

BACTERIAS PROBIÓTICAS EN PRODUCTOS LÁCTEOS FERMENTADOS

Gabriel Vinderola

Instituto de Lactología Industrial (INLAIN, UNL-CONICET) Facultad de Ingeniería Química,
Universidad Nacional del Litoral, Santiago del Estero 2829, Santa Fe (S3000FKV), Argentina.
E-mail: gvinde@fiq.unl.edu.ar

Resumen

Las bacterias probióticas fueron definidas por la Organización Mundial de la Salud como microorganismos que, consumidos en adecuadas dosis, ejercen efectos benéficos sobre la salud del consumidor. La mayoría de estos microorganismos pertenecen a los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, son de origen intestinal (aislados de individuos sanos) y son incluidos en productos lácteos fermentados, principalmente yogures, para su llegada al consumidor. Su agregado a matrices alimenticias presenta numerosos desafíos tecnológicos, como lo son el mantenimiento de su viabilidad y funcionalidad a lo largo del proceso y conservación del alimento, como también el recuento selectivo o diferencial en medios de cultivo, lo que permite realizar el control de calidad del nivel de células viables, requisito fundamental para ejercer su actividad probiótica o benéfica para la salud. Desde mediados de los años 90, la Argentina, en sintonía con una tendencia mundial, se sumó al desarrollo comercial de leches fermentadas y, en menor medida, de quesos frescos conteniendo cultivos de *L. acidophilus*, *L. casei* y *Bifidobacterium*. Nuestro país fue además pionero (primer país de Latinoamérica en 1999) en el desarrollo comercial de quesos probióticos. El consumo regular de este tipo de alimentos permite mantener un nivel más saludable de vida, disminuyendo en cierto grado la incidencia, severidad y frecuencia de algunas patologías intestinales (diarreas, inflamación) o no intestinales (enfermedades respiratorias, alergias) o modulando de forma benéfica el tránsito intestinal o la actividad de la microbiota residente en el tracto gastrointestinal.

Palabras clave: probióticos; leches fermentadas; recuentos; alimentos funcionales; salud.

Abstract

Probiotic bacteria in fermented dairy products. Probiotic bacteria were defined by the World Health Organization as live microorganisms which when consumed in adequate amounts can confer a health benefit on the host. The majority of the strains regarded as probiotics belong to the genera *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*, have an intestinal origin (isolated from healthy individuals) and are incorporated in fermented dairy products, specially fermented milks such as yoghurts, to reach consumers. Their addition to food matrices implies numerous technological challenges, such as the maintenance of cell viability and functionality along food production and storage, as well as the selective or differential enumeration on culture media, which allows to perform the quality control of the levels of viable cells, a fundamental requisite to exert the probiotic activity. Since mid-90's, Argentina, following an international trend, developed commercial fermented milks, and to a lesser extent fresh cheeses, containing probiotic strains of

L. acidophilus, *L. casei* and *Bifidobacterium*. Our country was also a pioneer (first in Latin-American in 1999) in the development of a commercial probiotic cheese. The regular intake of this kind of foods allow to maintain a healthier status of life, diminishing to a certain extent the incidence, severity and frequency of some intestinal (diarrhoea, inflammation) or non-intestinal pathologies (respiratory diseases, allergies) or modulating in a positive way the intestinal transit or the activity of the intestinal microbiota.

Key words: probiotics; fermented milks; enumeration; functional foods; health.

Introducción a probióticos: definición y microorganismos usados

Se considera que la microbiota intestinal constituye aproximadamente el 95% del total de las células del cuerpo. Poseemos 10 veces más células procariotas en el intestino que células eucariotas en todo nuestro organismo. Se estima que la población total bacteriana residente en el tracto intestinal llega a 10¹¹-10¹² células/g de contenido intestinal. La microbiota intestinal posee una intensa actividad metabólica para contrarrestar su eliminación a diario en la material fecal. El intestino del bebé es estéril al momento del nacimiento; la composición de la microbiota es relativamente sencilla en neonatos y se hace gradualmente más compleja hacia la adultez. Se considera que esta microbiota se adquiere de diversas fuentes a partir de la madre (vagina, piel y leche materna) y del ambiente. Respecto a las especies y cepas, existe un gran nivel de variabilidad entre individuos, incluso entre aquellos que pertenecen a una misma población y que poseen hábitos alimentarios similares, dependiendo fuertemente de la edad, la dieta, el estatus inmunológico, la exposición a factores de estrés, tratamientos médicos (antibióticos, rayos) y de otros factores aún no totalmente dilucidados. En realidad, el intestino es un órgano de defensa del huésped aún no explorado en su totalidad [1]. Los principales géneros y especies que se encuentran en la microbiota intestinal incluyen *Bacteroides*, *Eubacterium*, *Ruminococcus*, *Clostridium* y *Bifidobacterium*, y, como subdominantes, *Escherichia coli*, *Veilonella*, *Staphylococcus*, *Proteus*, *Streptococcus*, y *Lactobacillus* [2].

La actividad metabólica de la microbiota intestinal es muy intensa, depende en gran medida del consumo de fibras y es esencial para el mantenimiento de la salud intestinal. Por ejemplo, la síntesis de ácidos grasos de cadena corta que actúan como fuente de carbono para los colonocitos, la síntesis de vitaminas y la activación o inactivación de compuestos bioactivos (inhibición o disminución de la actividad de enzimas procarcinogénicas) son funciones de la microbiota intestinal. Su establecimiento y metabolismo son cruciales para el desarrollo anatómico y funcional del sistema inmunológico asociado a la mucosa intestinal [3] y tiene numerosas implicancias en la salud y en la enfermedad, tanto a nivel intestinal como sistémico [4]. En general, es posible categorizar a los componentes de la microbiota intestinal en base a que si ejercen efectos potencialmente patogénicos, efectos exclusivamente benéficos o una mezcla de ambos [5]. Los géneros *Bifidobacterium* y *Lactobacillus*, comúnmente encontrados como parte de la microbiota intestinal de individuos sanos, tienen una larga tradición de ser considerados promotores de la salud y es por esto que son los principales géneros a partir de los cuales se han aislado microorganismos probióticos o benéficos para la salud.

El término “Probiótico” fue introducido por primera vez por el Dr. Roy Fuller, en 1989, al referirse a un *suplemento alimenticio microbiano vivo el cual afecta benéficamente al huésped al mejorar su balance microbiano intestinal* [6]. Sin embargo, y luego de varias definiciones alternativas propuestas por diferentes autores, parecería existir un consenso

científico internacional tendiente a adoptar globalmente la definición propuesta por un grupo de trabajo reunido *ad hoc* en nuestro país en Octubre de 2001 por la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura y la Organización Mundial de la Salud (FAO/WHO, por sus siglas en inglés) que estableció que los probióticos son “microorganismos vivos que cuando son administrados en dosis adecuadas ejercen un efecto benéfico en la salud del consumidor” [7]. Esta comisión conjunta elaboró también una serie de lineamientos generales para caracterizar microorganismos probióticos.

