

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
“ANTONIO NARRO”**

DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL

DEPARTAMENTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS



**USO DEL RESIDUO DE INDUSTRIAS LÁCTEAS (SUERO LÁCTEO
DE VACA) PARA LA PROPAGACIÓN DE MICROORGANISMOS
PROBIÓTICOS.**

POR:

NAYELI DEL ROSARIO MONZÓN TOLEDO

T E S I S

**Presentada como requisito parcial para
Obtener el título de:**

INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México.
Diciembre de 2010.

El presente trabajo de investigación ha sido desarrollado en el marco de las actividades comprometidas en el proyecto **“Caracterización genética y molecular de cepas probióticas mexicanas con actividad antimicrobiana para el desarrollo de productos para la salud humana y animal”** con Clave 110020, elaborado en el programa de cooperación entre la empresa GBS Global S.A. de C.V. y la universidad UAAAN.

Los evaluadores de esta investigación fueron los siguientes:

Dr. Mario Alberto Cruz Hernández

Dr. Antonio Francisco Aguilera Carbó

Dr. Heliodoro de la Garza Toledo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA

“ANTONIO NARRO”

DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL

DEPARTAMENTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

**USO DEL RESIDUO DE INDUSTRIAS LÁCTEAS (SUERO LÁCTEO DE VACA)
PARA LA PROPAGACIÓN DE MICROORGANISMOS PROBIOTICOS**

TESIS:

Que se somete a consideración del H. Jurado examinador como requisito parcial
para obtener el título de:

INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Presentado por:

NAYELI DEL ROSARIO MONZÓN TOLEDO

El presente trabajo ha sido evaluado y aprobado por el siguiente comité:

Dr. Mario A. Cruz Hernández
ASESOR PRINCIPAL

DR. Antonio Francisco Aguilera Carbó
VOCAL I

Dr. Heliodoro de la Garza Toledo
VOCAL II

M.C. Lorenzo Suárez García
COORDINADOR INTERINO DE LA DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL

Universidad Autónoma Agraria
“ANTONIO NARRO”



Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. Diciembre de 2010.

COORDINACION DE
CIENCIA ANIMAL

AGRADECIMIENTOS

En toda la experiencia universitaria y la conclusión del trabajo de tesis, ha habido personas que merecen las gracias porque sin su valiosa aportación no hubiera sido posible este trabajo y también hay quienes las merecen por haber plasmado su huella en mi camino.

ADIOS Por haberme dado sabiduría, fortaleza, salud, coraje y no dejarme sola en los momentos difíciles y haberme permitido llegar a la meta en este gran proyecto.

A mi Alma Terra Mater por permitirme construirme como profesionista.

A mis asesores de tesis: un agradecimiento especial al Dr. Mario Alberto Cruz Hernández por la colaboración, paciencia, y apoyo brindado; al Dr. Antonio Francisco Aguilera Carbó por su disponibilidad, y orientación que me brindó; Al Dr. Heliodoro de la Garza Toledo, por su colaboración incondicional en la realización de este proyecto.

A todos mis profesores del departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos, que participaron en mi desarrollo profesional durante mi carrera, sin su ayuda y conocimientos no estaría en donde me encuentro ahora: M.C. Xochitl Rúelas Chacón, Q.F.B. Oscar Noé Reboloso Padilla, Líc. Laura Olivia Fuentes Lara, Q.F.B. Carmen Julia, Dra. Ana Verónica Charles, M.C. María Hernández.

A CEMAP y las personas que ahí laboran que con su valioso apoyo fue posible la realización de este trabajo: a Marce, Diana Llera, Diana Morales, catí, Ismael. Por todos los conocimientos que compartieron conmigo y por sus tiempos dedicado en este trabajo de investigación.

Agradecer hoy y siempre a mi familia por el esfuerzo realizado por ellos. El apoyo en mis estudios, de ser así no hubiese sido posible. A mis padres y demás familiares ya que me brindan el apoyo, la alegría y me dan la fortaleza necesaria para seguir adelante.

