

IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS PROBIÓTICOS EN PRODUCTOS LÁCTEOS: BIFIDOBACTERIAS

Carla Vallejos Castro¹, María Clara Hostench², Daniela Kuba¹, Sandra Najir Sarquis¹, Marcela Andrea Alvarez²
INTI Lácteos¹, INTI Agroalimentos²
 cvallejos@inti.gov.ar

Introducción

De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud, se define como *probióticos* a “los microorganismos vivos que, cuando son suministrados en cantidades adecuadas promueven beneficios en la salud del organismo huésped”.

Hasta el momento la legislación no permite aludir en el etiquetado de los productos alimenticios a propiedades benéficas para la salud, pero si declarar la presencia de cultivos probióticos.

Por otra parte en enero del presente año el Consejo para la Nutrición Responsable (CRN) y la Asociación Internacional de Probióticos han desarrollado una base científica conteniendo directrices de buenas prácticas para el etiquetado, almacenamiento y **pruebas de estabilidad**, de los suplementos dietéticos de alimentos funcionales que contienen probióticos. (IPA International Probiotics Association, 2017).

Por lo antes señalado, desde el año 2016 los laboratorios de microbiología de Agroalimentos y Lácteos trabajan en un proyecto destinado a la evaluación cuali-cuantitativa de la viabilidad y estabilidad de los microorganismos probióticos en productos lácteos que declaren su contenido.

Objetivo

El objetivo del presente trabajo es identificar y evaluar la viabilidad y estabilidad de las bifidobacterias durante la vida útil de diferentes productos lácteos del mercado, mediante la utilización de técnicas de microbiología tradicional de recuento y de biología molecular.

El presente trabajo adquiere relevancia considerando que la evaluación de probióticos, podría ser en un futuro, un requisito de calidad para la comercialización de los productos mencionados.

Descripción

Las leches fermentadas constituyen el principal vehículo de probióticos y los grupos bacterianos más utilizados pertenecen al género *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*.

En el presente trabajo se presentan los resultados obtenidos de productos que

declaran la presencia de bifidobacterias como cultivo probiótico.

A partir de cada producto se siguieron las metodologías cultivo independiente (1) y cultivo dependiente (2), como indica la **figura 1**. En el primer caso (1) la extracción de ADN se realiza directamente del producto por medio de un Kit comercial y en el segundo caso (2) se realizan recuentos en un medio de cultivo selectivo (TOS-MUP), donde se verifica el número presuntivo de bifidobacterias viables, durante y al final de la vida útil del producto y luego se realiza la extracción de ADN desde las colonias típicas seleccionadas.

En ambos casos (1) y (2) se realiza la identificación molecular del género *Bifidobacterium*, por medio de la técnica PCR (*Polymerase Chain Reaction*) especie-específica, la cual utiliza primers específicos, que amplifica una región del gen 16S rARN de 490 pares de base (pb), como indica la **figura 3**, según lo descrito por Wenwei Lu y col. 2015.

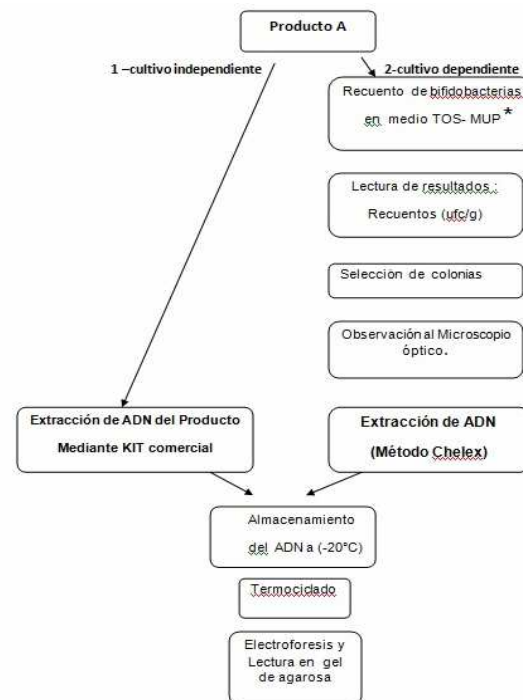


Figura 1. Diagrama de flujo del método de trabajo, por producto y fecha de análisis.
 *TOS (Transgalactosylated Oligosaccharide Mixture)

Suplemento MUP (Mupirocin Lithium Salt).