Lactobacillus casei, *L. paracasei*, *L. rhamnosus*, *L. acidophilus*, *L. gasseri*, *L. johnsonii*, *L. plantarum*, *L. reuteri*, *L. crispatus*, *L. fermentum*, *Bifidobacterium bifidum*, *B. adolescentis*, *B. animalis* subsp. *lactis*, *B. breve*, *B. infantis*, *B. longum*, *Saccharomyces boulardii* y *S. cerevisiae* son algunas de las especies a partir de las cuales se aislaron cepas con características probióticas. El uso de enterococos (*E. faecium*) como probióticos para humanos está aún en debate debido a su participación en ciertas patologías o a la posibilidad de que sea un vector intestinal de transmisión de genes de resistencia a antibióticos [8, 9, 10]. La definición de probióticos implica que el término sea empleado exclusivamente a microorganismos vivos que hayan demostrado un efecto benéfico en estudios *in vivo*, sin tenerse en cuenta muchas veces su capacidad de resistir el tránsito gastrointestinal. Sin embargo, especies o cepas que no son capaces de sobrevivir a la barrera gástrica, tales como *Streptococcus thermophilus*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* or *Lactococcus lactis* también podrían ser consideradas probióticas [11, 12]. Es importante establecer que ninguna cepa nueva que se aisle y que resulte pertenecer a alguna de las especies listadas anteriormente debería ser considerada probiótica hasta que no se hagan los estudios correspondientes: estudios en animales y estudios en humanos, al azar, a doble ciego y con control de placebos.

El hecho de que *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* sean integrantes normales de la microbiota intestinal humana, que algunas cepas demuestren una adecuada tolerancia a las barreras gastrointestinales y que solo se hayan descritos efectos benéficos hacia la salud relacionados a su consumo, hace que ambos géneros sean ideales para el aislamiento, caracterización y desarrollo de nuevos cultivos probióticos. En este sentido, la estrategia a seguir sería la de reforzar a la microbiota intestinal con constituyentes naturales de la misma, al menos mediante una colonización externa y transitoria, ya que hasta el momento no se ha demostrado la factibilidad de implantar en el ámbito intestinal una cepa probiótica de forma permanente una vez interrumpida su administración oral. Además de la microbiota intestinal humana, se pueden aislar cepas de interés, principalmente del género *Lactobacillus*, ya que las bifidobacterias son microorganismos anaeróbicos estrictos, a partir de la microbiota intestinal de otras especies y a partir de alimentos fermentados o no tales como leches fermentadas tradicionales, quesos artesanales, embutidos, frutas o alimentos con base cereal fermentados [13]. Se podría pensar que los aislamientos de probióticos realizados a partir del ambiente intestinal de un individuo podrían colonizar y funcionar mejor en individuos de la misma especie, lo que se conoce como criterio de especificidad de especies. Sin embargo, existen algunas dudas respecto a la validez de este criterio una vez que el microorganismo fue aislado de su ambiente primario y propagado en medios de cultivos sintéticos en laboratorios, en medios de cultivo industriales y colocado finalmente en matrices alimentarias. Por ejemplo, en relación a la capacidad de colonización de la misma especie de la que fue aislado, se demostró que la administración oral de *Lactobacillus* GG a neonatos en los primeros seis semanas de vida, período donde la mucosa intestinal no está aun completamente colonizada, no fue capaz de lograr una colonización permanente una vez finalizada la administración oral de la cepa [14]. Por otro lado, se determinó que el cultivo sucesivo en medios de laboratorio de una cepa de *Bifidobacterium* indujo la pérdida de material genético correspondiente a la expresión de características que tenían que ver exclusivamente con la sobrevivencia en el ambiente intestinal de la cepa [15]. Respecto a las cepas de origen intestinal, la desventaja

podría radicar en su posible baja capacidad de tolerar las condiciones adversas de los alimentos (acidez, oxígeno disuelto, metabolitos derivados de la fermentación láctica, compuestos químicos alimenticios, etc). Sin embargo, se ha demostrado que muchas cepas probióticas de origen intestinal pueden tener una performance tan adecuada como las que fueron aisladas de alimentos fermentados [16], tolerando los compuestos químicos utilizados en la formulación de productos lácteos fermentados [17]. Lo mismo se podría plantear para cepas probióticas aisladas de alimentos fermentados: podrían estar naturalmente adaptadas a sobrevivir en las condiciones del alimento, pero su performance a nivel intestinal podría generar dudas. Haller y col. [18] determinaron que propiedades metabólicas como funcionales de interés pueden encontrarse tanto en lactobacilos de origen intestinal como también en ciertas cepas de origen alimentario. Dogi y Perdígón [19] determinaron que tanto cepas comensales como no comensales de *L. fermentum* y *L. acidophilus* fueron capaces de activar la respuesta inmune de mucosa en ratones. En conclusión, se podría decir que propiedades tecnológicas como funcionales de relevancia pueden encontrarse tanto en cepas de origen intestinal como en aquellas aisladas de alimentos, por lo que la capacidad probiótica es aún una propiedad fuertemente dependiente de la cepa y no tanto de su origen.

Efectos benéficos hacia la salud de bacterias probióticas y de leches fermentadas conteniendo bacterias probióticas

En rasgos generales, algunos de los efectos benéficos relacionados al consumo de bacterias probióticas y de los productos lácteos fermentados que las contienen son la modulación benéfica de la actividad de la microbiota intestinal mediante la reducción de actividades mutagénicas y procarcinogénicas, disminución de los síntomas de intolerancia a la lactosa, mejora de la inmunidad de mucosas, mejora del tránsito intestinal, disminución de los niveles de colesterol, prevención o reducción de la duración de ciertas diarreas, prevención o modulación de ciertos tipos de cánceres intestinales y enfermedad inflamatoria intestinal, prevención de la incidencia de *Helicobacter pylori* y patógenos intestinales y prevención de alergias, entre otros. Una discusión detallada de los efectos benéficos de cada cepa y de sus mecanismos está mucho más allá del alcance de este artículo. Sin embargo, el lector interesado puede encontrar un análisis más detallado de estos aspectos en artículos de revisión [20, 21, 22, 23, 24, 25, 26] o libros al respecto [13, 27, 28, 29]. Es importante destacar que es poco probable que una misma cepa probiótica pueda cumplir los numerosos efectos benéficos atribuidos a los probióticos en general, por lo tanto un efecto particular debe ser asociado a una cepa específica y se debe informar la dosis y el alimento en el cual debe incluirse para lograr el efecto estudiado. Para tener una idea general de la efectividad de los probióticos y de los alimentos que incluyen bacterias probióticas es aconsejable leer el trabajo de revisión publicado por Montrose y Floch en el año 2005 [30]. En este trabajo se revisaron las conclusiones de 288 estudios clínicos en humanos llevados a cabo entre 1980 y 2004, donde se administraron bacterias probióticas y donde se abordaron prácticamente todos los aspectos benéficos relacionados al consumo de bacterias probióticas. En las conclusiones de este trabajo se determina que en 239 de los 288 trabajos evaluados, los efectos sobre la salud resultaron ser positivos, mientras que en los 49 restantes no se observaron diferencias respecto a los grupos controles.

