primer Foro sobre la Ganadería Leche en la Zona Alta de Veracruz México. Veracruz: Universidad Veracruzana. [Artículo en Internet] [Acceso: 15-02-2014] Disponible en http://www.uv.mx/apps/agronomia/foro_lechero/Bienvenida_files/PRODUCTOSNOTRADICIONALESDELECHECABRA.pdf
37. Villardón José L. V. Introducción al Analisis de Varianza. Departamento de Estadística. Disponible en Línea en: <http://biplot.usal.es/problemas/libro/7%20ANOVA.pdf>
38. Wyngaarden James B., Lloyd H. Smith. (1991). *Tratado de Medicina Interna*. 18a edición. Volumen I. Estados Unidos: McGraw-Hill Editorial. Páginas: 766-770.

IX. GLOSARIO (4) (10) (14) (18)

ANOVA: Es un modelo estadístico que sirve para comparar las variables significativas entre varios grupos de análisis.

Criovial: Recipiente diseñado para almacenar los materiales a temperaturas muy bajas. En este caso almacenar cultivos puros de cepas bacterianas.

Cultivo iniciador: Microorganismos puros aislados, que dirigen el proceso de fermentación de un determinado alimento para mantener el control de proceso y asegurar la estandarización del producto final.

Efecto inhibitorio: Propiedad de una sustancia para disminuir o reducir el índice de crecimiento de un microorganismo.

Efecto sinérgico: Aquel que se produce cuando el efecto conjunto de la presencia simultánea de varios agentes supone una incidencia ambiental mayor que el efecto suma de las incidencias individuales contempladas aisladamente.

Electrodo: Extremo de un conductor en contacto con un medio, al que lleva o del que recibe una corriente eléctrica.

Estándar McFarland: Se usa como referencia en suspensiones bacteriológicas para saber que el número de bacterias por mililitro, o más bien en UFC según la escala que va de 0.5-10. Estos estándares son creados al mezclar soluciones

de cloruro de bario al 1% con ácido sulfúrico al 1% en volúmenes específicos, para asegurar la densidad correcta se puede controlar usando espectrofotómetro

Frotis: Extensión de una suspensión bacteriana en un portaobjetos con el fin de lograr de su visualización al microscopio.

In vitro: palabra de origen latín que significa “ dentro del vidrio”, se refiere a la técnica utilizada para realizar un experimento en un ambiente controlado y fuera de un organismo vivo, generalmente a partir de la utilización de células o microorganismos específicos.

Probiótico: Palabra de origen latino que significa “a favor de la vida”, son todas aquellas bacterias que benefician y conviven en el tracto gastrointestinal en simbiosis con el cuerpo humano.

Sales biliares: Mezcla de sales de sodio y potasio contenidas en los ácidos biliares. Son secretadas al intestino para ayudar a emulsionar y digerir las grasas.

Sinéresis: Es la separación de las fases que componen una suspensión o mezcla. Es la expulsión de un líquido en un gel, por lo que el gel pasa de ser una sustancia homogénea a una segregación de componentes sólidos separados y contenidos en la fase líquida.

ANEXOS

Anexo N° 1

Organización de muestras de yogurt con mezcla ABY-3 y yogurt sin mezcla ABY-3 ⁽²⁵⁾.

Día						
Concentración del inoculo de <i>Salmonella c.</i> UFC/mL	0	10	15	25	30	Total de muestras por concentración de inoculo
10^6	Muestra A1	Muestra A5	Muestra A9	Muestra A13	Muestra A17	5
	Muestra B1	Muestra B5	Muestra B9	Muestra B13	Muestra B17	5
10^5	Muestra A2	Muestra A6	Muestra A10	Muestra A14	Muestra A18	5
	Muestra B2	Muestra B6	Muestra B10	Muestra B14	Muestra B18	5
10^4	Muestra A3	Muestra A7	Muestra A11	Muestra A15	Muestra A19	5
	Muestra B3	Muestra B7	Muestra B11	Muestra B15	Muestra B19	5
10^3	Muestra A4	Muestra A8	Muestra A12	Muestra A16	Muestra A20	5
	Muestra B4	Muestra B8	Muestra B12	Muestra B16	Muestra B20	5
Total de muestras por día de muestreo	8	8	8	8	8	40

A: Yogurt con mezcla ABY-3

B: Yogurt sin mezcla ABY-3 (control)

Anexo 3.

4.3.1 Mantenimiento de cultivo de *Salmonella choleraesuis* ATCC 10708

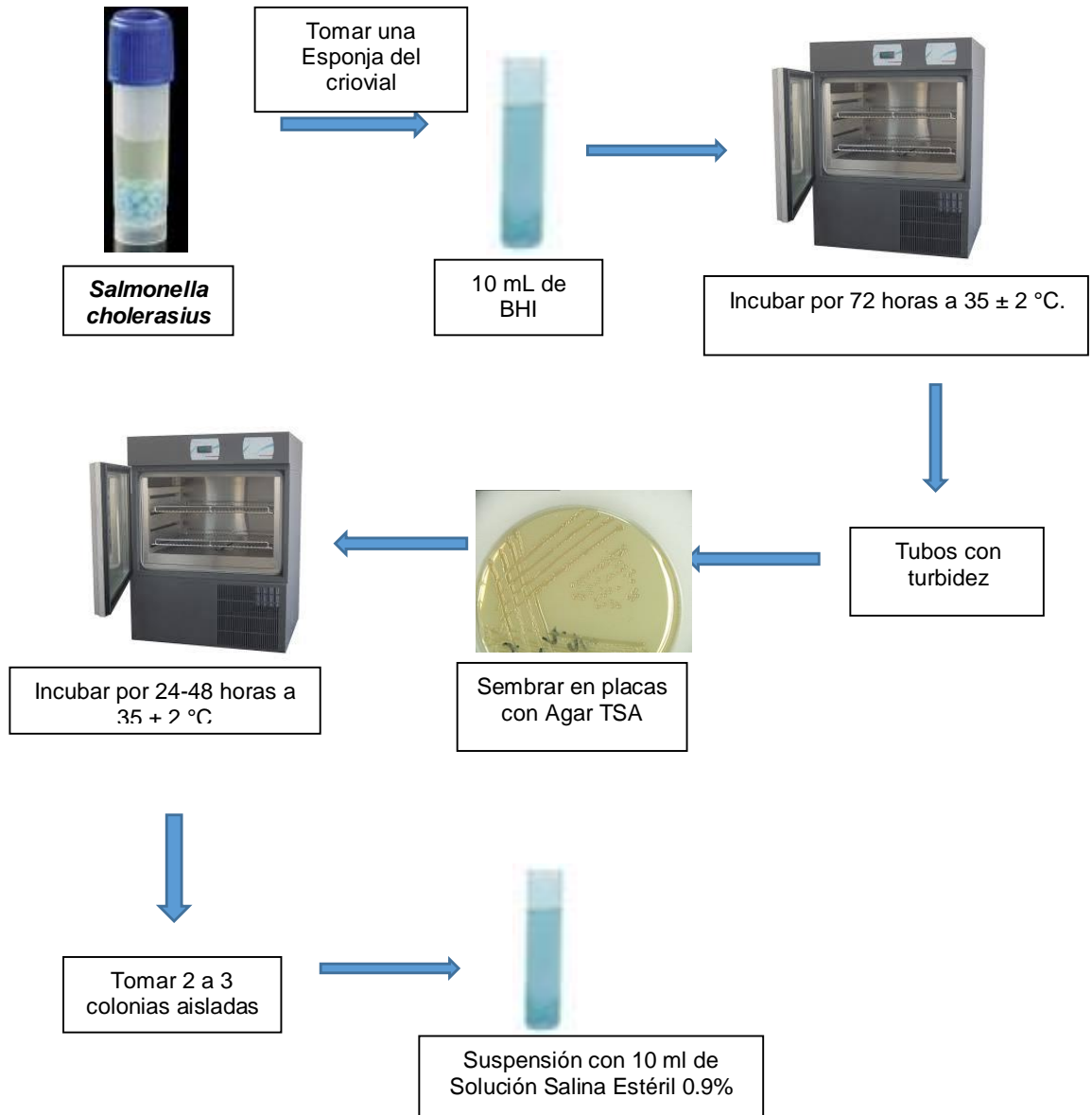


Figura N° 21. Mantenimiento de cultivo de *S. choleraesuis* ATCC 10708.