Resultados

| Fecha de Análisis | Lote | Vencimiento | Recuento de <i>Bifidobacterium</i> (ufc/g) |
|---|------|-------------|--|
| Producto A1: bebida sabor kiwi | | | |
| Dentro vida útil 07/01/2016 | 1 | 24/01/16 | 4,4 x10 ⁷ |
| Al vto 22/01/2016 | 1 | 24/01/16 | 5,2 x10 ⁷ |
| Producto A2: pote, sabor ciruela. | | | |
| Dentro vida útil 29/03/2016 | 2 | 20/04/16 | 7,5 x10 ⁷ |
| Al vto 28/04/2016 | 2 | 20/04/16 | 8,6 x10 ⁷ |
| Producto A3: bebible (sachet), sabor ciruela | | | |
| Dentro vida útil 29/03/2016 | 3 | 24/04/16 | 4,3 x10 ⁷ |
| Al vto 28/04/2016 | 3 | 24/04/16 | 1,7 x10 ⁷ |
| Producto A4: bebible (sachet), sabor ciruela | | | |
| Dentro vida útil 19/08/2016 | 4 | 11/09/16 | 6,8 x10 ⁷ |
| Al vto 09/09/2016 | 4 | 11/09/16 | 6,8 x10 ⁷ |
| Producto A5: pote, sabor ciruela | | | |
| Dentro vida útil 19/08/2016 | 5 | 07/09/16 | 9,1 x10 ⁷ |
| Al vto 09/09/2016 | 5 | 07/09/16 | 1,2 x10 ⁸ |
| Producto A6: pote, sabor ciruela | | | |
| Dentro vida útil 13/12/2016 | 6 | 06/01/17 | 1,1 x10 ⁷ |
| Al vto 06/01/2017 | 6 | 06/01/17 | 1,5 x10 ⁷ |
| Producto A7: pote, sabor ciruela. | | | |
| Dentro vida útil 13/12/2016 | 7 | 06/01/17 | 1,4 x10 ⁷ |
| Al vto 06/01/2017 | 7 | 06/01/17 | 1,6 x10 ⁷ |
| Producto A8: pote, sabor ciruela | | | |
| Dentro vida útil 13/12/2016 | 8 | 06/01/17 | 1,3 x10 ⁷ |
| Al vto 06/01/2017 | 8 | 06/01/17 | 1,2 x10 ⁷ |
| Producto A9: pote, sabor ciruela. | | | |
| Dentro vida útil 13/12/2016 | 9 | 06/01/17 | 1,2 x10 ⁷ |
| Al vto 06/01/2017 | 9 | 06/01/17 | 1,2 x10 ⁷ |
| Producto A10: pote, sabor ciruela. | | | |
| Dentro vida útil 13/12/2016 | 10 | 06/01/17 | 9,9 x10 ⁶ |
| Al vto 06/01/2017 | 10 | 06/01/17 | 1,1 x10 ⁷ |

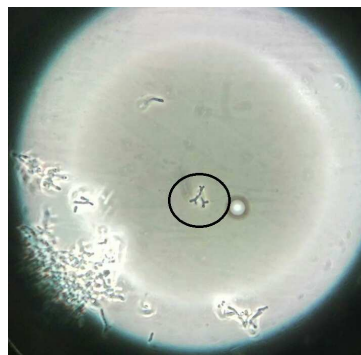


Figura 2. Vista al microscopio de bifidobacterias

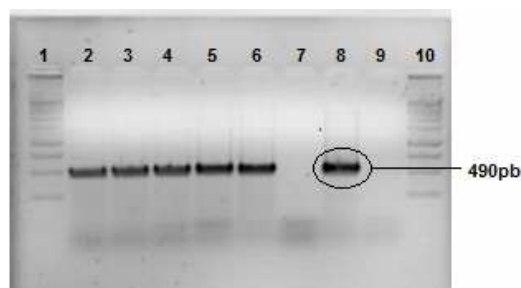


Figura 3. Calle 1 y 10: Marcador de peso molecular, calle 2 a 6: colonias aisladas desde el producto lácteo, calle 7: control de reactivos, calle 8: control positivo *B. pseudolongum pseudolongum* LMG11571, calle 9: control negativo *Lactobacillus plantarum* ATCC14917.

Conclusiones

Se obtuvo la banda de 490 pb esperada, lo que indica la presencia del género *Bifidobacterium* en la totalidad de los productos analizados mediante la técnica **cultivo independiente (1)**.

Mediante la técnica **cultivo dependiente (2)**, se obtuvieron los mismos resultados a partir de las colonias aisladas del medio selectivo de recuento. En este medio se obtuvieron recuentos del orden de 1.0×10^7 ufc/g de bifidobacterias, durante la vida útil del producto y en la fecha de vencimiento del mismo. Comprobando así, la estabilidad y viabilidad de las bacterias probióticas presentes, como indica el CAA en el art. 1389.

Bibliografía

Enumeración presuntiva de bifidobacterias Norma ISO 29981:2010.

IPA International Probiotics Association (2017). Directrices para las buenas prácticas de etiquetado almacenamiento y estabilidad de productos con el contenido de probióticos.

Wenwei Lu, W.Kong, Pu Yang, Jian Kong (2015) - International Dairy Journal 41(7-12)
"A one-step PCR-based method for specific identification of 10 common lactic acid bacteria and *Bifidobacterium* in fermented milk."