Debido a que los probióticos son administrados en forma oral y que al primer órgano con respuesta al que llegan es el sistema inmune asociado a la mucosa intestinal, los mecanismos de acción tienen que ver con su capacidad de modular el sistema inmunológico, cuya regulación dependerá de la cepa, el alimento usado como vehículo y sus componentes bioactivos (péptidos, exopolisacáridos, otros microorganismos presentes), la dosis y el período durante la cual es administrada y la forma de administración (continua o cíclica, es decir,

alternando períodos de administración y descanso). Por ejemplo, de Moreno de LeBlanc y col. [31] demostraron que la administración continua (durante 98 días), a ratones, de una leche fermentada conteniendo una cepa probiótica indujo un pico en la producción de IgA (parámetro funcional de interés al administrar un probiótico) en intestino delgado luego de un corto período de administración (7 días). Luego de este pico, la respuesta de interés sufrió un proceso de homeostasis, volviendo a los niveles observados en el grupo control. Esto podría sugerir la importancia de evaluar períodos alternados de administración y descanso para mantener, en el tiempo, una respuesta activada promedio mayor a la del grupo control en los individuos que reciben el alimento probiótico y mantener así una respuesta inmune más elevada que sea capaz de prevenir o ejercer un efecto terapéutico ante ciertas patologías intestinales.

¿Por qué agregar bacterias probióticas a yogures y leches fermentadas?

La asociación entre el hombre y los efectos benéficos hacia la salud intestinal del consumo de leches fermentadas conteniendo bacterias lácticas se remonta a miles de años atrás y existen registros en pinturas rupestres del consumo de productos lácteos fermentados. Las principales áreas geográficas asociadas al uso milenario de leches fermentadas incluyen el norte, noreste y sudeste europeo incluyendo también el Cáucaso, Asia, India y la Unión Soviética [32]. Entre los microorganismos naturalmente presentes en los alimentos fermentados de estas regiones encontramos *S. thermophilus*, *Lactococcus*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. helveticus*, *L. acidophilus*, *L. kefir*, *L. kefiranofaciens* y cepas del grupo *L. casei*.

No hay registros precisos en relación al origen del yogur. Se cree que los antiguos pueblos turcos en Asia, donde vivían como nómades, fueron los primeros en elaborar una leche agria o acidificada por acción de bacterias lácticas. De forma más contemporánea, una de las primeras elaboraciones industriales de yogur en Europa fue realizada por Danone en Madrid en 1922 [33]. Los microorganismos involucrados en la elaboración comercial de yogur han sido históricamente *S. thermophilus* y *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Luego de la Segunda Guerra mundial, se incrementó rápidamente la tecnología para la producción de yogur, su consumo y el conocimiento acerca de sus propiedades benéficas hacia la salud [34]. Sin embargo, el uso e incorporación masiva de cepas de bacterias probióticas de los géneros *Lactobacillus* (*L. casei* y *L. acidophilus* principalmente) y *Bifidobacterium*, y el desarrollo de la gran cantidad de leches fermentadas y, en menor medida, quesos, conteniendo estos microorganismos es un fenómeno mucho más reciente que data de principios de la década del 80 [35], con la sola excepción tal vez del mundialmente conocido Yakult, desarrollado ya comercialmente en Japón en los años 50.

El yogur es reconocido como un alimento con numerosos efectos benéficos hacia la salud [21], principalmente a nivel de la salud intestinal. ¿Cuáles son entonces los factores que justifican la adición de bacterias probióticas a una matriz que de por sí presenta efectos benéficos?

Los microorganismos utilizados para la producción de yogur, *S. thermophilus* y *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, no son de origen intestinal y por lo tanto difícilmente sobreviven las condiciones extremas encontradas durante el tránsito gastrointestinal [11]. Sin embargo, *Lactobacillus* y bifidobacterias utilizados como probióticos muchas veces han sido parte de la microbiota intestinal de individuos sanos y ejercen solamente efectos benéficos hacia el consumidor [36]. Muchas de estas cepas son capaces de tolerar el bajo pH del estómago y los compuestos inhibitorios encontrados a lo largo del tracto gastrointestinal (sales biliares,

lisozima, lactoferrina, defensinas) [37, 38]. Esta propiedad les conferiría probablemente la capacidad de ejercer actividad metabólica benéfica durante el tránsito, como por ejemplo la deconjugación de sales biliares [39] y además interactuar con las células inmunes presentes en el tracto intestinal [40], desencadenando así una respuesta inmune benéfica. Finalmente, son numerosos los estudios que demuestran la importancia de la viabilidad celular para lograr o potenciar numerosos efectos benéficos a nivel intestinal [41, 42].

Como parte del debate sobre si las bacterias lácticas starters o acidificantes deberían ser consideradas probióticas [23], muchos autores consideran que claramente cumplen con los requisitos para ser consideradas como tal [12]. Es por lo tanto justo reconocer que los yogures tradicionales conteniendo exclusivamente cultivos de *S. thermophilus* y *L. delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* ejercen efectos benéficos promotores de la salud [12, 21] debido al contenido de lactasa (liberada por las bacterias lácticas sensibles a la acción detergente de las sales biliares, por ejemplo), de péptidos bioactivos liberados a partir de las proteínas lácteas [43], la producción de exopolisacáridos solubles [44] o de compuestos antimicrobianos [45] y también efectos relacionados a restos de paredes celulares provenientes de células que no resisten las barreras gastrointestinales (acidez gástrica, sales biliares, lisozima) pero que aun así tienen propiedades inmunomodulatorias [46, 47]. No obstante, la presencia de bacterias probióticas con capacidad de sobrevivir la digestión gastrointestinal y llegar viables al intestino asegura o aumenta la intensidad de muchos otros efectos benéficos que tienen que ver con la integridad y viabilidad de células microbianas capaces de interactuar con las células inmunes asociadas al intestino.

Recuento de bacterias probióticas en productos lácteos fermentados: desafíos, dificultades y logros

La enumeración de bacterias probióticas en alimentos es un desafío en el laboratorio de microbiología por numerosas razones. La gran proximidad evolutiva entre las bacterias probióticas y los cultivos starters o acidificantes empleados en la elaboración del producto fermentado es uno de los mayores obstáculos al tratar de diferenciar colonias de unos y otros en las placas de medios de cultivo. Sin embargo, el esfuerzo sostenido llevado a cabo en las últimas dos décadas ha dado como resultado la formulación de numerosos medios de cultivos selectivos y/o diferenciales para tal fin. No obstante, no todos son adecuados para ser utilizados con la gran variedad de cepas probióticas y de cultivos starters disponibles y en la gran diversidad de alimentos utilizados como vehículos para probióticos, por lo tanto, la elección de un medio de cultivo o una combinación de ellos, es siempre una tarea particular y que se debe ajustar a las cepas y alimentos en estudio, sin poder hacer generalizaciones.

El control del nivel de células viables de un probiótico en un cultivo puro o en el producto final permite (i) verificar el nivel de células viables en los cultivos comerciales congelados o liofilizados utilizados para inoculación directa, (ii) monitorear el nivel de células viables a lo largo del proceso de producción del alimento utilizado como vehículo y a lo largo de la vida de estante del mismo y (iii) controlar la dosis administrada para lograr el efecto benéfico asociado a la cepa en particular.

Cuando se formula o se adopta un medio de cultivo para el recuento selectivo y/o diferencial de un probiótico, deben tenerse en cuenta algunos aspectos:

- Las bacterias probióticas (cepas de *L. casei*, *L. acidophilus*, bifidobacterias, etc.) están nutricional y microbiológicamente muy relacionadas a los cultivos starters o

acidificantes (*S. thermophilus*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. lactis*), por lo tanto es difícil favorecer el crecimiento de unos tratando de inhibir el desarrollo de los otros.