ANEXO N° 4

IDENTIFICACIÓN DE LA BACTERIA DE TRABAJO: *Salmonella choleraesuis*
ATCC 10708

Anexo N° 4

Identificación de la bacteria de trabajo: *Salmonella choleraesuis* ATCC 10708

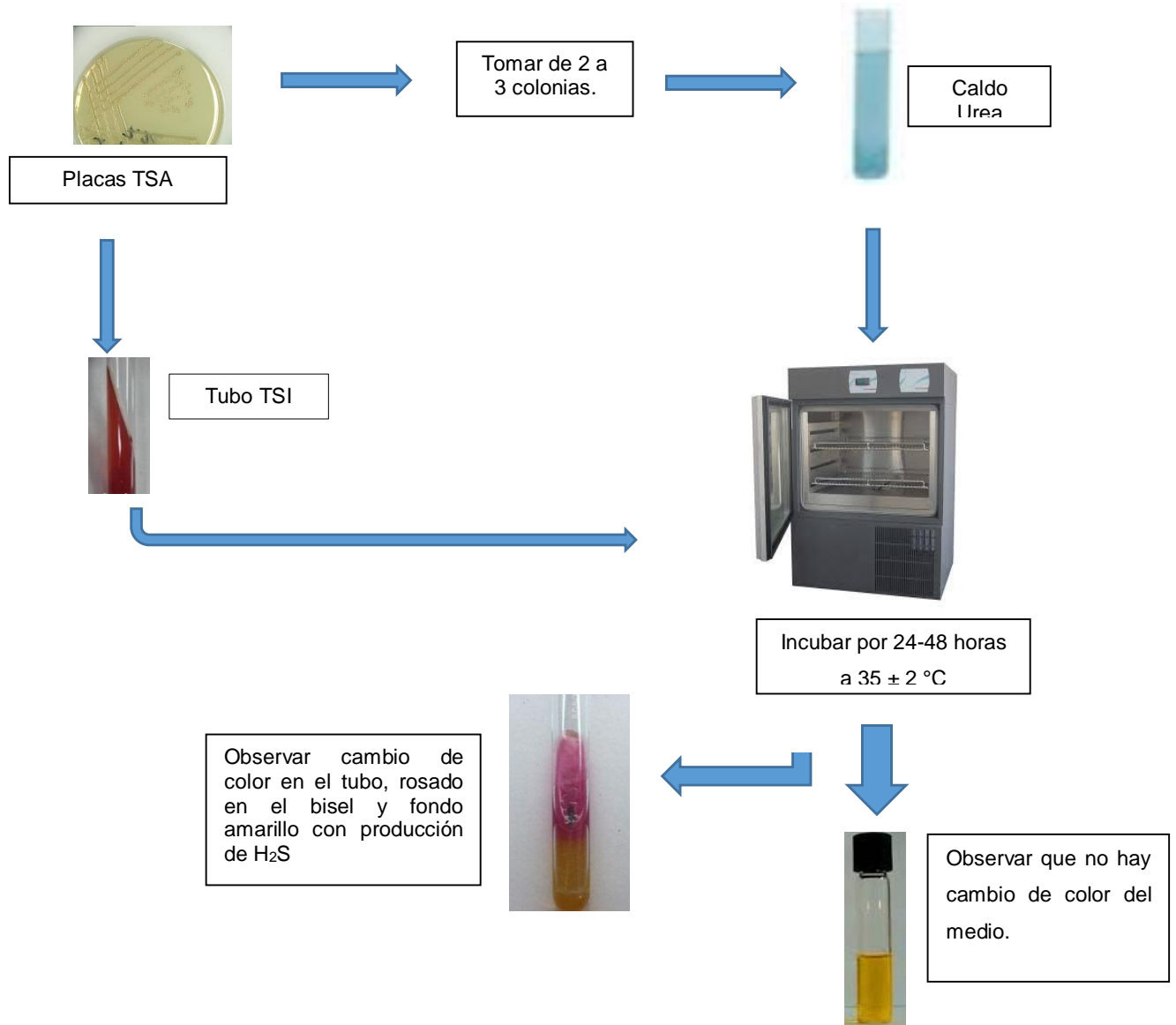


Figura N° 22. Identificación de la bacteria de trabajo: *S. choleraesuis*. ATCC

10708

Identificación de la bacteria de trabajo (Continuación)

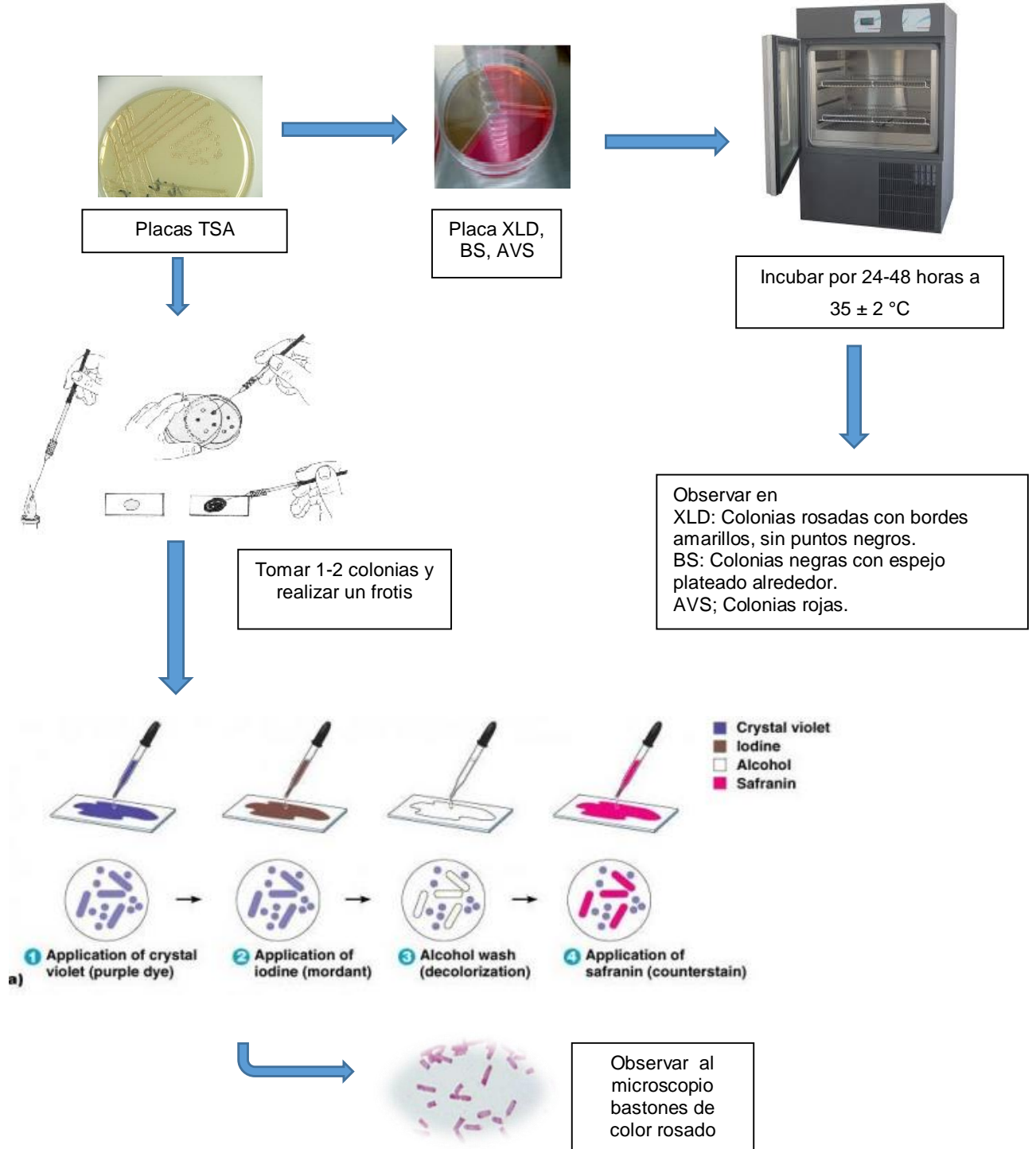


Figura N° 22. Continuación

Identificación de la bacteria de trabajo (Continuación)

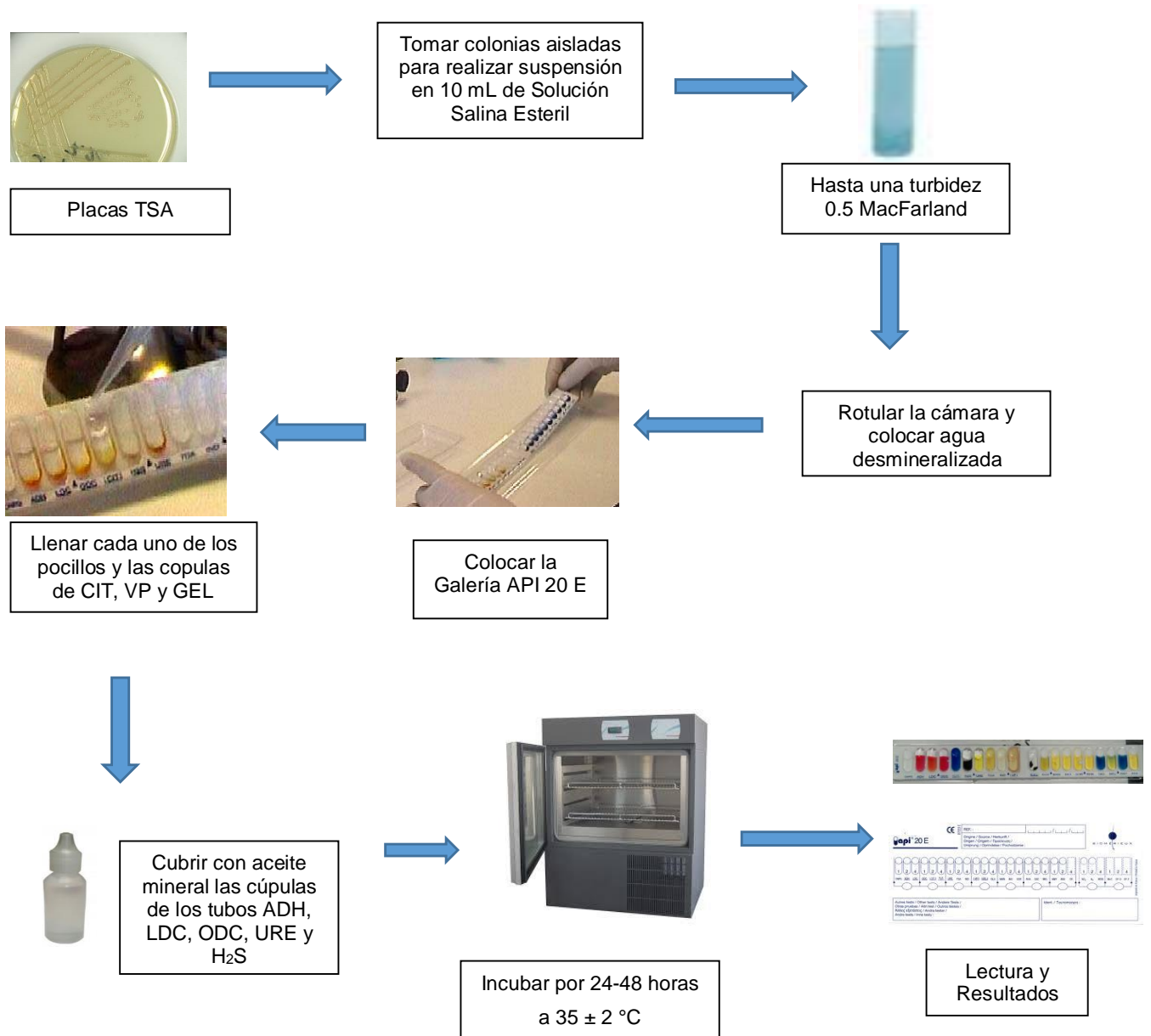


Figura N° 22. Continuación

ANEXO N°5
ESTANDARIZACIÓN DE BACTERIA PATÓGENA: *Salmonella choleraesuis*
ATCC10708

Anexo N°5.