DEDICATORIAS

Son muchas las personas especiales a las que me gustaría agradecer su amistad, apoyo, ánimo y compañía en las diferentes etapas de mi vida. Algunas están aquí conmigo y otras en mis recuerdos y en el corazón. Sin importar en dónde estén o si algunas vez llegan a leer estas dedicatorias quiero darles las gracias por formar parte de mí, por todo lo que me han brindado y por todas sus bendiciones.

A Mis padres Alberico Monzón y Araceli Toledo, con infinito amor y respeto por su comprensión, sacrificio, apoyo moral que me ha brindado en todos los pasos de mi vida, y por sacrificarse tantos años para poder ver la culminación de mi objetivo profesional.

A mis hermanos Eder y Héctor Por apoyarme en todo momento, me siento muy orgullosa de tenerlos como hermanos, gracias por creer en mí y los logros que obtenga serán logros que por ustedes conquistare. Gracias por existir en mi vida, los amo.

A mis sobrinos Jasiel y Zurí por ser lo más inocente, amoroso y bello que me ha dado dios, por darme la dicha de compartir momentos inolvidables y porque ustedes forman parte de mi alegría. **A mi cuñada Mari** gracias por estar siempre conmigo por convertirte en mi amiga, porque sabes escuchar y brindar ayuda cuando es necesario.

A mi novío, muchas gracias por haberme apoyado, por haber sido el ángel de mi guarda en todo momento. por ser el que siempre me da ánimos y me hace sonreír, por ser el que siempre me ayuda a crecer emocionalmente, gracias mi vida por demostrarme que a pesar de que hubieron derrotas, la batalla no estaba perdida, pero sobre todo Gracias por darme ese Amor incondicional esta meta te la dedico con todo mi corazón... **TE AMO**
Luis.

A mi amiga Lili por se mi gran amiga quien me acompaño en toda la carrera universitaria, compartiendo grandes momentos y recuerdos y brindándome todo su apoyo.

A mis amigos zootecnistas Hugo, Abdiel, Tancho, Tino, Toño, Chuy, porque siempre he contado con su apoyo, comprensión y cariño.

A mis compañeros y amigos de generación Dalía, Yari, Tania, Juanita, Elvía, Toñita, Vale, Alfredo, Diego, Benja, Juan, Eric, por compartir momentos inolvidables en el transcurso de la carrera, gracias por brindarme su amistad. Gracias a cada uno por hacer que mi estancia en la Narro fuera súper divertida.

A los bichos raros Omegar, Daniel, Pifo, Abraham y Juanito, muchas gracias por estar conmigo en todo este tiempo donde hemos vivido momentos felices y triste, gracias por ser mis amigos y recuerden que siempre los llevaré en mi corazón.

A mis paisanos Cintía, Juani, José, Ali, Lema, Pichi Javi, Chevo, Diego, Carlitos, porque formamos una valiosa amistad que durará para siempre, he contado con ustedes aunque hemos tomado caminos diferentes, siempre las tengo presentes.

A la familia Saucedo Tobias, gracias por su cariño y permitirme compartir, como un miembro más de su familia

En general quisiera dedicar a todas y cada una de las personas que han vivido conmigo la realización de esta etapa de mi vida, y que no necesito nombrar porque tanto ellas como yo sabemos que desde los más profundo de mi corazón les agradezco el haberme brindado todo el apoyo, colaboración, ánimo y sobre todo cariño y amistad.

Y por último: deseo dedicar este momento tan importante e inolvidable; a mí misma, por no dejarme vencer, ya que en ocasiones el principal obstáculo se encuentra dentro de uno.