- Los probióticos son utilizados como cultivos adjuntos (prácticamente no desarrollan durante la fermentación láctica junto a los cultivos starters), por lo tanto son agregados a la concentración final esperada en el producto (107-108 UFC/ml) mientras que las bacterias lácticas del starter, luego de la acidificación de la leche o de la maduración del queso, pueden llegar a niveles superiores: entre 108-109 UFC/ml. Si el desarrollo del starter sobre el medio de cultivo no es adecuadamente inhibido, puede cubrir las placas de Petri impidiendo la visualización de las colonias de las bacterias probióticas.

- Las bacterias probióticas no constituyen un grupo taxonómico o microbiológico homogéneo. Por lo tanto, es muy difícil formular un único medio de cultivo adecuado para todas las especies y cepas utilizadas como probióticos y que a la vez sea capaz de inhibir a la gran variedad de cultivos iniciadores utilizados para la fermentación de alimentos.

- La enumeración de bacterias probióticas es más dificultosa en aquellas matrices alimentarias en la cual más de un probiótico ha sido incorporado, especialmente si pertenecen al mismo género (*L. acidophilus* y *L. casei*, por ejemplo), siendo prácticamente imposible diferenciar en un medio de cultivo colonias de cepas de una misma especie, lo cual debe tenerse en cuenta al momento de querer diseñar alimentos conteniendo múltiples probióticos. Lo mismo sucede con el género *Bifidobacterium*, cuyas especies forman colonias muy similares entre sí [48].

Un medio de cultivo adecuado para el control de bacterias probióticas debería ser capaz de inhibir el desarrollo de la microflora láctica acompañante, o al menos ofrecer un desarrollo diferencial. A su vez, la tasa de recuperación de células viables debe ser lo más cercana posible al 100%, para no subestimar el nivel de células y debe tener capacidad selectiva o diferencial si existe más de un probiótico a enumerar. Finalmente, para que pueda ser empleado en el control de calidad de rutina en plantas lácteas, debe ser fácil de preparar, estable y de costo razonable.

Hacia la época en que se comenzaban a agregar probióticos a leches fermentadas, el foco de la investigación se puso en el recuento de cepas de *L. acidophilus* y bifidobacterias, las cuáles fueron las primeras en ser empleadas a nivel comercial. Sin embargo, y luego de algunos problemas de viabilidad relacionados al empleo industrial de estos microorganismos, comenzó a surgir una tendencia hacia el uso de cepas del grupo *L. casei* [49]. Por ejemplo, actualmente en nuestro país la tres leches fermentadas probióticas con mayor difusión comercial (Actimel, Yakult y Leche SanCor Bio) poseen cepas del grupo *L. casei* como probiótico. Por lo tanto, los medios originalmente diseñados para el recuento de *L. acidophilus* y bifidobacteria fueron testeados en relación a su capacidad para realizar el recuento de *L. casei*, o alternativamente, se desarrollaron medios específicos para cepas del grupo *L. casei* [50, 51, 52]. La gran variedad de medios de cultivo base y agentes selectivos y diferenciales utilizados (antibióticos, sales, azúcares, agentes cromógenos, etc) permiten tener una idea sobre la complejidad de esta tarea. Es muy probable que para cada combinación de probiótico/starter en un alimento en particular, se deba realizar una adecuada búsqueda de medios de cultivo para asegurar un correcto recuento de células viables.

No existen hasta el momento protocolos oficiales ni métodos estándares validados para el control de viabilidad de probióticos en alimentos. En 1990, la Federación Internacional de Lechería (International Dairy Federation, FIL-IDF) publicó un boletín [53] donde proponía medios de cultivo para la detección y recuento de bifidobacterias en heces y en productos

lácteos fermentados. En este boletín se propusieron cuatro medios de cultivo para la detección de bifidobacterias en heces y catorce medios de cultivo para el recuento en leches fermentadas y en otros alimentos. En 1995, se publicó otro boletín [54] donde se proponían dieciséis medios de cultivo para el recuento de *L. acidophilus*, combinado con bacterias lácticas iniciadoras y/o bifidobacterias. Hasta el momento, esta organización no ha publicado boletines sobre el recuento de cepas del grupo *L. casei* (*L. casei*, *L. paracasei*, *L. rhamnosus*), probablemente el grupo más utilizado hoy en día en leches fermentadas comerciales alrededor del mundo.

Los esfuerzos realizados por la FIL y la ISO (International Organization for Standardization) para diseñar un método único y confiable para el recuento de *L. acidophilus* en productos lácteos derivó en la publicación en 2006 de una técnica para el recuento presuntivo en un medio selectivo [55]. Esta técnica implica el uso de los antibióticos clindamicina y ciproflaxina, ambos capaces de inhibir el desarrollo de la mayoría de las cepas de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. delbrueckii* subsp. *lactis*, *S. thermophilus*, bifidobacterias, lactococos, *L. casei*, *L. paracasei*, *L. rhamnosus*, *L. reuteri* y *Leuconostoc*. Sin embargo, se advierte que este método no es capaz de distinguir entre *L. acidophilus*, *L. johnsonii*, *L. gasseri* y *L. crispatus*, que son cuatro especies altamente relacionadas del grupo *L. acidophilus* [56]. La metodología advierte además que debido a la gran variedad de productos lácteos existentes el método podría no ser apropiado para ciertos productos en particular. Otra limitación es que la técnica no es adecuada en el caso de que *L. acidophilus* estuviera en concentraciones menores que otros lactobacilos tales como *L. rhamnosus*, *L. reuteri*, *L. plantarum*, *L. helveticus* o levaduras [55].

Con el objetivo de desarrollar un método para el recuento selectivo de bifidobacterias en productos lácteos, la FIL lanzó en 2003 un ensayo a nivel mundial que incluyó veinte laboratorios de Europa, Japón y Nueva Zelanda [47]. Cada uno de estos laboratorios recibió siete muestras ciegas de productos lácteos conteniendo bifidobacterias, como cultivos puros o en combinación con *L. acidophilus*, *L. gasseri*, *S. thermophilus* y *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Los laboratorios emplearon un medio de cultivo conteniendo el antibiótico mupirocina (MUP) y el sustrato TOS (oligosacárido transgalactosilado) para la enumeración selectiva de bifidobacterias. Los resultados de este estudio demostraron que el empleo del antibiótico no interfirió con el crecimiento de las bifidobacterias y que a su vez fue capaz de inhibir el desarrollo de las bacterias lácticas acompañantes. Además, el empleo del medio conteniendo TOS-MUP resultó en un desarrollo de las bifidobacterias más rápido y con colonias de mayor tamaño [57]. En base a estos resultados, es esperable que en el futuro sea publicada por la FIL-ISO una técnica para el recuento presuntivo de bifidobacterias en productos lácteos en presencia de bacterias lácticas.

