

Estudio microbiológico de queso fresco adicionado con el probiótico *Saccharomyces boulardii*

Rafael Zamora-Vega¹, Héctor Eduardo Martínez-Flores¹✉, José Luis Montañez Soto², Ulises Huerta Silva¹, Rosa Elena Pérez Sánchez³

¹Facultad de Químico Farmacobiología. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

²Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional Unidad Michoacán. CIIDIR IPN Michoacán.

³Facultad de Agrobiología "Presidente Juárez". Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

Resumen

Fue evaluado el efecto de la incorporación del probiótico *Saccharomyces boulardii* en queso fresco sobre la prevalencia de bacterias mesófilas aerobias (BMA), *Salmonella spp*, *Staphylococcus aureus*, *E.coli*, Coliformes Totales (CT), y mohos y levaduras. Se evaluaron cuatro tratamientos: T1 ó control, sin agregado de probiótico; T2, con agregado de 10 g del probiótico encapsulado (PE); T3, con agregado de 20 g del PE y T4, con 30 g del PE. El microorganismo fue encapsulado con mucílago de nopal, alginato sódico e inulina e incorporado en las muestras después del desuerado de la leche junto con la sal; los quesos fueron almacenados a 4 °C. Después de 24h se realizaron los estudios microbiológicos. Los datos se analizaron mediante la metodología de modelos de efectos fijos y la diferencia entre los tratamientos con el método de medias de mínimos cuadrados. Se encontró efecto del tratamiento ($P < 0.05$) sobre las UFC/g de BMA, hongos y levaduras, CT y *S. aureus*. Mientras que no se encontró efecto de tratamiento ($P > 0.05$) sobre *Salmonella spp* y *E. coli*. La adición de 30 g de *S. Boulardii* (T4), en el queso, presentó menor número (\log_{10}) de UFC/g de BMA, comparada con T1: 2.1 y 7.2 UFC/g, respectivamente. Para hongos y levaduras, el T1 mostró mayor número (\log_{10}) de UFC/g (2.65), comparada con T4 (2.50), el cual fue igual ($P > 0.05$) a T2 y T3. En CT (\log_{10}) se encontró que T2, T3 y T4, fueron iguales ($P > 0.05$) entre sí y diferentes ($P < 0.05$) e inferiores a T1 (1.90 UFC/g). Para *S. aureus*, los quesos con la adición de 10, 20 y 30 g de *S. Boulardii* fueron iguales ($P > 0.05$) y presentaron un menor valor (\log_{10}) de UFC/g ($P < 0.05$) respecto a T1 (2.9). La adición de *S. boulardii* en quesos mejoró la seguridad alimentaria.

Palabras clave: Queso, probiótico, *Saccharomyces boulardii*, encapsulación.

Introducción

En el Estado de Michoacán, México, se han realizado estudios para determinar la calidad de la leche cruda y se encontró que en los sistemas productores de bovinos lecheros del Noreste del estado la leche cruda contenía entre 6.7 y 7.9 (\log_{10}) unidades formadoras de colonias (UFC) por mililitro de bacterias mesófilas aerobias (BMA) y de 2.3 a 3.5 (\log_{10}) UFC/ml de coliformes totales (CT) (Carrión *et al.*, 2007). En el Municipio de Saguayo, Michoacán, se encontró que la leche cruda contenía de 8.0 a 9.0 (\log_{10}) UFC/ml de BMA y de 5.7 a 8.0 (\log_{10}) UFC/ml de CT (Flores *et al.*, 2009). Valores superiores a los que marca la norma oficial NMX-F-700-COFOCALEC 2004: 6 y 2 (\log_{10}) UFC/ml para BMA y CT, respectivamente, para que la leche cruda se pueda considerar como apta para el consumo humano.

Caraveo *et al.* (2007) determinaron que en la región de Jiquilpan, Michoacán, el 80% de las explotaciones bovinas presentaron mastitis, cuyo principal patógeno fue *Staphylococcus aureus*. Mismo patógeno que se aisló en el 94% de las explotaciones bovinas afectadas por mastitis en el Municipio de Álvaro Obregón, Michoacán (Beiza *et al.*, 2007). De manera general, se ha establecido que en el estado de Michoacán la mastitis es ocasionada en un 65% por *S. aureus* y un 12% por *E. Coli* (Carrión *et al.*, 2009). De acuerdo con Beiza *et al.* (2007), la mastitis genera, además de una

leche de mala calidad, un decremento hasta de un 36.6% en el rendimiento del queso.