Estandarización de bacteria patógena: *Salmonella choleraesuis* ATCC10708

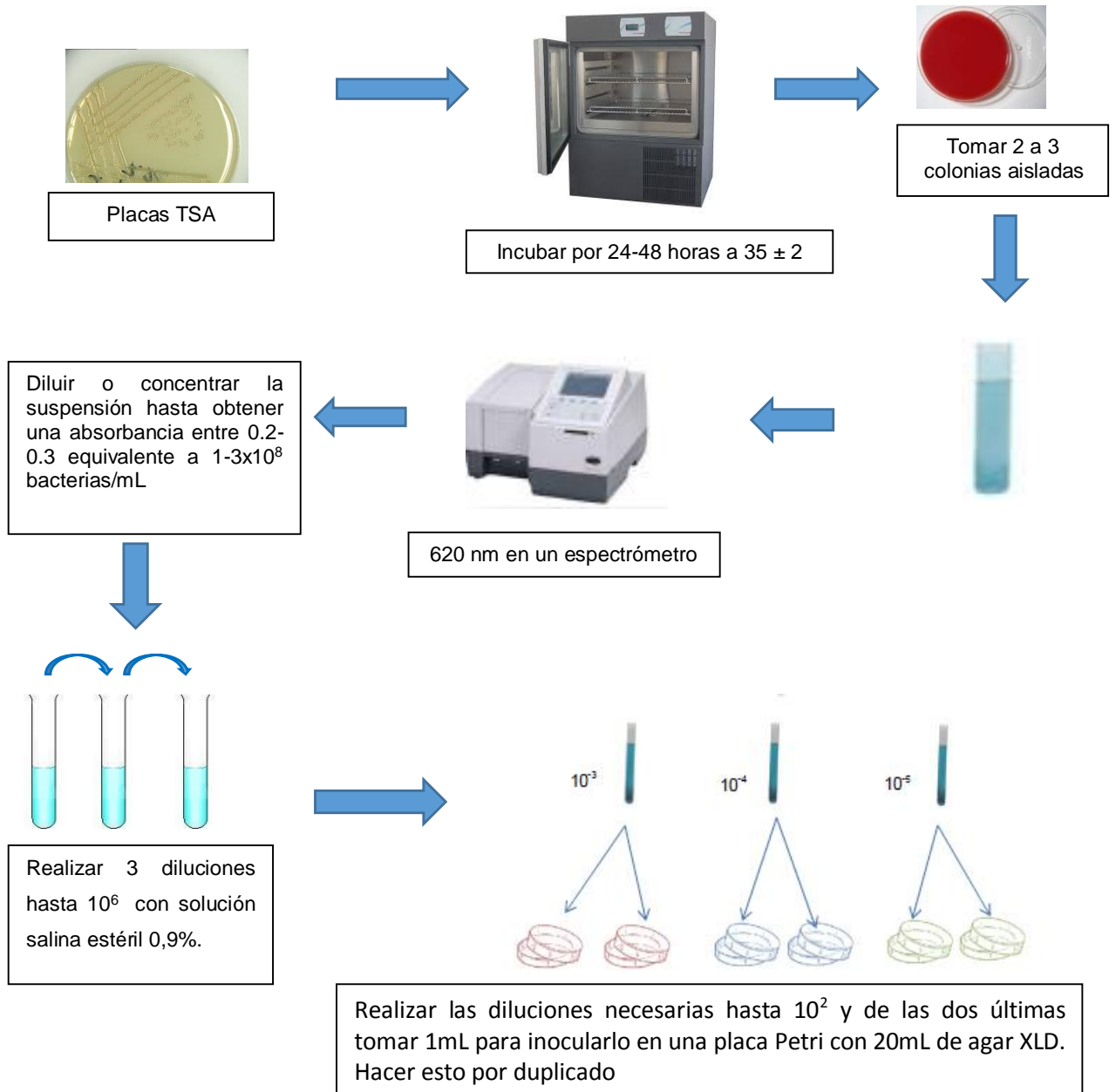


Figura N° 23. Estandarización de la bacteria de trabajo: *S. choleraesuis* ATCC 10708

Estandarización de Bacteria Patógena (Continuación)