INDICE DE CONTENIDO

	Pág.
ÍNDICE DE CUADROS	I
ÍNDICE DE FIGURAS	II
RESUMEN	III
CAPITULO 1	1
1.1 INTRODUCCION.....	1
1.2 OBJETIVOS	3
1.2.1 Objetivo general	3
1.2.2 Objetivos específicos.....	3
1.3 HIPOTESIS	3
1.4 JUSTIFICACIÓN	4
CAPITULO 2	5
REVISIÓN DE LITERATURA	5
2.1 ALIMENTOS FUNCIONALES	5
2.1.1 Características del alimento funcional.....	5
2.1.2 Clasificación de los alimentos funcionales	7
2.2 PROBIOTICOS.....	10
2.2.1 Propiedades de un probiótico	10
2.2.2 Microorganismos probióticos	11
2.2.3 Probióticos en alimentos	12
2.2.4 Tipos de probióticos	13
2.3 LECHE.....	14

2.3.1 Definición	15
2.3.2 Valor nutritivo	15
2.3.3 Derivados de la leche.....	16
2.3.4 Producción de leche y lactosuero	17
2.4 SUERO DE LECHE	18
2.4.1 Definición	18
2.4.2 Tipos de suero	18
2.4.3 Composición	19
2.4.4 Alternativas de tratamiento	19
2.5 BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS	21
2.5.1 Principales grupos.....	22
2.5.2 Bacterias lácticas probióticas	23
2.5.3 Cultivos iniciadores para la industria láctea.	24
2.6 MEDIOS DE CULTIVO	25
2.7 CULTIVO DE MICROORGANISMOS.....	25
2.7.1 Crecimiento microbiano en medio líquido	25
2.7.2 Crecimiento microbiano en medio sólido	26
CAPITULO 3	28
MATERIALES Y MÉTODOS	28
3.1 Obtención de la muestra.....	28
3.2 Medición de pH de las muestras	28
3.3 Análisis físico-químicos del suero.....	28
3.3.1 Análisis físico-químico de grasa.....	29

3.3.2	Análisis físico-químico de acidez	29
3.3.3	Análisis físico-químico de proteína	29
3.3.4	Análisis físico-químico de densidad	30
3.3.5	Análisis físico-químico de sólidos no grasos	30
3.3.6	Análisis físico-químico de sólidos totales	30
3.3.7	Análisis físico-químico de determinación de lactosa	30
ETAPA I. PURIFICACIÓN		30
3.4.	Adaptación de reactores para crear condiciones de anaerobiosis	30
3.4.1	Cultivo en medio líquido	31
3.4.2	Cultivo en medio sólido	32
3.5	Purificación cepas probióticas	33
3.5.1	Caracterización morfológica	33
3.6	Conservación de las cepas	34
ETAPA 2. SELECCIÓN DE LAS CEPAS PROBIÓTICAS		34
3.7	Preparación del inóculo	34
3.7.1	Selección de las cepas en suero lácteo de vaca	34
ETAPA 3. PRODUCCIÓN EN MEDIOS		35
3.8	Desarrollo de medios de cultivo	35
3.8.1	Preparación del medio de cultivo 1	35
3.8.2	Preparación del medio de cultivo 2	36
3.8.3	Preparación del medio de cultivo 3	37
3.9	Microorganismos evaluados	37
3.10	Determinación de cinética de crecimiento	38

3.10.1 Determinaciones de biomasa.....	38
3.10.2 Determinación de la viabilidad celular.....	38
3.10.3 Producción de ácido láctico	39
CAPITULO 4	40
RESULTADOS Y DISCUSIONES	40
4.1 Análisis físico-químico del suero	40
ETAPA 1. PURIFICACIÓN DE CEPAS PROBIÓTICAS.....	41
4.2 Purificación de cepas probióticas	41
4.3 Conservación de cepas probióticas.....	44
ETAPA 2. SELECCIÓN DE LAS CEPAS PROBIÓTICAS EN SUERO DE VACA	45
4.4 Selección de las cepas en suero de vaca.....	45
ETAPA 3. PRODUCCIÓN EN MEDIOS	47
4.5 Desarrollo en medios de cultivo.....	47
4.6 Resultados de cinéticas de crecimiento.....	48
4.6.1 Cinética de crecimiento de cultivo 1	48
4.6.2 Cinética de crecimiento del cultivo 2	49
4.6.3 Cinética de crecimiento del cultivo 3	50
4.7 Determinación de cinética de crecimiento	51
4.7.1 Comparación de producción de biomasa en los 3 medios.....	52
4.7.2 Comparación de determinaciones de viabilidad celular en los 3 medios	53
4.7.3 Comparación de producción de ácido láctico en los 3 medios.....	54
CAPITULO 5	55