La presencia de microorganismos patógenos en los subproductos lácteos como el queso, no solo depende de la salud de la ubre de la vaca, también se relaciona con el tratamiento térmico de la leche, la limpieza del material usado para quesería, la calidad de los cultivos, del manejo de la cuajada durante el procesamiento, de la temperatura de almacenamiento, del transporte y de la manipulación durante la distribución del queso (Farkye, 2002). Aunado a lo anterior, los altos niveles de humedad que presentan los quesos frescos, provoca el desarrollo de microorganismos patógenos como *Salmonella* y *E. coli serotipo O157:H7* causantes de infecciones e intoxicaciones alimentarias (Ceron, 2008).

Los quesos elaborados con leche sin pasteurizar, están asociados con brotes de enfermedades alimentarias, con mayor frecuencia que los fabricados a partir de leche pasteurizada, aunque también estos últimos pueden ocasionar intoxicación alimentaria por una inadecuada pasteurización o porque los quesos elaborados con leche pasteurizada se contaminan posteriormente con microorganismos patógenos (Delgado *et al.*, 2003). De acuerdo con la FDA (2005) los problemas por contaminación de la leche y los quesos por *Salmonella* son frecuentes en países desarrollados como en los subdesarrollados.

En la actualidad, los mercados globales no solo buscan productos alimenticios de calidad e inocuos para el consumo humano, sino que además, estos entren en el concepto de "alimentos funcionales o nutraceuticos" (Stanton *et al.*, 2001). En respuesta,

✉ **Autor de correspondencia:** Héctor Eduardo Martínez Flores. Facultad de Químico Farmacobiología. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán. Email: hedu65@gmail.com

la industria de alimentos ha desarrollado productos lácteos funcionales de calidad nutricional y sabor agradable al adicionarles probióticos. Dentro de los productos lácteos nutracéuticos más comercializados se encuentran: el yogurt, leches fermentadas, kéfir, postres refrigerados y congelados (helados), quesos y mantequilla, entre otros (Rowland et al., 2002). Las ventajas de los probióticos se centran en la acción benéfica sobre la salud del humano. Así, el probiótico *Saccharomyces boulardii* puede controlar la instauración y/o el desarrollo de diversos microorganismos patógenos, entre los que destacan *Salmonella typhimurium*, *Shigella spp.*, *Clostridium difficile*, *Campylobacter jejuni* y *Escherichia coli* (Paul, 2005). Por ello, el objetivo fue evaluar microbiológicamente el queso fresco adicionado con el probiótico *Saccharomyces boulardii* en producto terminado, en función de la presencia de bacterias mesófilas aerobias, *Salmonella spp.*, *Staphylococcus aureus*, *E.coli*, Coliformes totales, mohos y levaduras.

Metodología

Materia prima

La leche de vaca fue recolectada de un establo en la ciudad de Morelia, Mich., en el mes de Abril de 2010. La cepa de *S. boulardii* strain (CDBB-L-1483 ATCC-MYC-797) fue donada por el CINVESTAV-IPN (México, D.F.).

Elaboración del alimento funcional

En la elaboración de queso adicionado con el probiótico se utilizó la levadura *Saccharomyces boulardii* previamente encapsulada con alginato de sodio al 1%, inulina al 0.05% y mucílago de nopal al 0.05% tal como fue reportado por Zamora (2011).

Se elaboraron 4 lotes de queso de leche siguiendo el protocolo de Sangronis y García (2007). La leche fue pasteurizada a 65 °C durante 30 min, y enfriada posteriormente a 34 °C. Posteriormente fue distribuida en cuatro cubas de quesería de 10 L de capacidad cada una. La leche fue entonces suplementada con CaCl₂ (0.02%), cuajada y posteriormente desuerada para agregar el encapsulado conteniendo el probiótico.

Relación de tratamientos

El estudio consistió de cuatro tratamientos (T): T1 (n=3) ó control, sin agregado de probiótico; T2 (n=3), con agregado de 10

g del probiótico encapsulado; T3 (n=3), con agregado de 20 g del probiótico encapsulado y T4 (n=3), con 30 g del probiótico encapsulado. La cepa probiótica fue previamente propagada en medio PDA (BIXON), y posteriormente encapsulada se añadió en la leche en una concentración a 10⁹ UFC/ml. Los quesos de los cuatro tratamientos fueron colocados en papel y en una bolsa de plástico y almacenados a 4 °C.