Hasta el momento, todos los medios de cultivos propuestos para el recuento de bacterias probióticas tienen limitaciones y tienen alcance para las cepas y condiciones ensayadas, con poca posibilidad de ser generalizados a otras cepas y productos sin hacer ensayos confirmatorios. Por lo tanto, al diseñar un alimento nuevo conteniendo bacterias probióticas, es aconsejable determinar primero la respuesta de cada probiótico como cultivo puro (crecimiento, tasa de recuperación respecto a un medio sin agentes selectivos o diferenciales y un registro de la morfología de las colonias para el reconocimiento posterior al estar mezclado con otros cultivos) en cada uno de los medios de cultivo en estudio. Con este fin, en el Instituto de Lactología Industrial (INLAIN, UNL-CONICET) realizamos un estudio exploratorio de catorce medios de cultivos, diferenciales o selectivos, incubados bajo tres condiciones de incubación diferentes [52,58]. De este estudio, se identificaron dos medios de cultivo adecuados para el recuento de *L. acidophilus*, *L. paracasei* y *Bifidobacterium* en presencia de *S. thermophilus* y *L. lactis* en el Bioqueso Ilolay Vita, primer queso probiótico

comercial de Latinoamérica [59], además de ser útil también para el recuento de bacterias probióticas en leches fermentadas.

Actualmente, todos los procedimientos de rutina para el control de la viabilidad celular de bacterias probióticas en leches fermentadas se basan exclusivamente en recuentos en medios de cultivo agarizados. Estas metodologías demandan mucho tiempo, son tediosas y susceptibles a recuentos que subestimen la población celular por la autoagregación de cepas [60] o debido a errores metodológicos en los que frecuentemente se incurre y que han sido revisados recientemente [61]. Es importante tener en cuenta que el estrés al que están sometidos estos microorganismos durante la vida de estante podría hacer que células subletalmente dañadas no desarrollen en forma adecuada en medios agarizados, o desarrollen en muchos casos como colonias de diferentes tamaños, según el grado de daño subletal, lo que hace el recuento aún más confuso. Afortunadamente, nuevas técnicas tales como el uso de PCR cuantitativa en tiempo real, citometría de flujo e hibridación *in situ* están siendo desarrolladas con este fin, aunque su aplicación masiva para el control de rutina en industrias u organismos gubernamentales de control sea mas difícil de implementar por el costo de los equipamientos necesarios y la necesidad de disponer de recurso humano altamente especializado para su implementación y manipulación.

Probióticos en productos lácteos

Yogures y leches fermentadas

Las bacterias probióticas tienen una larga historia asociada a productos lácteos como principal vehículo alimenticio. Son numerosas las razones que hicieron que las leches fermentadas, como el yogur, hayan sido uno de los primeros, y más exitosos comercialmente, vehículos de bacterias probióticas. Por un lado muchos probióticos comparten nichos ecológicos con las bacterias lácticas empleadas como starters y por lo tanto se considera generalmente que “bacterias cercanas podrían funcionar bien en una misma matriz alimentaria”, aunque, como se discutirá luego, no todas las combinaciones de bacterias lácticas y probióticas son exitosas. Además, el yogur ha sido considerado siempre un alimento saludable. Otro factor no menos importante para garantizar la continuidad del consumo es que el yogur es un alimento incorporado en la dieta de la población y que es consumido con periodicidad. Otros factores que han marcado su éxito comercial es la variedad de sabores disponibles y lo atractivo de su packaging, su relativamente bajo costo al constituir un alimento en sí mismo y su practicidad para transportarse, almacenarse y consumirse.

Para la elaboración de yogures conteniendo bacterias probióticas se pueden utilizar los procedimientos industriales ya establecidos para la elaboración de yogur tradicional, siendo los probióticos agregados antes de la fermentación (junto a las bacterias acidificantes) o después de la misma. En el primer caso, la ventaja es que operativamente son menos pasos, pero la desventaja es que la cepa probiótica estará expuesta a temperaturas no óptimas durante la fermentación y expuesta a la acidez láctica generada por las bacterias lácticas, lo que podría impactar negativamente en la viabilidad del probiótico [62]. En el caso del agregado del probiótico luego de la fermentación, esto se puede aplicar a yogures batidos (en el caso de yogures set o firmes el probiótico debe agregarse antes de la fermentación) y la desventaja podría ser la sensibilidad al oxígeno incorporado durante el batido, principalmente si se emplean bifidobacterias [62]. Hay numerosos estudios sobre el agregado de probióticos a leches fermentadas y su adecuada viabilidad durante la vida de estante [49, 63, 64, 65]. Sin embargo, tan pronto como estos desarrollos comenzaron a aparecer, otros estudios advirtieron sobre pérdidas de viabilidad celular en forma cepa y productodependiente [66, 67, 68], principalmente debido a la acción inhibitoria de la acidez láctica, a factores del proceso o a

otros compuestos químicos que forman parte de la formulación del producto [17, 69], así también como a las posibles interacciones negativas entre las bacterias lácticas y probióticas [70, 71].

La viabilidad de bacterias probióticas en leches fermentadas depende de numerosos factores tales como la cepa en particular, la forma de inoculación (cultivos congelados, liofilizados o con una etapa previa de propagación *in situ* en planta), el momento del agregado a la leche (antes o después de la fermentación), la temperatura de fermentación, la acidez final y la composición química de la matriz, las interacciones con las bacterias lácticas acidificantes, las condiciones de temperatura durante la vida de estante y el oxígeno disuelto, entre otros [35]. Esta lista no es exhaustiva ya que es probable que existan interacciones entre estos factores, los cuales no han sido completamente abordados por estudios científicos. A pesar de esto, el pH final del producto y el fenómeno de post-acidificación durante la vida de estante han sido señalados como los dos factores más importantes en las pérdidas de viabilidad celular de bacterias probióticas en leches fermentadas experimentales y comerciales.

En nuestro país, algunos ejemplos de leches fermentadas comerciales, con varios años de presencia en el mercado, que contienen bacterias probióticas (y las cepas presentes) son: Actimel (*L. casei* DN 114 001), Leche SanCor Bio (*L. casei* CRL 431), Yakult (*L. casei* Shirota) y Activia (*B. animalis* subsp. *lactis* DN 173010).

Quesos

El queso ha sido la segunda matriz alimentaria con mayor éxito comercial para la vehiculización de bacterias probióticas. El agregado de estos cultivos a variedades frescas, blandas o semi-blandas de quesos es una alternativa alentadora a algunos problemas de escasa viabilidad en leches fermentadas, debido principalmente a la acidez láctica. Los quesos poseen mayores valores de pH que los yogures, una matriz más compacta y con menos oxígeno y un mayor contenido de grasa que podría actuar como un agente protector del probiótico durante el tránsito gastrointestinal [72]. Sin embargo, y a diferencia del proceso tecnológico de elaboración de yogures, algunos procesos casearios deben ser ligeramente modificados para adaptarse a los requerimientos de viabilidad de los probióticos. La actividad acuosa, contenido de sal, temperatura de cocción de la cuajada, período de maduración, entre otros, son algunos de los factores sobre los cuales se debe reflexionar antes de decidir la inclusión de una bacteria probiótica en un queso. En este sentido, los quesos frescos son los productos ideales para incluir probióticos, ya que son productos que no implican maduración y en general poseen de bajo a moderado contenido de sal. El almacenamiento se hace a temperaturas de refrigeración y la vida útil es relativamente corta o dentro de los plazos en los que se espera el probiótico pueda mantenerse viable (de un par de semanas a unos pocos meses) [73].