CONCLUSIONES.....	55
CAPITULO 7	56
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	56
CAPITULO 8	60
ANEXOS	60

ÍNDICE DE CUADROS

	Pág.
Cuadro 1. Ejemplos de componentes funcionales	8
Cuadro 2. Microorganismos usados como probióticos	111
Cuadro 3. Composición del lactosuero fresco	19
Cuadro 4. Composición del Medio de Cultivo líquido	31
Cuadro 5. Composición del medio de cultivo sólido	32
Cuadro 6. Composición del medio de cultivo 1.....	35
Cuadro 7. Composición del Medio de Cultivo 2.....	36
Cuadro 8. Composición del Medio de Cultivo 3.....	37
Cuadro 9. Caracterización fisicoquímica del lactosuero	40
Cuadro 10. Características morfológicas de las cepas probióticas pertenecientes al banco de microorganismos de CEMAP.....	42
Cuadro 11. Comparación de los resultados obtenidos de biomasa, ácido láctico y viabilidad celular.	51

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura1. Preparación del medio líquido MRS	32
Figura 2. Fotografía de los microorganismos probióticos purificados.A) Tabasco, B) Alfalfa, C) leche, D) 02-1, E) manzana, F) sotol filtrado.	43
Figura 3. Fotografía de las cepas conservadas.....	45
Figura 4. Evaluación del crecimiento de los probióticos en suero de vaca.....	46
Figura 5. Crecimiento de la cepa de (A) jocoque y la cepa de M2 (B) en suero de vaca.....	46
Figura 6. Medios de cultivo.....	47
Figura 7. Cinética de crecimiento del cultivo 1	48
Figura 8. Cinética de crecimiento del cultivo 2	49
Figura 9. Cinética de crecimiento del cultivo 3	50
Figura 10. Evaluación de producción de biomasa.....	52
Figura 11. Crecimiento de los probióticos en los medio de cultivo.	53
Figura 12. Resultados de producción de ácido láctico	54

RESUMEN

La contaminación ambiental producida por la disposición del suero resultante de la industria láctea motiva a la continua búsqueda de tecnologías efectivas que permitan el aprovechamiento de este subproducto. El bajo costo de obtención, y el escaso aprovechamiento industrial del suero lácteo abren una nueva alternativa para la utilización de este deshecho. En el presente trabajo se pretende desarrollar 3 medios de cultivo que tengan como base el uso del suero lácteo de vaca para la producción de microorganismos probióticos.

Para lo cual se evaluaron las cepas probióticas pertenecientes a la colección del centro de microbiología aplicada (CEMAP), para poder seleccionar las que presenten una mejor adaptación a estos medios desarrollados. En la primera etapa las cepas fueron reactivadas para su posterior, purificación e identificación utilizando Agar MRS incubado a 37° C durante 12 h en condiciones de anaerobiosis. Posteriormente se realizó la conservación de las cepas utilizando 2 métodos, uno a mediano y otro de largo plazo (crio-protección y liofilización). Una vez purificadas las cepas, se utilizaron tres medios de cultivo con el fin de seleccionar el de mayor productividad celular, determinando para cada cultivo producción de ácido láctico, biomasa y UFC/mL.

De las cepas evaluadas en este estudio, la que presentó mayor capacidad de adaptación al suero de vaca como substrato, fue la cepa identificada como Tabasco. Esta cepa evaluada en los medios de cultivo desarrollados obtuvo la mayor producción en el cultivo 3 con 6.24×10^8 UFC/mL, biomasa de 10.4 g/L y una producción de ácido láctico 14 g/L, a 48 horas de fermentación. Por lo tanto los resultados obtenidos muestran la posibilidad de utilizar el residuo industrial (suero lácteo de vaca) como medio de cultivo para los microorganismos probióticos y así tener un menor costo económico en la preparación del sustrato.