Análisis Microbiológico de los quesos

Se realizó el análisis microbiológico del queso de acuerdo a la Norma Oficiales Mexicana: NOM-092-SSA1-1994 para bacterias mesófilas aerobias (BMA), NOM-113-SSA1-1994 para coliformes totales (CT), NOM-114-SSA1-1994 para *Salmonella*, NOM-115-SSA1-1994 para *Staphylococcus aureus*, y Método MUG para *Escherichia coli*.

Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos obtenidos se realizó mediante la metodología de los modelos de efectos fijos (SAS, 2000) y la diferencia entre los tratamientos se obtuvieron con el método de medias de mínimos cuadrados (SAS, 2000).

Resultados y discusión

Se encontró efecto del tratamiento (P<0.05) sobre las UFC/g de bacterias mesófilas aerobias (BMA), hongos y levaduras, coliformes totales (CT) y *S. aureus*. Mientras que no se encontró efecto de tratamiento (P > 0.05) sobre *Salmonella spp.* y *E. coli*; los resultados fueron negativos para todos los tratamientos.

En lo referente al promedio de UFC/g de BMA (log₁₀) todos los tratamientos fueron diferentes estadísticamente entre

sí (P < 0.05); la adición de 30 g de *S. Boulardii* (T4), en el queso, presento un menor número (log₁₀) de UFC/g de BMA, en comparación con T1 (queso sin la adición de *S. Boulardii*): 2.1 y 7.2 UFC/g, respectivamente (Tabla 1). De acuerdo con la NOM-121-SSA1-1994, establece que los quesos no deben de presentar un valor (log₁₀) mayor a 6.6 UFC/g de BMA para ser considerado apto para el consumo. Estándar que no cumplió T1, más sí el T2 (2.4), T3 (2.9) y T4 (2.1). Con respecto al T4 (adición de 30 g de *S. Boulardii* en el queso), este resultado el tratamiento más adecuado (P < 0.05) para incrementar la calidad del queso pues logró un mayor control sobre BMA.

Ortiz et al. (2012) encontraron 4.0 ± 0.33 UFC/g de BMA (log₁₀) en queso fresco sin adición de probióticos, proveniente de leche cruda con 3.7 ± 0.28 UFC/ml de BMA (log₁₀). Gonzales-Córdova et al. (2004) considera que las cuentas logarítmicas altas de patógenos en queso fresco son indicadores de la poca higiene durante el ordeño, la recolección y distribución de la leche. Al respecto, Ortiz et al. (2012) encontraron valores de 7.1 UFC/ml de BMA (log₁₀) en leche cruda. El contenido alto de BMA deteriora las características organolépticas tanto del producto como de los subproductos en menor tiempo; en 15 días de almacenamiento del queso fresco se encontró 7.2 UFC/g (log₁₀) (Ortiz et al., 2012), lo cual es negativo para quien produce y para quien lo consume.

En cuanto al análisis microbiológico para hongos y levaduras, el T1 fue el que mostró mayor número (log₁₀) de UFC/g (2.65), en comparación con T4 (2.50). No obstante, T4 fue igual (P > 0.05) a T2 (2.60) y T3 (2.55) (Tabla 1). Resultados que concuerdan con Zambrano (2010),

Tabla 1. Medias de mínimos cuadrados de la microbiología del queso de acuerdo con el tratamiento.

Microorganismos	Tratamientos			
	T1	T2	T3	T4
BMA	7.20 e.e 0.57 ^a	2.45 e.e 0.57 ^c	2.90± 0.57 ^b	2.10 e.e 0.57 ^d
Hongos y Lev.	2.65 e.e 0.03 ^a	2.60 e.e 0.03 ^{ab}	2.55 ± 0.03 ^{ab}	2.50 e.e 0.03 ^b
CT	1.90 e.e 0.02 ^a	1.75 e.e 0.02 ^b	1.80 ± 0.02 ^b	1.75 e.e 0.02 ^b
<i>Salmonella spp.</i>	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
<i>S. aureus</i>	2.92 e.e 0.03 ^a	2.80 e.e 0.03 ^b	2.70 ± 0.03 ^b	2.80 e.e 0.03 ^b
<i>Salmonella spp.</i>	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente

Letras diferentes en la misma fila son estadísticamente diferentes (p<0.05)