Uno de los principales obstáculos a sortear para el agregado de probióticos a quesos es determinar en qué momento y como agregarlos a la tina de elaboración para minimizar la pérdida de biomasa junto al suero que se elimina después del corte de la cuajada. Para cada queso en particular debe encontrarse una solución según su tecnología de elaboración, por ejemplo, en el caso de queso cottage, la incorporación tiene lugar en el momento del agregado de la crema y la sal [74, 75]. Por otro lado es posible implementar un sistema de ultrafiltración para concentrar los sólidos del producto y evitar entonces la etapa de desuerado, con la consecuente pérdida de células viables en el suero. Esta fue la tecnología adoptada para el proceso de producción del Bioqueso Ilolay Vita, primer queso probiótico Argentino y latinoamericano desarrollado por la empresa Sucesores de A. Williner (Rafaela, Argentina) con la colaboración de investigadores del Instituto de Lactología Industrial (UNL-CONICET) de la

ciudad de Santa Fe [59]. Existen numerosísimos antecedentes de la incorporación exitosa de bacterias probióticas a quesos, la mayoría de ellos experimentales, algunos ejemplos son: Cheddar [76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84], Cottage [74, 75, 85], Gouda [86], Crescenza en Italia [87, 88, 89], Kariesh [90] y Tallaga [91] en Egipto, de cabra en Portugal [92], Bioqueso Ilolay Vita fresco en Argentina, que llegó al desarrollo comercial y lanzamiento al mercado [59], Canestrato Pugliese [93] y Fior di Latte [94] también en Italia, Pikantne en Estonia [95], blanco salado [96], blanco [97], Minas frescal en Brasil [98], de oveja [99], semi duro tipo Tybo [100] y petit-suisse también en Brasil [101].

Productos congelados

Productos tales como helados, yogures congelados y postres helados han sido propuestos como vehículos para bacterias probióticas [102,103,104]. Se argumenta que la principal ventaja de los productos congelados es que se almacenan a temperaturas de entre 5 y 10°C bajo cero, aunque la mayor vida útil de estos productos podría afectar negativamente la viabilidad de los probióticos a largo plazo. Otros factores del alimento que podrían jugar en contra de la viabilidad de estos microorganismos son la baja actividad acuosa y la posiblemente elevada presión osmótica debido al nivel de sólidos. Se podrían registrar a la vez alteraciones en la fluidez de la membrana plasmática y deshidratación intracelular debido a la formación de cristales intracelulares que podrían romper las células y causar la inactivación de los probióticos a lo largo del proceso de congelamiento, según sean las condiciones del mismo. Sin embargo, hay otros factores que jugarían a favor de los probióticos, como la presencia de crioprotectores naturales (caseína, azúcares, grasas). De todos modos, la capacidad de un probiótico de mantenerse viable en un producto son siempre características que dependen tanto de la cepa como de las propiedades fisicoquímicas del producto. Un ejemplo de un desarrollo exitoso de un producto de este tipo es el helado comercial Biogarde®, disponible en Alemania desde los años 80's y que contiene *B. bifidum* y *L. acidophilus* como cultivos probióticos.

Conclusiones

La incorporación de bacterias probióticas en productos lácteos ha experimentado una gran expansión en las últimas dos décadas, apoyándose en la proliferación de estudios científicos que avalan sus efectos benéficos para la salud. Sin embargo, no todas las cepas disponibles han sido sometidas aún a estudios clínicos a doble ciego y con control de placebos y menos aún una vez que han sido incorporadas a diferentes matrices alimentarias, las cuales tienen un papel decisivo en su funcionalidad. Existen aún numerosas dificultades a nivel de la industria de alimentos para manejar y controlar su presencia en el producto final, principalmente cuando es necesario hacer un control de células viables y están presentes junto a las bacterias lácticas acidificantes o en mezcla con otros probióticos. En menor medida se conoce de qué forma la matriz alimentaria y las variables del proceso tecnológico de elaboración de alimentos e incluso de la biomasa de bacterias probióticas, puede influenciar la funcionalidad de éstas. Afortunadamente existen numerosos recursos humanos ya formados en el tema, herramientas metodológicas disponibles y un principio de conciencia sobre la importancia de regular este tema por parte de los organismos gubernamentales de control que llevará, en el futuro, a disponer de cepas perfectamente caracterizadas, para las cuales se conocerán sus efectos benéficos hacia la salud cuando son consumidas en un alimento de forma sistematizada. Por el momento, una mirada global a los estudios clínicos realizados, demuestran que su consumo es seguro y, que en la mayoría de los casos, su ingesta mejora

numerosas funciones del organismo tendientes a prevenir o a actuar de forma terapéutica sobre algunas patologías, sobre todo las de origen intestinal.

Referencias

- [1] E. Isolauri, S. Salminen & A.C. Ouwehand, *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* **18**, 299 (2004).
- [2] G.W. Tannock, en *Gut flora, nutrition, immunity and health*, Cap. 1, R. Fuller & G. Perdígón (Editores), Blackwell Publishing, Oxford, 2003.
- [3] M.C. Moreau & V. Gaboriau-Routhiau, en *Probiotics 3 Immunomodulation by the gut flora and probiotics*, Cap. 3, R. Fuller & G. Perdígón (Editores), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 2000.
- [4] M. Blaut & T. Clavel, *J. Nutr.* **137**, 751S (2007).
- [5] G.R. Gibson, R.A. Rastall & R. Fuller, en *Gut flora, nutrition, immunity and health*, Cap. 3, R. Fuller & G. Perdígón (Editores), Blackwell Publishing, Oxford, 2003
- [6] R. Fuller, *J. Appl. Bacteriol.* **66**, 365 (1989).
- [7] FAO/WHO (2002) Guidelines for the evaluation of probiotics in food. Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization Working Group Report. http://www.who.int/foodsafety/fs_management/en/probiotic_guidelines.pdf
- [8] C.M. Franz, M.E. Stiles, K.H. Schleifer & W.H. Holzapfel, *Int. J. Food Microbiol.* **88**, 105 (2003).
- [9] F.H. Kayser, *Int. J. Food Microbiol.* **88**, 255 (2003).
- [10] M. Rinkinen, K. Jalava, E. Westermarck, S. Salminen & A.C. Ouwehand, *Vet. Microbiol.* **92**, 111 (2003).
- [11] G. Reid, M.E. Sanders, H.R. Gaskins, G.R. Gibson, A. Mercenier, R. Rastall, M. Roberfroid, I. Rowland, C. Cherbut & T.R. Klaenhammer, *Clin. Gastroenterol.* **37**, 105 (2003).
- [12] F. Guarner, G. Perdígón, G. Corthier, S. Salminen, B. Koletzko & L. Morelli, *Brit. J. Nutr.* **93**, 783 (2005).
- [13] E. Farnworth, *Handbook of fermented functional foods*, 2nd Edit., CRC Press, Boca Raton, 2008.
- [14] M. Gueimonde, M. Kalliomäki, E. Isolauri & S. Salminen, *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **42**, 604 (2006).
- [15] J.H. Lee, V.N. Karamychev, S.A. Kozyavkin, D. Mills, A.R. Pavlov, N.V. Pavlova, N.N. Polouchine, P.M. Richardson, V.V. Shakhova, A.I. Slesarev, B. Weimer & D.J. O'Sullivan, *BMC Genomics* **27**, 247 (2008).
- [16] A. Lourens-Hattingh & B.C. Viljoen, *Int. Dairy J.* **11**, 1 (2001).
- [17] C.G. Vinderola, G.A. Costa, S. Regenhardt & J.A. Reinheimer, *Int. Dairy J.* **12**, 579 (2002).
- [18] D. Haller, H. Colbus, M.G. Ganzle, P. Scherenbacher, C. Bode & W.P. Hammes W.P., *Syst. Appl. Microbiol.* **24**, 218 (2001).
- [19] C. Dogi & G. Perdígón, *J. Dairy Res.* **73**, 357 (2006).
- [20] G. Reid, J. Jass, M.T. Sebulsky & J.K. McCormick, *Clin. Microbiol. Rev.* **16**, 658 (2003).
- [21] O. Adolfsson, S.N. Meydani & R.M. Russell, *Am. J. Clin. Nutr.* **80**, 245 (2004).
- [22] M. Saxelin, S. Tynkkynen, T. Mattila-Sandholm & W.M. de Vos, *Curr. Opin. Biotechnol.* **16**, 204 (2005).
- [23] A.C. Senok, A.Y. Ismaeel & G.A. Botta, *Clin. Microbiol. Infect.* **11**, 958(2005).
- [24] N.P. Shah, *Int. Dairy J.* **17**, 1262 (2007).
- [25] M. de Vrese & J. Schrezenmeir, *J. Nutr.* **137**, 739S (2007).
- [26] T. Vasiljevic & N.P. Shah, *Int. Dairy J.* **18**, 714 (2008).
- [27] R. Fuller & G. Perdígón, *Gut flora, nutrition, immunity and health*, Blackwell Publishing