Palabras claves: probióticos, suero de leche de vaca, propagación

1.1 INTRODUCCION

En los últimos años, la población ha modificado sus patrones alimenticios, mostrando gran interés por consumir alimentos que, además de su valor nutricional, ofrecen ciertos beneficios para la salud.

En este contexto, han surgido los llamados alimentos funcionales, considerados como aquellos que, además de aportar los nutrientes recomendados, ejercen efectos beneficiosos sobre una o más funciones del organismo, fomentando la salud y reduciendo el riesgo de enfermedad.

Los probióticos constituyen uno de los subgrupos más destacados dentro de los alimentos funcionales. Son productos que contienen microorganismos definidos y viables en grado suficiente para modificar la microflora de un compartimento del huésped, ejerciendo así un efecto beneficioso sobre la salud de éste (García, 2005).

En la actualidad, todavía se desconocen muchos aspectos relativos a sus mecanismos de acción; sin embargo, se reconoce su funcionalidad en: a) la prevención y el tratamiento de trastornos gastrointestinales de diversa etiología; b) la reducción de la intolerancia a la lactosa; c) la modulación de la respuesta inmunitaria, y d) la reducción de los valores de colesterol. Los principales probióticos son las bacterias integrantes de los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, que son comensales del tracto gastrointestinal del humano y que han sido, tradicionalmente, utilizadas en diversas fermentaciones alimentarias (Sanz, 2003).

Hoy en día, los yogures y otras leches fermentadas constituyen los principales vehículos para el aporte de probióticos, ya que, además de las propiedades funcionales de las bacterias inoculadas, estos alimentos tienen gran aceptación en los distintos grupos de población y son fáciles de digerir (Sanz, 2003)

La leche es uno de los alimentos más nutritivos puesto que tiene un alto contenido de proteínas de alta calidad que proporcionan los diez aminoácidos esenciales.

La leche contribuye a la ingesta calórica diaria total, como también, aporta ácidos grasos esenciales, inmunoglobulinas, y otros micronutrientes.

La leche se consume también en formas fermentadas como el queso, yogur, kefir, y suero de leche, así como mantequilla (Veisseyre, 1991).

El suero de leche es el subproducto más abundante de la industria láctea, es el residual obtenido de la manufactura del queso. Este subproducto es de difícil aceptación en el mercado, ya que sus características no lo hacen apto para su comercialización directa como suero líquido. Debido a esto, el lacto suero se trata mediante técnicas que permiten la extracción de sus componentes, tales como: la lactosa (3,3 6,0%) y proteínas (0,32 - 0,7%), que constituyen fuentes potenciales para la alimentación humana; sin embargo, solo una parte del suero se utiliza para estos fines, ya que la mayor parte del lacto suero se convierte en un efluente altamente contaminante cuando se vierte a los cuerpos de agua, debido a su gran demanda biológica y química de oxígeno(Urribarrí, 2004).

Por lo tanto el suero lácteo de vaca es un excelente medio de cultivo, y es por eso que se puede utilizar como sustrato para la producción de un buen número de productos obtenidos a través de fermentación. Además, la posibilidad de transformar la lactosa en ácido láctico mediante una primera fermentación, y en una segunda, utilizar este metabolito como fuente de carbono para otros procesos. La evaluación de las cepas que pertenecen a la colección de microorganismos probióticos, de la empresa GBS Global S.A. de C.V. en estos medios alternativos permitiría a dicha empresa reducir los costos de producción en la biomasa de microorganismos probióticos, así como, generar metabolitos secundarios a partir de este deshecho lo que le da un alto valor agregado manteniéndose en la generación de procesos sustentables.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo general

- ② Evaluar el uso del residuo industrial (suero lácteo de vaca) como medio de cultivo para la propagación de los microorganismos probióticos de la colección de la empresa GBS Global S.A. de C.V., mediante cinéticas de producción de biomasa y ácido láctico.