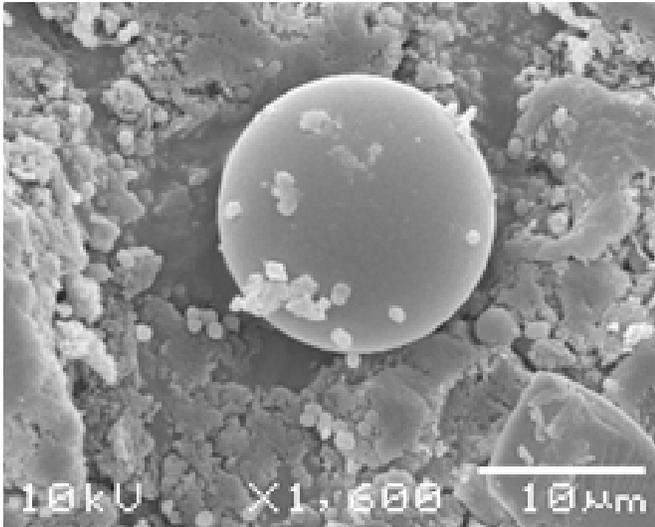


Figura 1. Cápsula formada con alginato de sodio, inulina y mucilago de nopal recubriendo a *Saccharomyces boulardii*.



Figura 2. Queso adicionado con el probiótico *Saccharomyces boulardii*.

quien encontró diferencias entre el tratamiento testigo y el tratamiento con la adición de *Lactobacillus acidophilus* en el queso; 3.15 y 2.71 UFC/g (\log_{10}) respectivamente, lo que sugiere que la presencia del cultivo probiótico modera la multiplicación de los microorganismos contaminantes durante la producción, proveyéndoles una protección adicional. De acuerdo con la NOM-121-SSA1-1994, el valor (\log_{10}) permitible de hongos y levaduras en el queso es de 2.60 FCU/g. Al respecto, se encontró que los tratamientos con la adición de *S. Boulardii* estuvieron dentro de los estándares de calidad para el queso. Sin embargo, la adición de 30 g de *S. Boulardii* en el queso presentó una mejor respuesta hacia la calidad al mostrar un mayor control de UFC/g de hongos y levaduras.

Obando *et al.* (2010), evaluaron la viabilidad de tres microorganismos considerados como probióticos: *Lactobacillus casei* 01, *Bifidobacterium* BB12, y *Lactobacillus acidophilus* La-5, durante la vida útil del queso y su influencia sobre la calidad microbiológica de los productos, evaluada mediante recuento de mohos y levaduras. Los quesos adicionados con los probióticos, estuvieron dentro de los límites permisibles, por la acción inhibitoria de dichos probióticos, resultados que pueden coincidir con los valores encontrados en esta investigación con la adición de *S. Boulardii*, sobre la acción inhibitoria en los hongos y levaduras del queso.

En lo referente a los resultados microbiológicos para UFC/g de CT (\log_{10}) se encontró que T2, T3 y T4, fueron estadísticamente iguales ($P > 0.05$) entre sí y diferentes ($P < 0.05$) e inferiores a T1 (1.90 UFC/g) (Tabla 1). No obstante, todos los tratamientos estuvieron dentro de los valores (\log_{10}) de la NOM-121-SSA1-1994, quien refiere que para que un queso sea apto para consumo no debe presentar más de 2.0 UFC/g de CT. La presencia de CT en el queso son indeseables y producen, independientemente de ácidos y gas, olores desagradables y en ocasiones sustancias viscosas en el queso. La incidencia de CT presente en los quesos demuestra las deficientes condiciones de higiene a las cuales está expuesto el queso y puede deberse a una serie de factores como son la baja calidad de la leche empleada en

la elaboración, maquinarias o superficies sucias, malas prácticas de manufactura, almacenamiento, transporte y comercialización (Perdomo, 2010).

Para *Staphylococcus aureus*, los quesos con la adición de 10, 20 y 30g de *S. Boulardii* fueron iguales ($P > 0.05$); 2.8, 2.7 y 2.8 UFC/g, respectivamente (Tabla 1) y presentaron un menor valor (\log_{10}) de UFC/g ($P < 0.05$) respecto a T1 (2.9). Ramírez *et al.*, (2011), establece que una de las funciones de los probióticos (*S. Boulardii*) es la producción de bacteriocinas, las cuales se ha demostrado su acción antimicrobiana contra bacterias como *Staphylococcus aureus*. Función que pudo estar presente en el queso con la adición de *S. Boulardii*, en esta investigación.