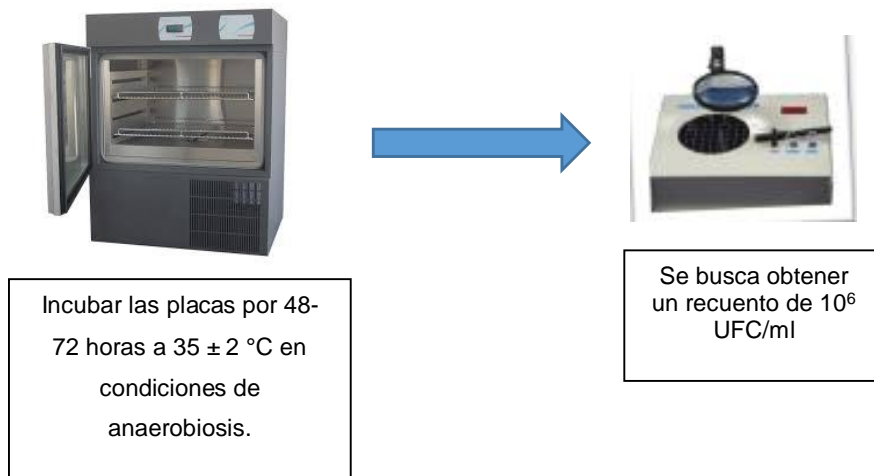


Figura N° 23. Continuación

Anexo N° 6

Estandarización de mezcla de probióticos ABY-3

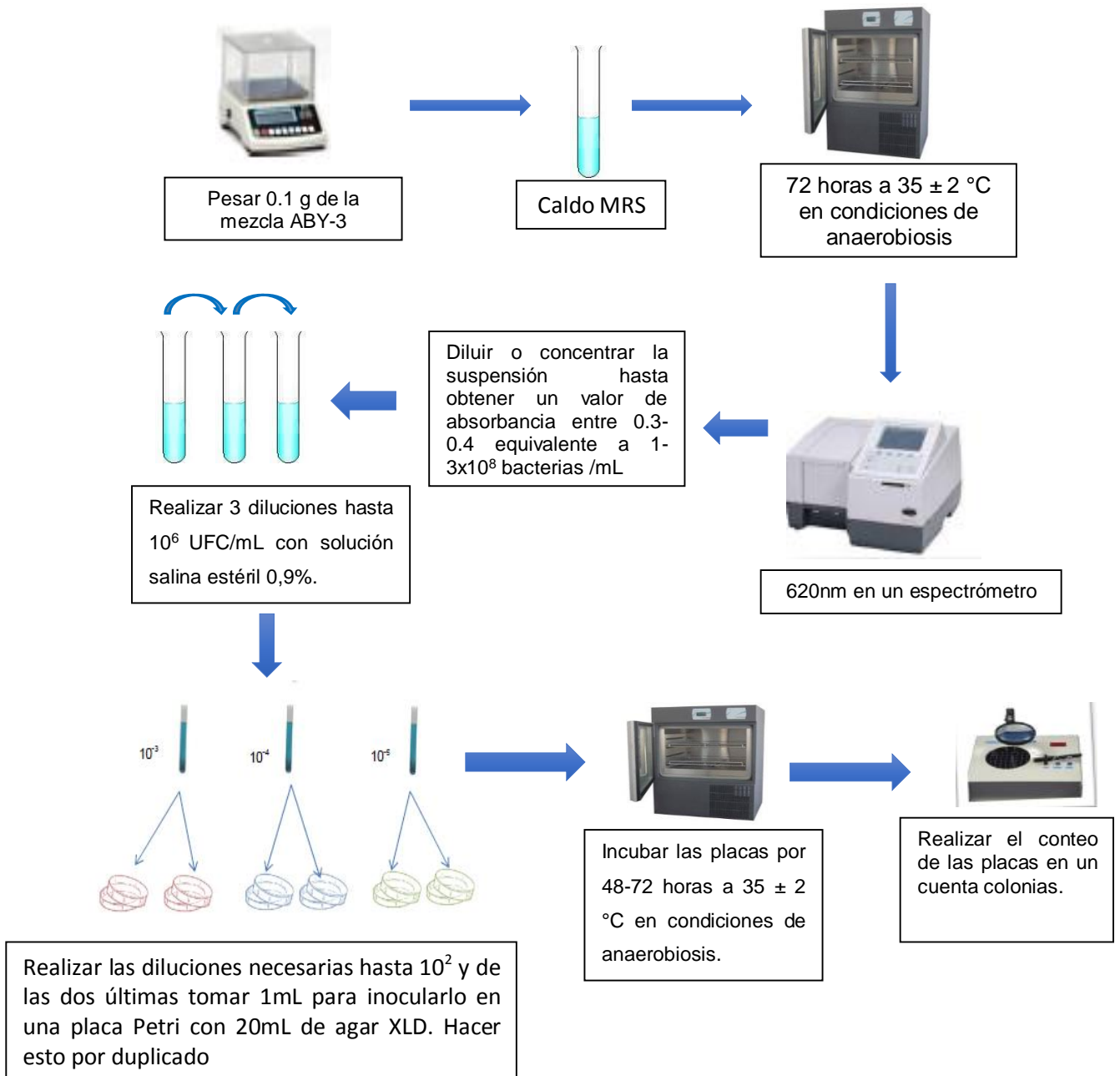


Figura N° 24. Estandarización de la mezcla de probióticos ABY-3

Anexo N° 7

Elaboración de yogurt con mezcla ABY-3

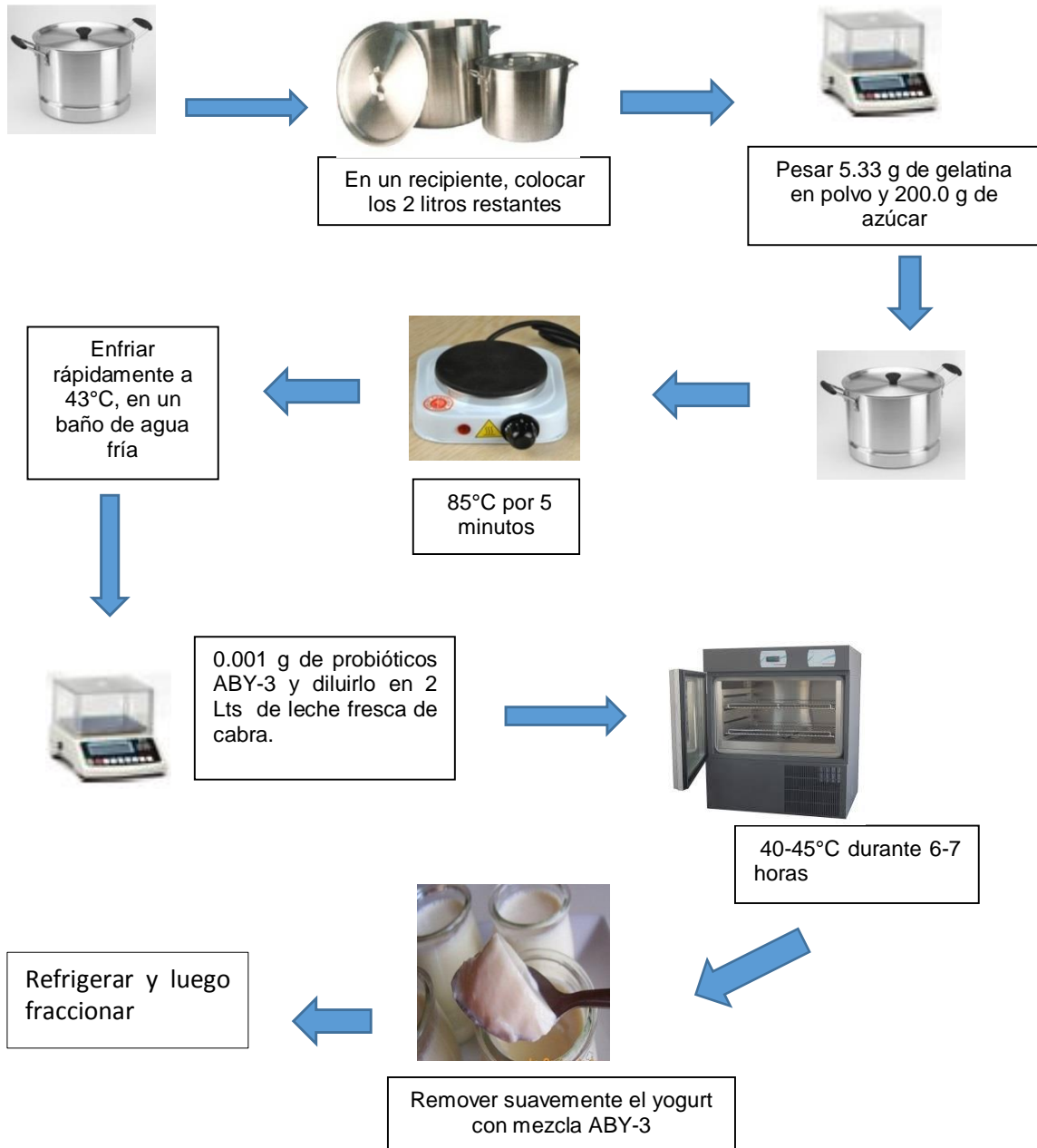


Figura N° 25. Elaboración de yogurt con mezcla ABY-3

Anexo N° 8

Elaboración de yogurt sin mezcla ABY-3

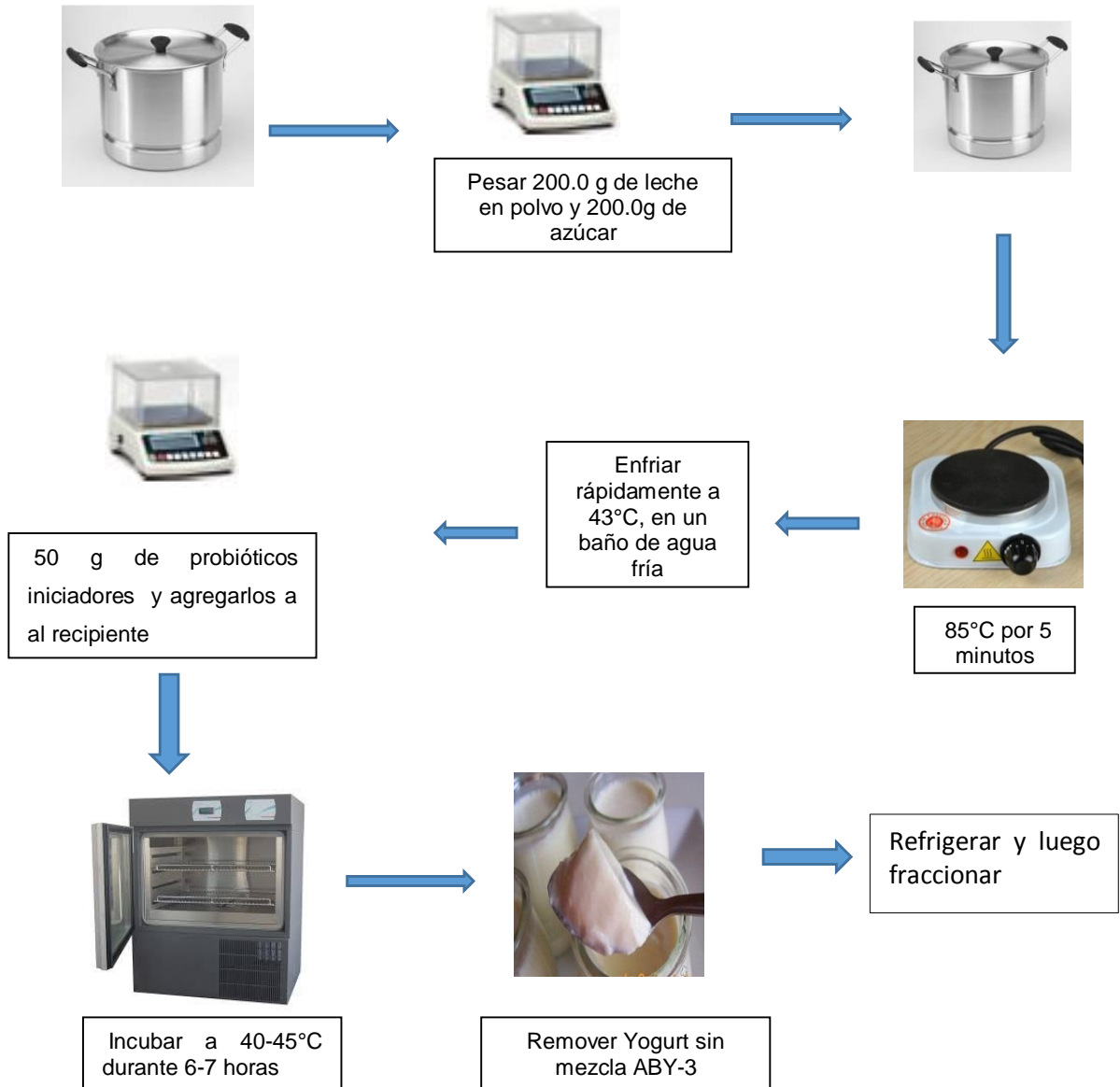


Figura N° 26. Elaboración de yogurt sin mezcla ABY-3

ANEXO N° 9

INOCULACIÓN DE *Salmonella choleraesuis* ATCC 10708 EN MUESTRAS DE YOGURT CON MEZCLA ABY-3 Y MUESTRAS DE YOGURT SIN MEZCLA ABY-3.

Anexo N° 9

Inoculación de *Salmonella choleraesuis* ATCC 10708 en muestras de yogurt con mezcla ABY-3 y muestras de yogurt sin mezcla ABY-3.

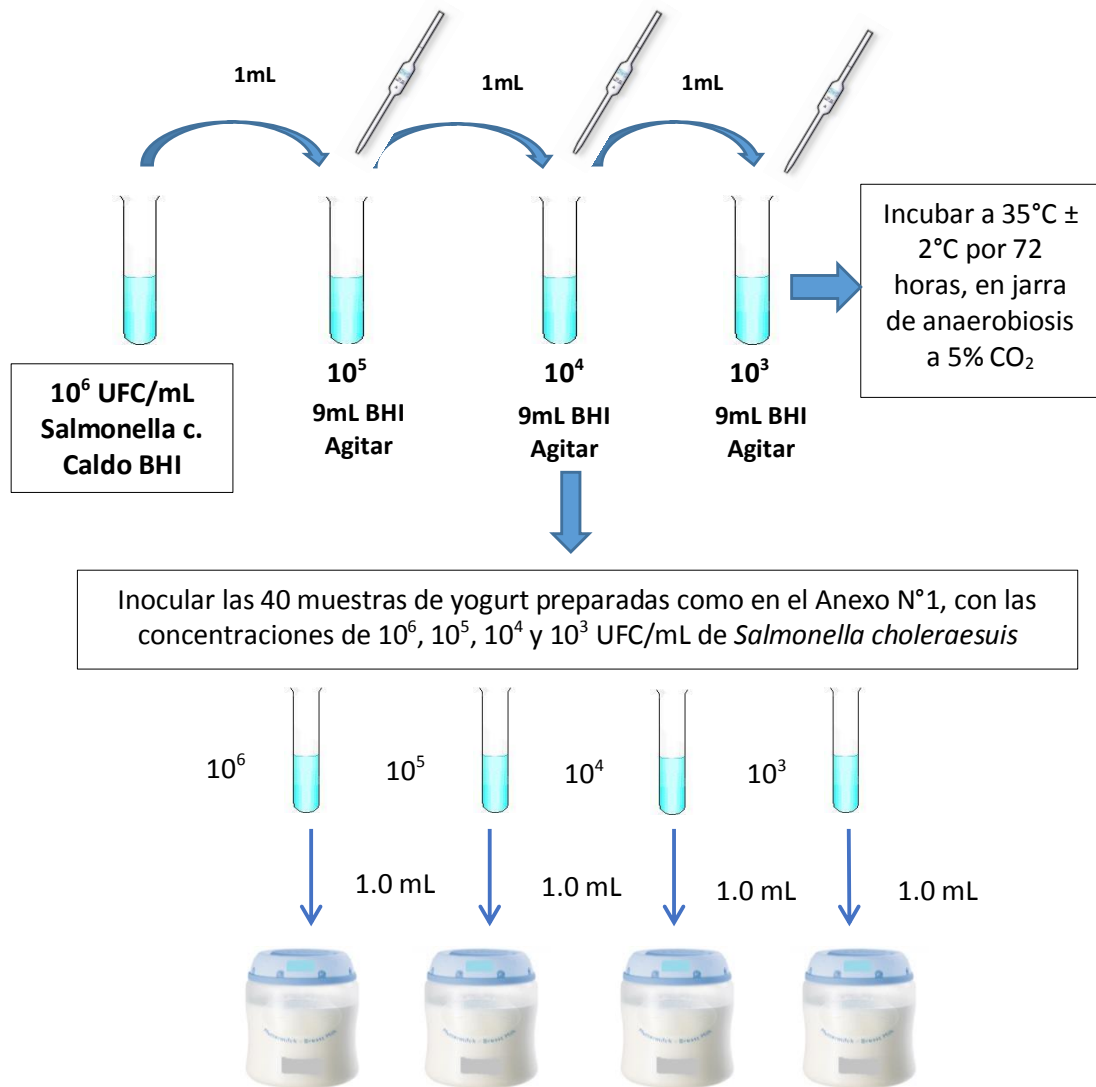


Figura N° 27. Inoculación de *S. choleraesuis* ATCC 10708 en muestras de yogurt con mezcla ABY-3 y muestras de yogurt sin mezcla ABY-3.