1.2.2 Objetivos específicos

- ② Purificar y caracterizar microscópicamente las 19 cepas de microorganismos probióticos pertenecientes a la colección de centro de microbiología aplicada,
- ② Realizar una conservación adecuada de las 19 cepas utilizando métodos de conservación a largo y mediano plazo.
- ② Evaluar la producción de las cepas probióticas en tres medios de cultivo alternativos variando la relación C: N.
- ② Evaluar cinéticamente la producción de biomasa, ácido láctico y UFC/mL de la cepa seleccionada en tres medios de cultivos diseñados.

1.3 HIPOTESIS

Es posible utilizar el residuo industrial (suero lácteo de vaca) como medio de cultivo para la propagación de los microorganismos probióticos.

1.4 JUSTIFICACIÓN

Los probióticos son usados en una gran variedad de productos, incluyendo farmacéuticos, alimentos para humanos y animales, as también como promotores de la salud y la inocuidad alimentaria.

Aunque el empleo de los probióticos es muy diverso, solamente existen medios comerciales de cultivo orientados a su aislamiento e identificación. Son escasos los estudios sobre el aprovechamiento de fuentes naturales para la obtención de biomasa bacteriana. Las fuentes naturales solo han sido aprovechadas en la formulación de medios para el aislamiento de hongos; el uso de medios naturales como plátano, avena, leche y jugo V8 para el crecimiento e identificación de hongos de interés médico se ha reportado.

Por otra parte, las fuentes naturales como el suero lácteo de vaca, constituyen un desecho contaminante de la elaboración de quesos.

Ésta fuentes es abundantes y disponibles en la región, lo que proporciona un sustrato de fácil obtención y de bajo costo en la producción de biomasa probiótica; además, su uso daría valor agregado a este desecho de la industria quesera y contribuirá a disminuir la contaminación generada por el suero de queso.

REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 ALIMENTOS FUNCIONALES

El término de alimentos funcionales (AF) nació en Japón hace más de 10 años debido a que el promedio de edad aumentaba y por la necesidad de prevención de enfermedades, se enriquecieron los alimentos de tal forma de darle un valor agregado a la comida.

Un AF se define como aquel que «está demostrado suficientemente que actúa beneficiosamente sobre una o más funciones del cuerpo, más allá de su efecto nutricional, mejorando la salud y el bienestar y/o reduciendo el riesgo de enfermedad».

Puede ser un alimento natural, un alimento al que se ha añadido, eliminado o modificado un componente por medios biotecnológicos, un alimento en el que se ha modificado la biodisponibilidad de uno o más de sus componentes o una combinación de cualquiera de estas posibilidades (Ferrer y Dalmau, 2007).

Su rango de beneficios va desde ácidos, grasas y otros componentes encontrados en alimentos tales como aguacates, jitomates o granos de cocoa, o productos fabricados que se les han agregado elementos funcionales, por ejemplo a yogures, leche y jugos (Chasquibol, 2003).

2.1.1 Características del alimento funcional

Los “alimentos funcionales” ejercen un efecto positivo sobre la salud o sobre una función fisiológica que se deriva de la presencia de ingredientes que son componentes naturales o que forman parte de la formulación del producto.

Los “alimentos funcionales” se diferencian claramente de otros productos farmacéuticos o para farmacéuticos en función de la naturaleza del beneficio que ejercen y del modo de administración (Ferrer, 2007).

Japón fue el primer país que estableció una base legal que especifica las características que debe tener un alimento para ser calificado de funcional:

1.- El alimento debe ejercer un efecto positivo sobre la salud o sobre una función fisiológica. Hemos de precisar que, recientemente, en el documento de consenso de la Unión Europea (FUFOSE, 1999) se determinan dos tipos de efectos: mejora del estado de salud y bienestar y/o disminución del riesgo de enfermedad.

2.- Los beneficios nutricionales y saludables de los alimentos o de los ingredientes específicos deben fundamentarse en una sólida base científica.

3.- La cantidad apropiada de ingesta diaria del alimento o del ingrediente debe ser establecida por expertos.

4.- El alimento, o el ingrediente, no debe resultar nocivo si se ingiere por encima de la ingesta recomendada.

5.- El ingrediente debe estar caracterizado por:

a) Sus propiedades físicas y químicas, valoradas a través de métodos analíticos detallados.

b) Su presencia cualitativa y cuantitativa en el alimento.