Cerón *et al.* (2008), encontraron que el queso fresco adicionado con la bacteria probiótica *Lactobacillus casei*, produjo 2.75 UFC/g (\log_{10}) de *S. aureus*. Obando *et al.* (2010), evaluaron la viabilidad de tres microorganismos considerados como probióticos: *Lactobacillus casei* 01, *Bifidobacterium* BB12 y *Lactobacillus acidophilus* La-5, durante la vida útil del queso y su influencia en la calidad microbiológica de los productos, sobre *S. aureus*, enterobacterias, mohos y levaduras, encontraron que los quesos adicionados con los probióticos, estuvieron dentro de los límites permisibles, por la acción inhibitoria de dichos probióticos. Díaz y García (2000), mencionan que *S. aureus* es un microorganismo omnipresente ya que se encuentra en la mucosa, cavidad nasal y piel del animal, razón por la que es muy frecuente que se encuentre en alimentos como los analizados en este estudio.

En términos generales, la adición de 30g de *S. Boulardii*, en el queso presentó una mayor respuesta en la disminución de la presencia de UFC/g para BMA, hongos y levaduras, CT y *S. aureus*, en comparación con la adición de 10 y 20g de *S. Boulardii*. Lo anterior puede señalar que el microorganismo probiótico *S. boulardii* encapsulado está ejerciendo algún tipo de función a través de un antagonismo/competencia con los patógenos potenciales, y posiblemente también debido a la secreción de

algunas sustancias (bacteriocinas y ácidos), evitando con ello la posible proliferación de microorganismos en el alimento.

Conclusiones

La adición del microorganismo probiótico *Saccharomyces boulardii* en la elaboración de quesos es una alternativa viable para mejorar la calidad y la seguridad alimentaria pues disminuye la proliferación de microorganismos como Bacterias mesofilas, hongos y levaduras, coliformes totales y *Staphylococcus aureus*.