**Inoculación de *Salmonella choleraesuis* ATCC 10708 en muestras de yogurt con mezcla ABY-3 y muestras de yogurt sin mezcla ABY-3.
(Continuación)**

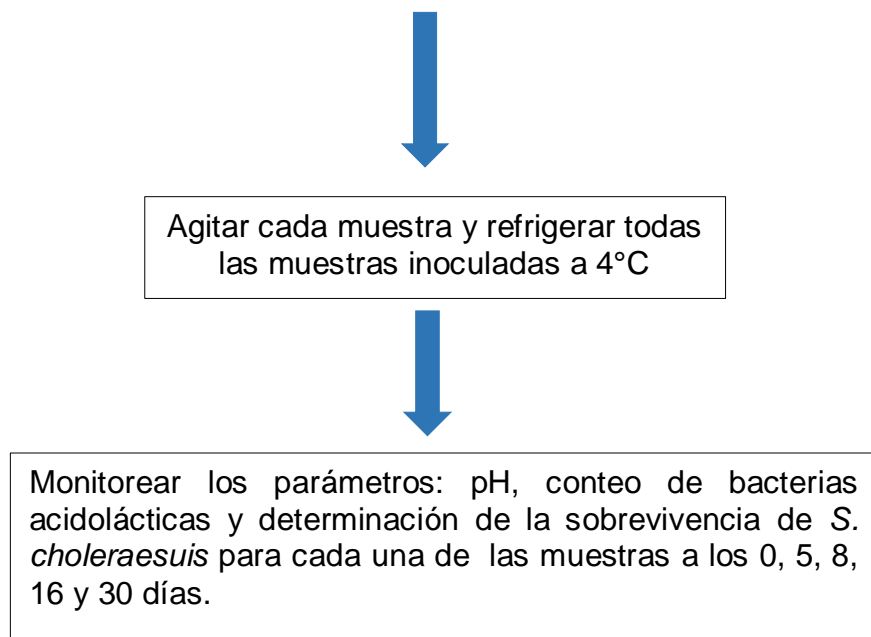


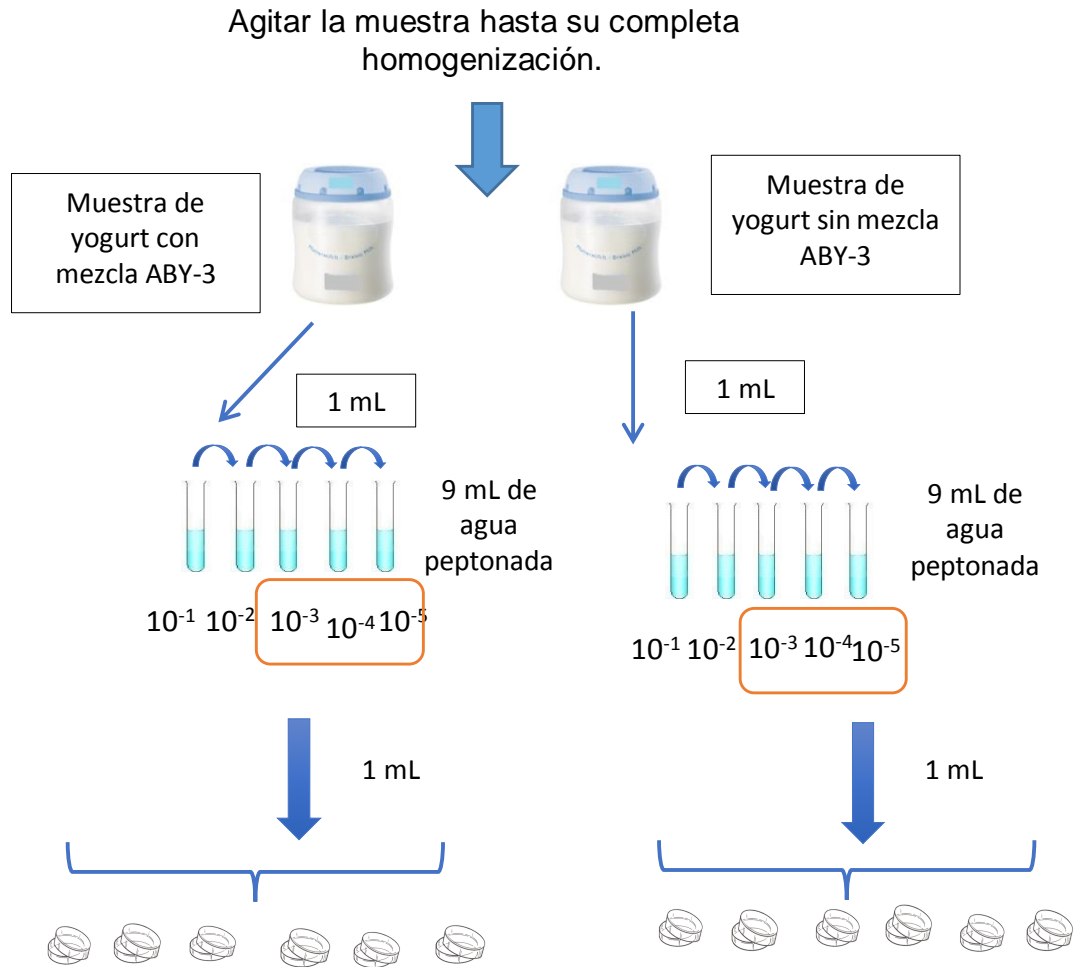
Figura N° 27. Continuación

ANEXO N° 10

CONTEO DE BACTERIAS ACIDOLÁCTICAS EN EL YOGURT CON MEZCLA ABY-3 Y EN EL YOGURT SIN MEZCLA ABY-3 DURANTE 0, 5, 8, 16 Y 30 DÍAS.

Anexo N° 10

Conteo de bacterias acidolácticas en el yogurt con mezcla ABY-3 y en el yogurt sin mezcla ABY-3 durante 0, 5, 8, 16 y 30 días.



Realizar diluciones a cada una de las muestras hasta la dilución 10^{-5} , agitando. Y de las tres últimas diluciones transferir 1 mL a una placa Petri (por duplicado). Verter aproximadamente 20 mL de agar MRS.

Figura N° 28. Conteo de bacterias acidolácticas en el yogurt con mezcla ABY-3 y en el yogurt sin mezcla ABY-3 durante 0, 5, 8, 16 y 30 días.

Conteo de bacterias acidolácticas en el yogurt con mezcla ABY-3 y en el yogurt sin mezcla ABY-3 durante 0, 10,15, 20 y 30 días. (Continuación)



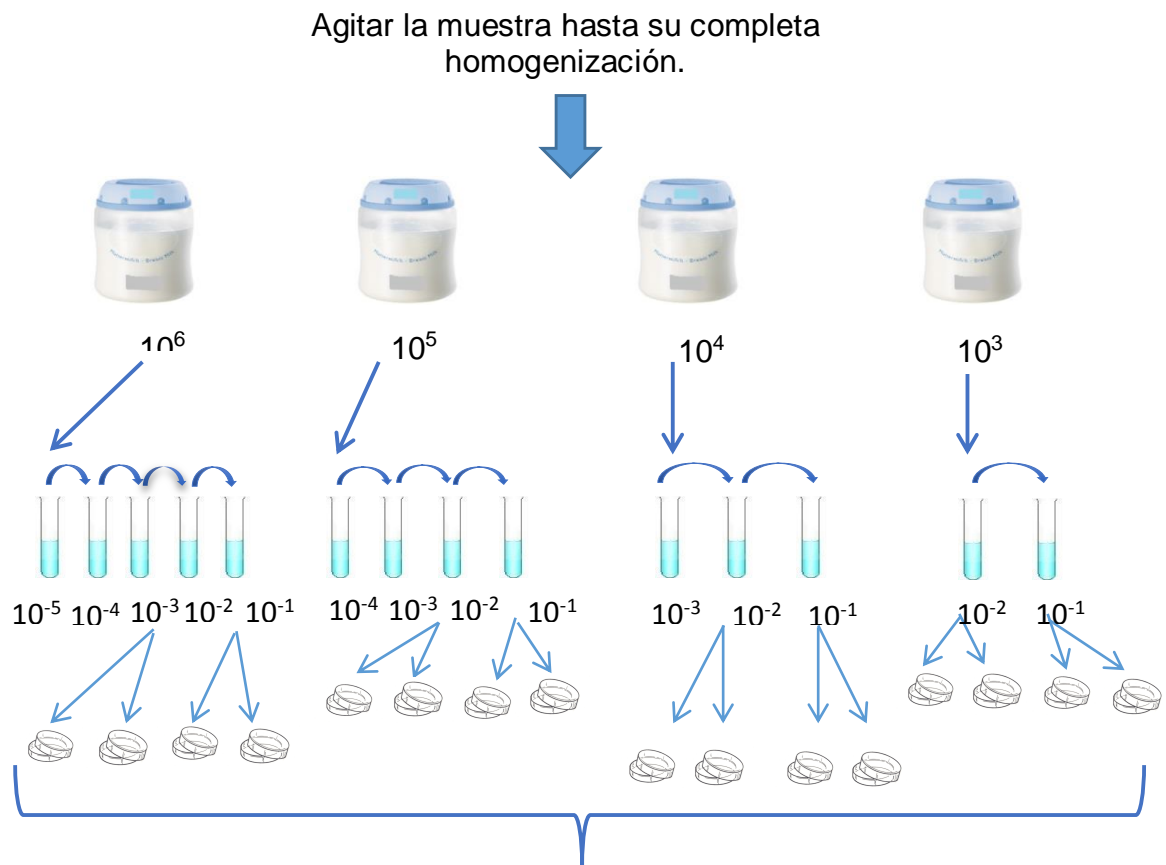
Figura N° 28. Continuación

ANEXO N° 11

**DETERMINACIÓN DE LA SOBREVIVENCIA DE *S. choleraesuis* ATCC 10708
FRENTE A LAS BACTERIAS ACIDOLÁCTICAS DEL YOGURT CON
MEZCLA ABY-3 Y YOGURT SIN MEZCLA ABY-3.**

Anexo N° 11

Determinación de la sobrevivencia de *S. choleraesuis* ATCC 10708 frente a las bacterias acidolácticas del yogurt con mezcla ABY-3 y yogurt sin mezcla ABY-3.