- Ltd., Oxford, 2003.
- [28] S. Salminen, A. von Wright & A.C. Ouwehand, *Lactic acid bacteria. Microbiology and functional aspects*. 3rd Edit., Marcel Dekker, Inc., New York, 2004.
- [29] I. Goktepe, V.K. Juneja & M. Mohamed Ahmedna, *Probiotics in food safety and human health*, CRC Press, Boca Raton, 2007.
- [30] D.C. Montrose & M.H. Floch, *J. Clin. Gastroenterol.* **39**, 469 (2005).
- [31] A. de Moreno de LeBlanc, S. Chaves, E. Carmuega, R. Weill, J. Antóine & G. Perdigón, *Immunobiol.* **213**, 97 (2008).
- [32] M. Kanbe, M., en *Functions of fermented milk*, Cap. 2, Y. Nakazawa & A. Hosono (Editores), Elsevier Science Publishers Ltd., Cambridge, 1992.
- [33] J.L.J. Rasic & J.A. Kurmann, J.A. 1978. *Yoghurtscientific grounds, technology, manufacture and preparations*. Technical Dairy Pub. House, Copenahen, 1978
- [34] J.B. Prajapati & B.M. Nair, en *Handbook of fermented functional foods*, Cap. 1, E.R. Farnworth (Editor), CRC Press, Boca Raton, 2003.
- [35] C. Stanton, C. Desmond, M. Coakley, J.K. Collins, G. Fitzgerald & R.P. Ross, en *Handbook of fermented functional foods*, Cap. 2, E.R. Farnworth (Editor), CRC Press, Boca Raton, 2003.
- [36] T. Mitsuoka, *Nutr. Rev.* **50**, 438 (1992). [37] M.W. Russell, L.A. Bobek, J.H. Brock, G. Hajishengallis & J. Tenuovo, en *Mucosal immunology*, 3rd Edit., Cap. 5, J. Mestecky, M.E. Lamm, W. Strober, J. Bienenstock, J.R. McGhee & L. Mayer (Editores), Academic Press, San Diego, 2005.
- [38] R.I. Lehrer, C.L. Bevins & T., en *Mucosal immunology*, 3rd Edit., Cap. 6, J. Mestecky, M.E. Lamm, W. Strober, J. Bienenstock, J.R. McGhee & L. Mayer (Editores), Academic Press, San Diego, 2005.
- [39] P.A. Bron, C. Grangette, A. Mercenier, W.M. de Vos, W.M. & M. Kleerebezem, *J. Bacteriol.* **186**, 5721 (2004).
- [40] C.G. Vinderola, C. Matar & G. Perdigón, *Clin. Diag. Lab. Immunol.* **12**, 1075 (2005).
- [41] A.C. Ouwehand & S. Salminen, *Int. Dairy J.* **8**, 749 (1998).
- [42] C.M. Galdeano & G. Perdigón, *J. Appl. Microbiol.* **97**, 673 (2004).
- [43] G. Vinderola, A. Moreno de LeBlanc, G. Perdigón and C. Matar, en *Handbook of fermented functional foods*, 2nd Edition, Cap. 7, E.R. Farnworth (Editor), CRC Press, Boca Raton, 2004.
- [44] C.G. Vinderola, G. Perdigón, J. Duarte, E. Farnworth & C. Matar, *Cytokine* **36**, 254 (2006).
- [45] A.C. Ouwehand & S. Vesterlund, en *Lactic acid bacteria. Microbiological and functional aspects*. 3rd Edition, revised and expanded, Cap. 11, S. Salminen, A. von Wright & A. Ouwehand (Editores), Marcel Dekker, Inc., New York: 2004.
- [46] V. Morata de Ambrosini, S. Gonzalez, G. Perdigón, A. Pesce de Ruiz Holgado & G. Oliver, *Chem. Pharm. Bull.* **44**, 2263 (1996).
- [47] M.V. Tejada-Simon & J.J. Pestka, *J. Food Prot.* **62**, 1435 (1999).
- [48] J.F. Payne, A.E.J. Morris & P. Beers, *J. Appl. Microbiol.* **86**, 353 (1999).
- [49] N.P. Shah, *J. Dairy Sci.* **83**, 894 (2000).
- [50] C.P. Champagne, D. Roy & A. Lafond, *Biotechnol Tech.* **11**, 567 (1997).
- [51] R.R. Ravula & N.P. Shah, *Biotechnol. Tech.* **12**, 819 (1998).
- [52] C.G. Vinderola & J.A. Reinheimer, *Int. Dairy J.* **10**, 271 (2000).
- [53] IDF. 1990. Culture media for detection and enumeration of bifidobacteria in fermented milk products. Bulletin No. 252, Int. Dairy Federation, Brussels, Belgium.
- [54] IDF. 1995. Detection and enumeration of *Lactobacillus acidophilus*. Bulletin No. 306, Int. Dairy Federation, Brussels, Belgium.
- [55] IDF. 2006. Milk products - Enumeration of presumptive *Lactobacillus acidophilus* on a selective medium – Colony-count technique at 37°C. International Standard ISO 21128, IDF 192.