Referencias

- Beiza MI, Ramírez GRE, Tzintzun RR, Val AD** (2007) *Efecto de la calidad de la leche en el rendimiento del queso*. 1er Congreso Regional de BUIATRIA. Memorias. Morelia Mich. P 161-168.
- Caraveo DJM, Flores MR, Carrion Gutiérrez M** (2007) *Prevalencia de Staphylococcus áureos causantes de mastitis clínica en bovinos*. 1er Congreso Regional de BUIATRIA. Memorias. Morelia Mich. P 106-110.
- Carrión GM, Flores MR y González VJ** (2007) *Estudio Microbiológico de la leche cruda entera en explotaciones bovinas lecheras del Noroeste de Michoacán*. 1er Congreso Regional de BUIATRIA. Memorias. Morelia Mich. 148-154.
- Carrión GM, Flores MR, Caraveo DJM, Núñez SM** (2009) *Aparición de mastitis bovina en dos establos del Estado de Michoacán, México, sus agentes etiológicos y la resistencia a antimicrobianos*. 5to Congreso Estatal de Ciencia y Tecnología. Morelia, Michoacán. P 144.
- Ceron CTG** (2008) *Evaluación de la viabilidad de Lactobacillus casei encapsulado*. Universidad de las Américas Puebla. Departamento de Ingeniería Química y Alimentos. Escuela de Ingeniería y Ciencias. Puebla, Puebla, México.
- Delgado RLC, Maurtua-Torres DJ** (2003) *Evaluación bacteriológica de quesos fresco artesanales comercializados en Lima, Perú, y la supuesta acción bactericida de Lactobacillus spp*. *Rev. Panamer. Salud Pública* 14:158-163.
- Díaz RC, García GB** (2001) *Staphylococcus aureus en queso blanco fresco y su relación con diferentes microorganismos indicadores de calidad microbiana*. *Rev. Salud Pública Nutr.-RESPYN*, 2:1-9.
- Durán LM, Montero CP, Flórez DW, Franco HV, Coneo RR** (2010) *Evaluación higiénico sanitaria y acción antagónica de cepas de Lactobacillus comerciales frente a microorganismos patógenos (Escherichia coli) presentes en el queso de capa del municipio de mompox*. *Rev. Cient.* XX(003).
- Farkye YN** (2002) *Microbiology of soft cheese*. In Robinson RK (edit.), *Dairy Microbiology Handbook*. 3th Ed. pp. 479-453. Inc. New York, USA.
- FDA. Food and Drug Administration [FDA] Statement** (2005) *FDA issues health advisory about certain soft cheese made from raw milk*.
- Flores M R, Carrión GM, Nuñez S M y Basrreera CH** (2009) *Calidad sanitaria del proceso de extracción de la leche cruda entera del municipio de Sabuayo, Michoacán*. 5to Congreso Estatal de Ciencia y Tecnología. Morelia, Michoacán. P 323.
- Gonzales-Córdova AF, LM Torres and Vallejo CB** (2004) *Technification of the craft process to obtain mexican cheese*. Center for research in nutrition and development, A. C. Coordination technology of food of Animal origin. Laboratory of chemistry and technology of dairy products. http://www.pncta.com.MX/pages/pncta_investigaciones_04g.asp?page=04e3 [Online] <http://wyndmoor.arserrc.gov/Page/D8000/8038-a.pdf> (accessed September 14, 2012).
- Norma Oficial Mexicana NMX-F-700-COFOCALEC-2004** (2004) *Counting of somatic cells by flow cytometry*. [On line]: www.cofocalec.org.mx/internaproductos.php
- Norma Oficial Mexicana NOM-113-SSA** (1994) *Possessions and services, Method for the account of total coliform microorganisms in plaque*. Secretary of Health. Mexico. [Online] <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/113ssa14.html>
- Norma Oficial Mexicana NOM-114-SSA1-1994** (1994) *Bienes y servicios, método para la determinación de salmonella en alimentos*. www.bidihmujer.salud.gob.mx/documentos/leyes/NOM-114-SSA-1994.
- Norma Oficial Mexicana NOM-115-SSA1-1994** (1994) *Bienes y servicios, método para la determinación de staphylococcus aureus en alimentos*. www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/115ssa14.html
- Norma Oficial Mexicana NOM-121-SSA1-1994** (1994) *Possessions and services, Cheeses: fresh, mature and processed*. Sanitary standards. Secretary of Health, México. [Online] <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/121ssa14.html>
- Norma Oficial Mexicana NOM-092-SSA1-1994** (1994) *Bienes y Servicios, Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa*.
- Norma Oficial Mexicana NOM-111-SSA1-1994** (1994) *Bienes y Servicios, Método para la cuenta de Mohos y Levaduras en alimentos*.
- Norma Oficial Mexicana NOM-113-SSA1-1994** (1994) *Bienes y Servicios, Método para la cuenta de Microorganismos Coliformes Totales en Placa*.
- Obando CM, Brito CCS, Schöbitz RPT, Baez MLA, Horzella RMY** (2010) *Viabilidad de los microorganismos probióticos Lactobacillus casei 01, Lactobacillus acidophilus La-5, Bifidobacterium BB12 durante el almacenamiento de queso cottage*. *Rev. Fac. Quím. Farmac.* 17:141-148.
- Ortiz RR, Valdez AJJ, Gómez RB, López MJ, Chávez MMP, García SPA and Pérez SRE** (2012) *Yield and microbiological quality of raw milk and fresh cheese obtained from Holstein cows receiving a diet supplemented with nopal (Opuntia ficus indica)*. *African Journal of Microbiology Research* Vol. 6(2).
- Paul BJ** (2005) *Ejemplo de un medicamento probiótico: Saccharomyces boulardii liofilizada*. *REV. GASTROENTEROL. PERÚ*. 25: 176-188.
- Perdomo G N** (2010) *Evaluación de la calidad microbiológica de leche y queso fresco "de prensa" artesanal elaborado en el municipio de Jesús Carranza, Veracruz, México*. Tesis de Licenciatura. Universidad Veracruzana. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia Veracruz, Ver. P 54-71.
- Ramírez RJC, Rosas PU, Velázquez GYM, Armando UJ y Erce RF** (2011) *Bacterias lácticas: Importancia en alimentos y sus efectos en la salud*. *Revista Fuente*. 2:7.1-16.
- Rowland I, Ortega RM, Aranceta JM, Renguejo AM** (2002) *Alimentos funcionales nuevas tendencias*. En Alimentos Funcionales. Probióticos, Ed. Médica Panamericana. pp. 1-8. Madrid, España.
- SAS/STAT** (2000) *Guide for personal computers*. Version 8. Statistical Analysis System (SAS) Institute In Compani. Cary electronic version available on CD.

Stanton C, Gardiner G, Meehan H, Collins K, Fitzgerald G, Lynch PB, Ross RP (2001) Market potential for probiotics. *Amer. J. Clin. Nutr.* 73: 476-483.

Zamora VR (2011) *Elaboración de un alimento funcional a base de*

Saccharomyces boulardii e inulina. Tesis de Maestría. Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional Unidad Michoacán. Instituto Politécnico Nacional. Jiquilpan, Mich., México.