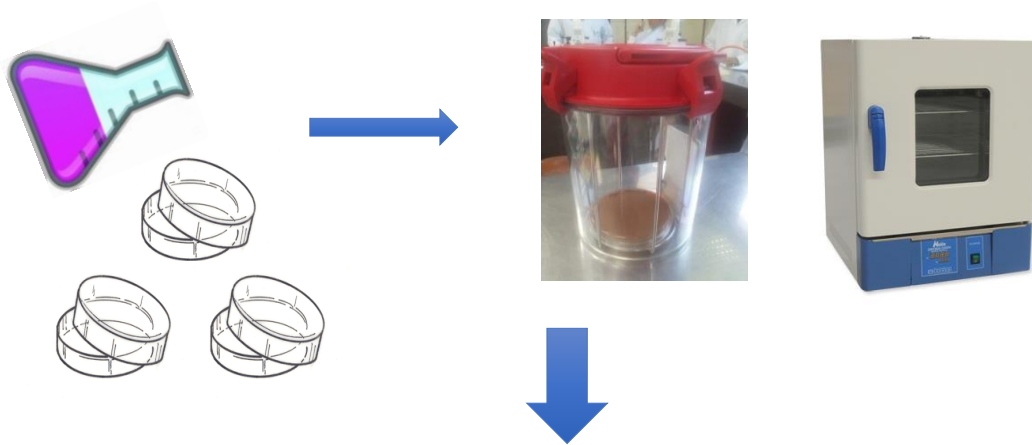
Realizar diluciones a cada una de las muestras hasta la dilución 10^{-1} , agitando. Y de las dos últimas diluciones transferir 1 mL a una placa Petri (Por duplicado).

Figura N° 29 Determinación de la sobrevivencia de *Salmonella choleraesuis* ATCC 10708 frente a las bacterias acidolácticas del yogurt con mezcla ABY-3 y yogurt sin mezcla ABY-3.

Determinación de la sobrevivencia de *S. choleraesuis* ATCC 10708 frente a las bacterias acidolácticas del yogurt con mezcla ABY-3 y yogurt sin mezcla ABY-3. (Continuación)



Agregar a cada una de las placas aproximadamente 20mL de agar XLD. Incubar en jarra de anaerobiosis a $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 24 -48 horas.



Después del tiempo de incubación, contabilizar las colonias sobrevivientes de *Salmonella choleraesuis* a través de un contador de colonias.



Figura N° 29. Continuación

ANEXO N° 12

**EVALUACIÓN DE LA TOLERANCIA DE LA MEZCLA DE PROBIÓTICOS
ABY-3 A LAS SALES BILIARES Y AL PH ÁCIDO DEL ESTÓMAGO.**

Anexo N° 12

Evaluación de la tolerancia de la mezcla de probióticos ABY-3 a las sales biliares y al pH ácido del estómago.

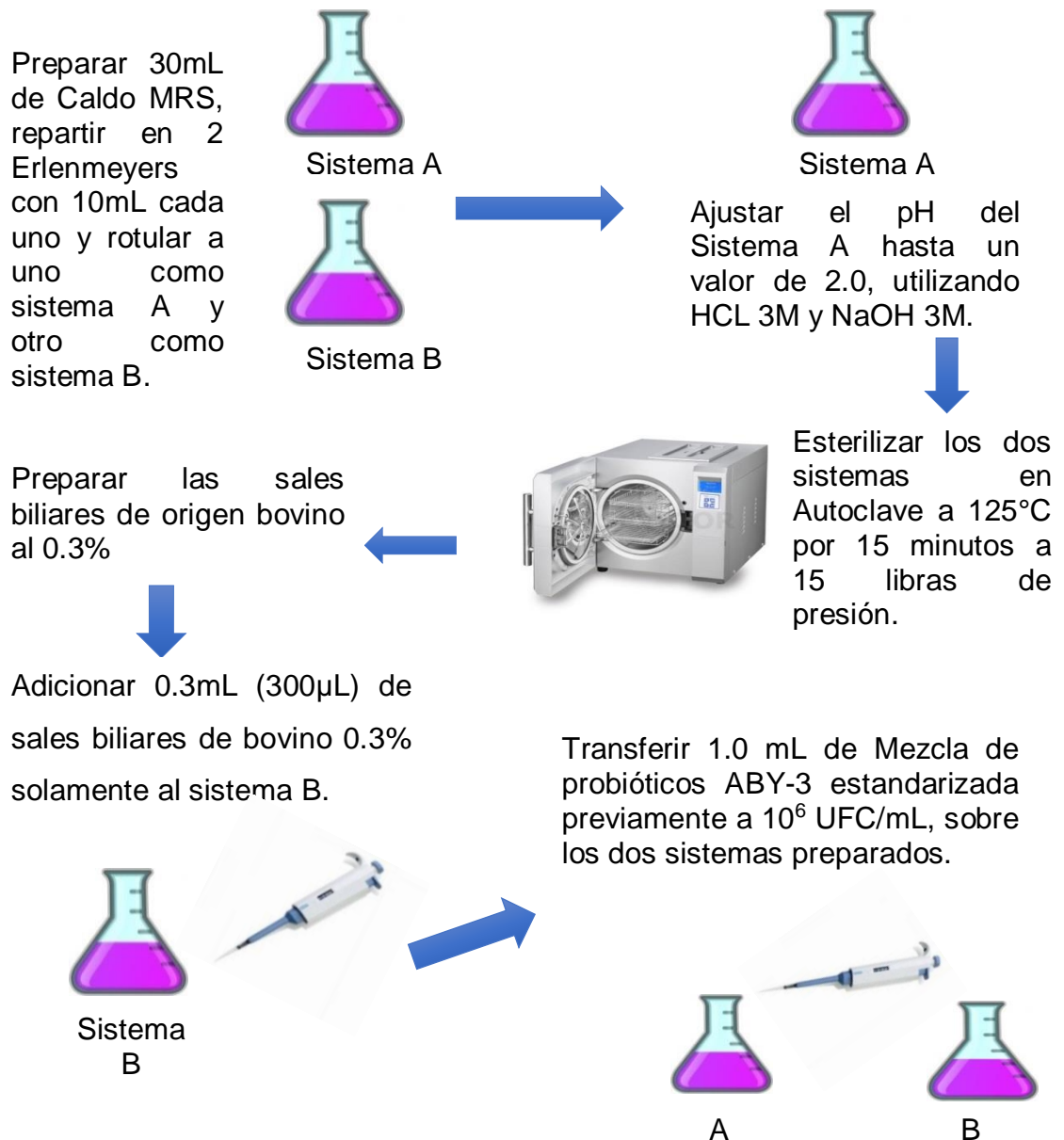


Figura N° 30. Evaluación de la tolerancia de la mezcla de probióticos ABY-3 a las sales biliares y al pH ácido del estómago.

Evaluación de la tolerancia de la mezcla de probióticos ABY-3 a las sales biliares y al pH ácido del estómago. (Continuación)

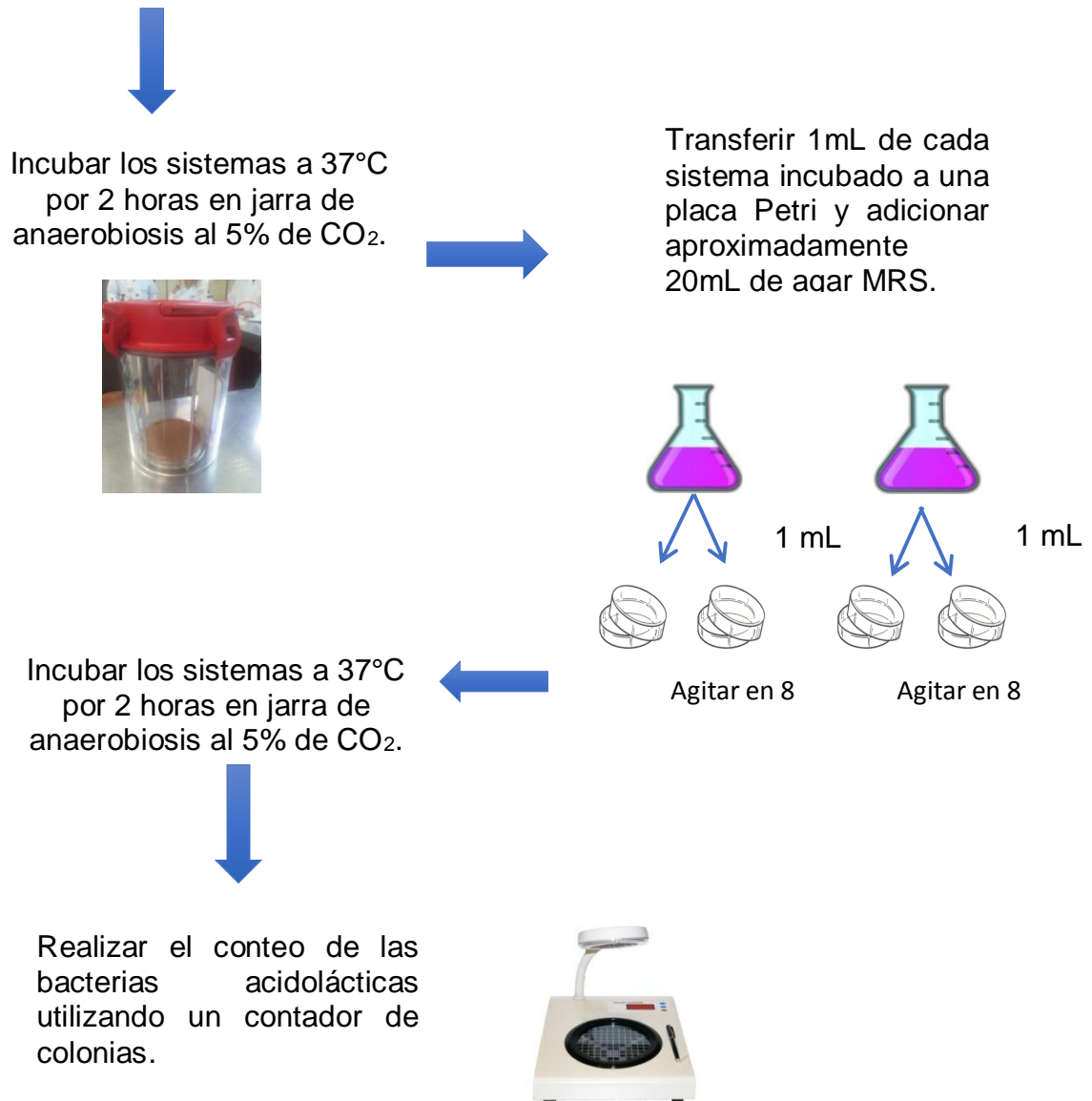



Figura N° 30. Continuación

ANEXO N° 13

FICHA TÉCNICA DE MEZCLA DE PROBIÓTICOS ABY-3

Anexo N° 13

Ficha Técnica de Mezcla de Probióticos ABY-3



FD-DVS ABY-3 - Probio-Tec™

Información de Producto

Descripción Cultivo láctico Termófilo
Cultivo mezcla de cepas definidas, que contiene *Lactobacillus acidophilus* LA-5™ y *Bifidobacterium* BB-12™, *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Las cepas probióticas en este cultivo tienen una larga historia de uso seguro.
ABY-3 es suministrado en forma de producto granulado liofilizado.