- [56] G. Klein, A. Pack, C. Bonaparte & G. Reuter, **41**, 103 (1998).
- [57] IDF. 2007. Selective enumeration of bifidobacteria in dairy products: development of a standard method. Bulletin No. 411, Int. Dairy Federation, Brussels, Belgium.
- [58] C.G. Vinderola & J.A. Reinheimer, *Int. Dairy J.* **9**, 497 (1999).
- [59] C.G. Vinderola, W. Prosello, D. Ghiberto & J.A. Reinheimer, *J. Dairy Sci.* **83**, 1905 (2000).
- [60] A. Talwalkar & K. Kailasapathy, *Int. Dairy J.* **14**, 143 (2004).
- [61] C.P. Champagne, R.P. Ross, M. Saarela, K.F. Hansen & D. Charalampopoulos, *Int. J. Food Microbiol.* **149**, 185 (2011).
- [62] T.C. Souza, M.F. Zacarias, A.M. Silva, A. Binetti, J. Reinheimer, J.R. Nicoli & G. Vinderola, *J. Appl. Microbiol.* **112**, 1184 (2012).
- [63] C.G. Vinderola, N. Bailo & J.A. Reinheimer, *Food Res. Int.* **33**, 97 (2000).
- [64] C.G. Vinderola, M. Gueimonde, T. Delgado, J. Reinheimer & C.G. de los Reyes-Gavilan, *Int. Dairy J.* **10**, 213 (2000).
- [65] K. Kailasapathy, *LWT - Food Sci. Technol.* **39**, 1221 (2006).
- [66] S.E. Gilliland & M.L. Speck, *J. Dairy Sci.* **60**, 1394 (1977).
- [67] R.I. Dave & N.P. Shah, *J. Dairy Sci.* **81**, 2804 (1998).
- [68] O.N. Donkor, A. Henriksson, T. Vasiljevic & N.P. Shah, *Int. Dairy J.* **16**, 1181 (2006).
- [69] K.J. Heller, *Am. J. Clin. Nutr.* **73**, 374S (2001).
- [70] P.J. Joseph, R.I. Dave & N.P. Shah, *Food Aust.* **50**, 20 (1998).
- [71] C.G. Vinderola, P. Mocchiutti & J.A. Reinheimer, *J. Dairy Sci.* **85**, 721 (2002).
- [72] C. Stanton, G. Gardiner, P.B. Lynch, J.K. Collins, G. Fitzgerald & R.P. Ross, *Int. Dairy J.* **8**, 491 (1998).
- [73] K.J. Heller, W. Bockelmann, J. Schrezenmeir & M. de Vrese, en *Handbook of fermented functional Foods*, E.R. Farnworth (Editor), CRC Press, Boca Raton, 2003.
- [74] L. Blanchette, D. Roy & S.F. Gauthier, *J. Dairy Sci.* **78**, 1421 (1995).
- [75] L. Blanchette, D. Roy, G. Bélanger & S.F. Gauthier, *J. Dairy Sci.* **79**, 8 (1996).
- [76] M.M. Furtado, J.A. Partridge & Z. Ustunol, *J. Dairy Sci.* **76**, 101 (1993).
- [77] P. Dinakar & V.V. Mistry, *J. Dairy Sci.* **77**, 2854 (1994).
- [78] S.K. Shaw & C.H. White, *J. Dairy Sci.* **77**, 4 (1994).
- [79] A. Daigle, D. Roy, G. Bélanger & J.C. Vuilleumard, *J. Dairy Sci.* **80**, Abstract D25 (1997).
- [80] G. Gardiner, R.P. Ross, J.K. Collins, G. Fitzgerald & C. Stanton, *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 2192 (1998).
- [81] G. Gardiner, C. Stanton, P.B. Lynch, J.K. Collins, G. Fitzgerald & R.P. Ross, *J. Dairy Sci.* **82**, 1379 (1999).
- [82] S. Mc Brearty, R.P. Ross, G.F. Fitzgerald, J.K. Collins, J.M. Wallace & C. Stanton, *Int. Dairy J.* **11**, 599 (2001).
- [83] M. Phillips, K. Kailasapathy & L. Tran, *Int. J. Food Microbiol.* **108**, 276 (2006).
- [84] L. Ong, A. Henriksson & N.P. Shah, *Int. Dairy J.* **17**, 937 (2007).
- [85] K.O. Riordan & G.F. Fitzgerald, *J. Appl. Microbiol.* **85**, 103 (1998).
- [86] A.M.P. Gomes, F.X. Malcata, F.A.M. Klaver & H.J. Grande, *Neth. Milk Dairy J.* **49**, 71 (1995).
- [87] H.B. Ghodduzi & R.K. Robinson, *Dairy Ind. Int.* **61**, 25 (1996).
- [88] M. Gobbetti, A. Corsetti, E. Smacchi, A. Zocchetti & M. De Angelis, *J. Dairy Sci.* **81**, 37 (1998).
- [89] P. Burns, F. Patrignani, D. Serrazanetti, G. Vinderola, J. Reinheimer, R. Lanciotti & M. Guerzoni, *J. Dairy Sci.* **91**, 500 (2008).
- [90] H.A. Murad, Z.I. Sadek & F.A. Fathy, *Deutsche Lebensmittel-Rundschau.* **94**, 409 (1998).
- [91] A.I. El-Zayat & M.M. Osman, *Egypt. J. Dairy Sci.* **29**, 99 (2001).
- [92] A.M.P. Gomes & F.X. Malcata, *J. Dairy Sci.* **81**, 1492 (1998).
- [93] M.R. Corbo, M. Albenzio, M. De Angelis, A. Sevi & M. Gobbetti, *J. Dairy Sci.* **84**, 551 (2001).

- [94] F. Minervini, S. Siragusa, M. Faccia, F. Dal Bello, M. Gobetti & M. De Angelis, *J. Dairy Sci.* **95**, 508 (2012)..
- [95] E. Songisepp, T. Kullisaar, P. Hütt, P. Elias, T. Brilene, M. Zilmer & M. Mikelsaar, *J. Dairy Sci.* **87**, 2017 (2004).
- [96] M. Yilmaztekin, B.H. Ozer & F. Atasoy, *Int. J. Food Sci. Nutr.* **55**, 53 (2004).
- [97] A. Kasimoglu, M. Goncuozlu & S. Akgun, *Int. Dairy J.* **14**, 1067 (2004).
- [98] F.C.A. Buriti, J.S. da Rocha & S.M.I. Saad, *Int. Dairy J.* **15**, 1279 (2005).
- [99] Y. Kourkoutas, L. Bosnea, S. Taboukos, C. Baras, D. Lambrou & M. Kanellaki, *J. Dairy Sci.* **89**, 1439 (2006).
- [100] C.V. Bergamini, E. Hynes, A. Quiberoni, V.B. Suarez & C.A. Zalazar, *Food Res. Int.* **38**, 597 (2005).
- [101] H.R. Cardarelli, F.C.A. Buriti, I.A. Castro & S.M.I. Saad, *LWT - Food Sci. Technol.* **41**, 1037 (2008).
- [102] R.R. Ravula & N.P. Shah, *Food. Aust.* **50**, 136 (1998).
- [103] J.E. Holcomb, J.F. Frank & J.U. McGregor, *Cult. Dairy Prod. J.* **26**, 4 (1991).
- [104] S. Hekmat & D.J. McMahon, *J. Dairy Sci.* **75**, 1415 (1992).

Manuscrito recibido el 21 de marzo de 2012.

Aceptado el 20 de abril de 2012.