Aplicación El cultivo producirá una leche fermentada con alta viscosidad y aroma medio/suave y una baja post-acidificación. ABY-3 es ideal para la elaboración de los siguientes tipos de productos lácteos fermentados:

- Firme
- Batido
- Líquido

Envasado

Tamaño de envase	Número de producto
10 x 50u	669852
25 x 200u	666092
20 x 500u	666091

Disponibilidad: Los siguientes cultivos ABY están disponibles en forma de cultivos congelados DVS y liofilizados DVS:
ABY-1, ABY-2 y ABY-3.

Almacenamiento y caducidad: Los cultivos liofilizados deben ser almacenados a -18°C (0°F) o menos. Si los cultivos se almacenan a esta temperatura o inferior, la caducidad es de como mínimo 24 meses. Si los cultivos se almacenan a +5°C (41°F) la caducidad es de como mínimo 6 semanas.

Modo de empleo Sacar los cultivos del congelador justo antes de su utilización. **NO DESCONGELAR.** Limpiar la parte superior del sobre con cloro. Abrir el sobre y añadir los gránulos liofilizados directamente al producto pasteurizado mientras se agita lentamente. Agitar la mezcla durante 10-15 minutos hasta distribuir totalmente.

Nivel de inoculación de DVS	Cantidad de leche a inocular	
	1,000 l	5,000 l
500U/2500 l	200U	1000U
500U/5000 l	100U	500U

El beneficio máximo de una dosis de inoculación de 0.02%, sobre la velocidad de acidificación, se obtiene a una temperatura de acidificación de 43°C. Para obtener el recuento de células de BB-12 y LA-5 como se indica en el catálogo técnico Nu-trish , una dosis mínima de inoculación de 0.02% debe ser aplicada.

BSU/ABY-3/B-FD-PI/Marzo 2004/1:2

Figura N° 31. Ficha técnica de mezcla de probióticos ABY-3

Anexo N° 13

Ficha Técnica de Mezcla de Probióticos ABY-3. (Continuación)

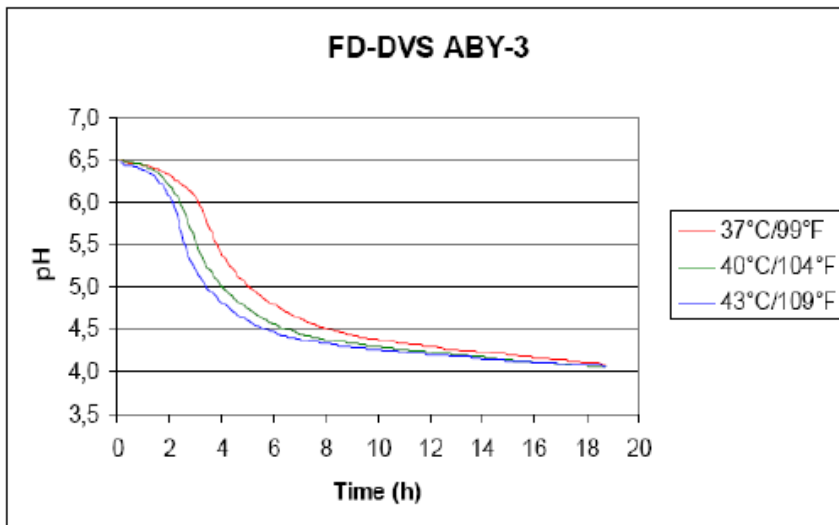
FD-DVS ABY-4 - Probio-Tec™
Product Information

CHR HANSEN

Certificado Kosher ABY-3 es un cultivo con aprobación Kosher (Círculo K D) para ser utilizado durante todo el año, excepto en Pascua Judía.

Información técnica

Figura 1. El efecto de la temperatura sobre la acidificación.



Condiciones de fermentación:
Leche entera + 2% leche desnatada en polvo (85 °C /30 minutos)
500u/2.500 l. inoculación.

Nota: La exactitud de estas gráficas es relativa y está sujeta a error experimental.

Servicio Técnico Las instalaciones de Chr. Hansen distribuidas por todo el mundo y el personal de nuestro centro de tecnología aplicada están a su disposición para proporcionarle ayuda e instrucciones.

Referencias

Referencias y métodos de análisis están disponibles bajo solicitud.

La información anteriormente mencionada se ofrece exclusivamente a título informativo. Chr. Hansen declina toda responsabilidad por las pérdidas o daños que pudieran derivarse de la aplicación en la práctica de la información facilitada.

BSu/FD-DVS ABY-3 vs1 Marzo 2004/2:2

Figura N° 31. Continuación.

Anexo N° 14

Medición de pH en el yogurt con mezcla ABY-3 y yogurt sin mezcla ABY-3 durante los días 0, 5, 8, 16, 30.

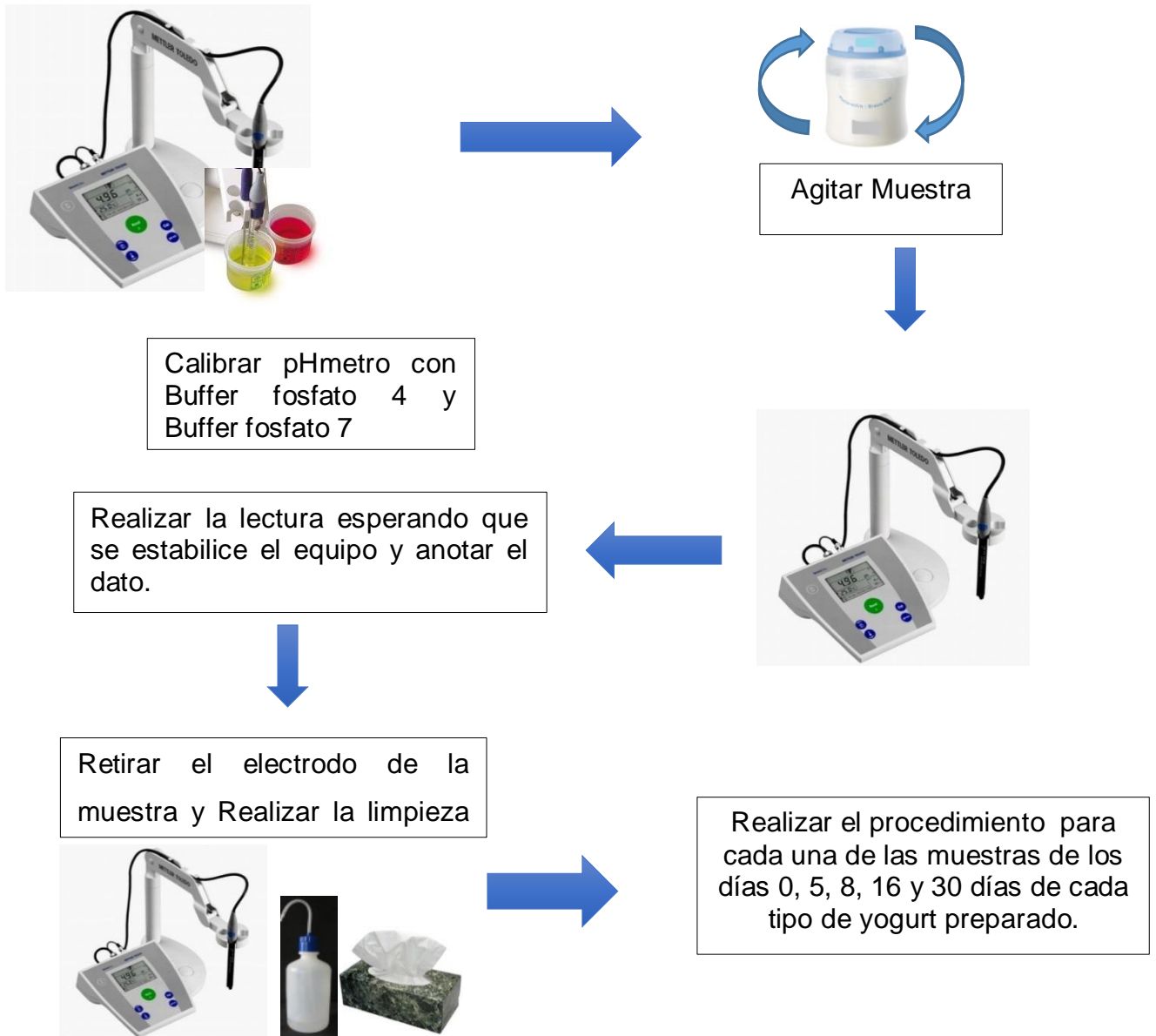


Figura No. 32. Medición de pH en el yogurt con mezcla ABY-3 y yogurt sin mezcla ABY-3 durante los días 0, 5, 8, 16 y 30.

Anexo N° 15

Valores críticos de F para los cuales el área bajo la curva a la derecha es igual a 0.05

1=Grados de libertad de numerador; 2= Grados de libertad del denominador

Table 10. Critical Values For The F Distribution

This table contains critical values F_{α, ν_1, ν_2} for the F distribution defined by $P(F \geq F_{\alpha, \nu_1, \nu_2}) = \alpha$.

$\alpha = .05$

ν_2	ν_1																
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	15	20	30	40	60	120	∞
1	161.45	199.50	215.71	224.58	230.16	233.99	236.77	238.88	240.54	241.88	245.95	248.01	250.10	251.14	252.20	253.25	254.25
2	18.51	19.00	19.16	19.25	19.30	19.33	19.35	19.37	19.38	19.40	19.43	19.45	19.46	19.47	19.48	19.49	19.50
3	10.13	9.55	9.28	9.12	9.01	8.94	8.89	8.85	8.81	8.79	8.70	8.66	8.62	8.59	8.57	8.55	8.53
4	7.71	6.94	6.59	6.39	6.26	6.16	6.09	6.04	6.00	5.96	5.86	5.80	5.75	5.72	5.69	5.66	5.63
5	6.61	5.79	5.41	5.19	5.05	4.95	4.88	4.82	4.77	4.74	4.62	4.56	4.50	4.46	4.43	4.40	4.37
6	5.99	5.14	4.76	4.53	4.39	4.28	4.21	4.15	4.10	4.06	3.94	3.87	3.81	3.77	3.74	3.70	3.67
7	5.59	4.74	4.35	4.12	3.97	3.87	3.79	3.73	3.68	3.64	3.51	3.44	3.38	3.34	3.30	3.27	3.23
8	5.32	4.46	4.07	3.84	3.69	3.58	3.50	3.44	3.39	3.35	3.22	3.15	3.08	3.04	3.01	2.97	2.93
9	5.12	4.26	3.86	3.63	3.48	3.37	3.29	3.23	3.18	3.14	3.01	2.94	2.86	2.83	2.79	2.75	2.71
10	4.96	4.10	3.71	3.48	3.33	3.22	3.14	3.07	3.02	2.98	2.85	2.77	2.70	2.66	2.62	2.58	2.54
11	4.84	3.98	3.59	3.36	3.20	3.09	3.01	2.95	2.90	2.85	2.72	2.65	2.57	2.53	2.49	2.45	2.41
12	4.75	3.89	3.49	3.26	3.11	3.00	2.91	2.85	2.80	2.75	2.62	2.54	2.47	2.43	2.38	2.34	2.30
13	4.67	3.81	3.41	3.18	3.03	2.92	2.83	2.77	2.71	2.67	2.53	2.46	2.38	2.34	2.30	2.25	2.21
14	4.60	3.74	3.34	3.11	2.96	2.85	2.76	2.70	2.65	2.60	2.46	2.39	2.31	2.27	2.22	2.18	2.13
15	4.54	3.68	3.29	3.06	2.90	2.79	2.71	2.64	2.59	2.54	2.40	2.33	2.25	2.20	2.16	2.11	2.07
16	4.49	3.63	3.24	3.01	2.85	2.74	2.66	2.59	2.54	2.49	2.35	2.28	2.19	2.15	2.11	2.06	2.01
17	4.45	3.59	3.20	2.96	2.81	2.70	2.61	2.55	2.49	2.45	2.31	2.23	2.15	2.10	2.06	2.01	1.96
18	4.41	3.55	3.16	2.93	2.77	2.66	2.58	2.51	2.46	2.41	2.27	2.19	2.11	2.06	2.02	1.97	1.92
19	4.38	3.52	3.13	2.90	2.74	2.63	2.54	2.48	2.42	2.38	2.23	2.16	2.07	2.03	1.98	1.93	1.88
20	4.35	3.49	3.10	2.87	2.71	2.60	2.51	2.45	2.39	2.35	2.20	2.12	2.04	1.99	1.95	1.90	1.85
21	4.32	3.47	3.07	2.84	2.68	2.57	2.49	2.42	2.37	2.32	2.18	2.10	2.01	1.96	1.92	1.87	1.82
22	4.30	3.44	3.05	2.82	2.66	2.55	2.46	2.40	2.34	2.30	2.15	2.07	1.98	1.94	1.89	1.84	1.79
23	4.28	3.42	3.03	2.80	2.64	2.53	2.44	2.37	2.32	2.27	2.13	2.05	1.96	1.91	1.86	1.81	1.76
24	4.26	3.40	3.01	2.78	2.62	2.51	2.42	2.36	2.30	2.25	2.11	2.03	1.94	1.89	1.84	1.79	1.74
25	4.24	3.39	2.99	2.76	2.60	2.49	2.40	2.34	2.28	2.24	2.09	2.01	1.92	1.87	1.82	1.77	1.71
30	4.17	3.32	2.92	2.69	2.53	2.42	2.33	2.27	2.21	2.16	2.01	1.93	1.84	1.79	1.74	1.68	1.63
40	4.08	3.23	2.84	2.61	2.45	2.34	2.25	2.18	2.12	2.08	1.92	1.84	1.74	1.69	1.64	1.58	1.51
50	4.03	3.18	2.79	2.56	2.40	2.29	2.20	2.13	2.07	2.03	1.87	1.78	1.69	1.63	1.58	1.51	1.44
60	4.00	3.15	2.76	2.53	2.37	2.25	2.17	2.10	2.04	1.99	1.84	1.75	1.65	1.59	1.53	1.47	1.39
120	3.92	3.07	2.68	2.45	2.29	2.18	2.09	2.02	1.96	1.91	1.75	1.66	1.55	1.50	1.43	1.35	1.26
∞	3.85	3.00	2.61	2.38	2.22	2.10	2.01	1.94	1.88	1.84	1.67	1.58	1.46	1.40	1.32	1.23	1.00

Anexo N° 16

Cálculos de concentración de probióticos en mezcla ABY-3

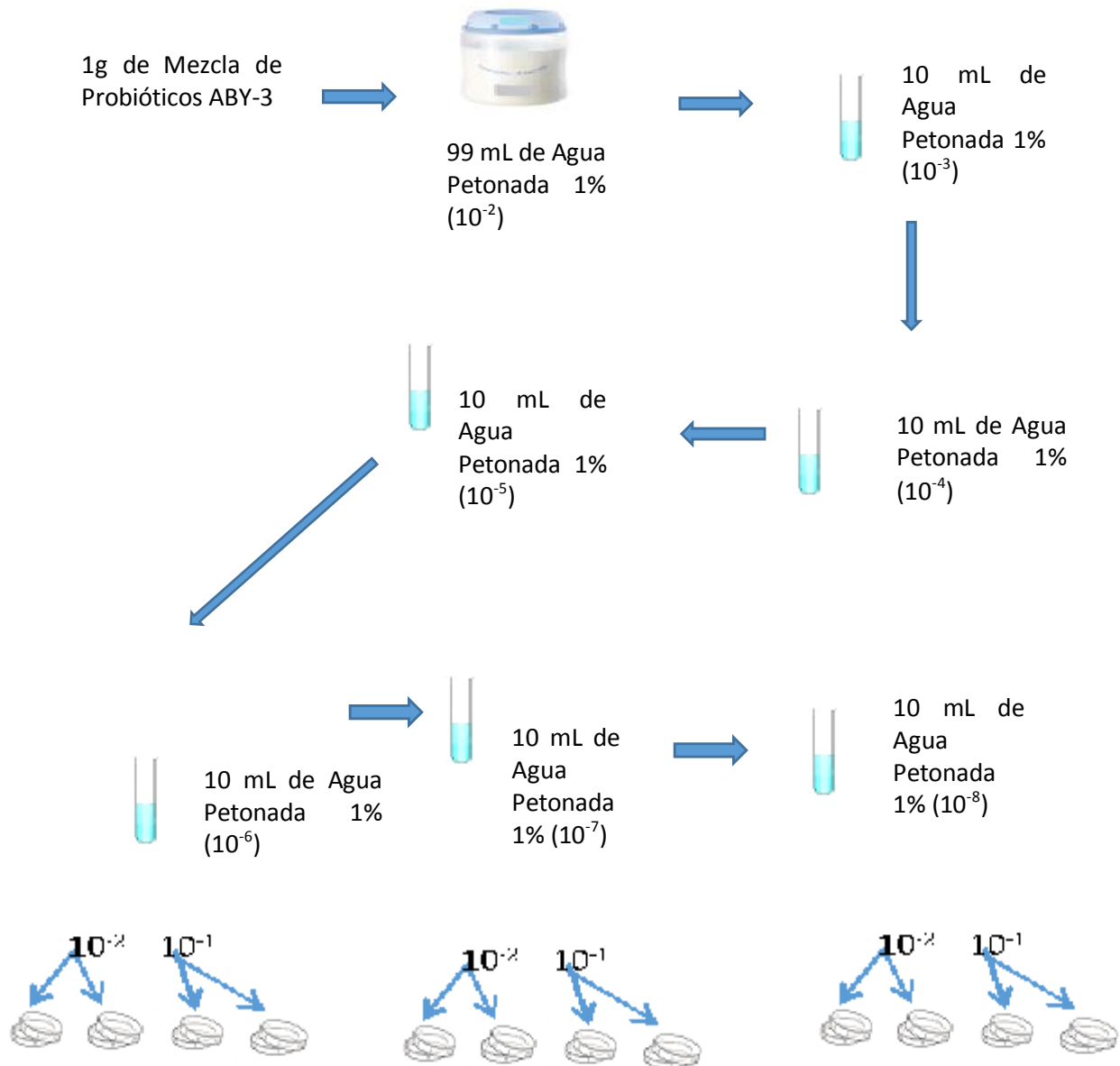
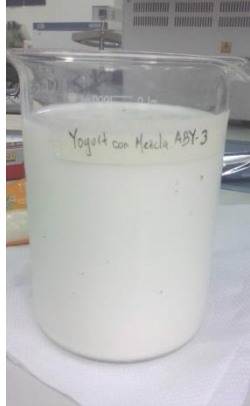


Figura No. 33 Cálculo de concentración de probióticos en mezcla ABY-3

ANEXO N° 17

Materiales y equipo utilizados para la elaboración de yogurt natural de leche de cabra.



- 2 litros de leche de cabra



- Gelatina en polvo



- Cultivo iniciador

- Baño María electrico y un termómetro

- Recipiente resistente al calor (de vidrio o de acero inoxidable)

- Refrigeradora

- Agitador de vidrio o cuchara grande resistente al calor.

- 100.0 gramos de azúcar

- Tapadera de acero inoxidable o papel aluminio

- Mezcla de probióticos ABY-3



- Incubadora

Figura N° 34. Materiales y equipo utilizados para la elaboración de yogurt natural de leche de cabra.