6.- El ingrediente no debe reducir el valor nutritivo del alimento.

7.- El alimento debe ser administrado como tal, de una manera convencional, nunca en forma de tabletas, cápsulas o polvos.

8.- El ingrediente debe ser un compuesto natural. De un modo general, se pueden describir tres condiciones que definen el carácter “funcional” de un alimento:

a) Ha de responder a las características de un alimento.

b) Siempre debe ser consumido formando parte de la elaboración de los platos que integran los menús de las dietas alimenticias.

c) El alimento debe ejercer, una vez ingerido, un efecto positivo sobre una determinada función fisiológica (Barró, 2002).

2.1.2 Clasificación de los alimentos funcionales

Los alimentos funcionales son una parte importante del bienestar en el que se incluye una dieta equilibrada y actividad física. Se debería de consumir una amplia variedad de estos alimentos que incluyan algunos de los siguientes componentes: caratenoides, fibra dietética, ácidos grasos, flavonoides, isotiacianatos, fenoles, estanoles, polioles, probióticos, prebióticos, fitoestrógenos y proteína de soya (IFEC, 2004).

Los alimentos funcionales pueden ser diseñados añadiendo componentes funcionales para dirigir una acción benéfica en particular, en el cuadro 1 se muestra algunos ejemplos de componentes funcionales usados en la alimentación

Cuadro 1. Ejemplos de componentes funcionales

Componentes	Fuente	Beneficio potencial
Carotenoides	Acelga, espinaca, maíz, huevos, cítricos	Neutraliza la acción de los radicales libres que pueden dañar las células, fortalece las defensas antioxidantes de las células.
Fibra dietética	Salvado de avena, avena enrollada, harina de avena.	Puede reducir el riesgo de padecer enfermedades coronarias, puede contribuir al mantenimiento de la salud del tracto digestivo.
Ácidos grasos poliinsaturados –Omega-3	Avellanas, linaza	Puede contribuir al mantenimiento de las funciones mentales y visuales.
Flavonoides	Moras, cerezas y uvas rojas, té cacao, chocolate, manzanas, alimentos cítricos.	Fortalece las defensas antioxidantes de las células, puede contribuir al mantenimiento de la función cerebral
Probióticos	Yogurt, otros productos lácteos y no lácteos.	Puede mejorar la salud gastrointestinal, puede mejorar la absorción del calcio, puede mejorar la salud gastrointestinal y la inmunidad sistémica.
Proteína de soya	Frijol de soya y alimentos a base de soya.	Pueden reducir el riesgo de enfermedades cardiovasculares.

Fuente: Council (IFEC), 2004

La idea de los alimentos funcionales fue desarrollada en Japón durante la década de los 80's. Según Vasconcelos en el 2002, clasificó a los "alimentos funcionales" en tres categorías:

1. **Alimentos enriquecidos, adicionados, fortificados:** estos están pensados para aminorar de alguna manera las carencias nutritivas más comunes como la falta de calcio, de hierro, insuficiente aporte de yodo, por ejemplo la sal enriquecida con yodo.

2. **Los alimentos probióticos.** Estos alimentos contienen abundantes microorganismos vivos del mismo tipo de los que habitan en el intestino, ellos desarrollan un papel funcional para la salud del organismo. Entre sus propiedades importantes están las de interactuar con el sistema inmune para crear importantes barreras contra el desarrollo de virus y gérmenes, causan acciones de defensa y degradación de sustancias tóxicas. Por ejemplo, los *lactobacillus* presentes en el yogurt, los cuales tienen la función de mejorar el tránsito gastrointestinal.

3. **Los alimentos prebióticos.** son sustancias no digeribles y que resultan fermentables y que por lo tanto ayudan al desarrollo selectivo de algunas cepas bacterianas específicas, son ejemplos de estos: almidón, inulina, fibras dietéticas que pueden ser añadidos a los alimentos y bebidas.

4. **Las combinaciones de alimentos.** En esta clasificación entran los alimentos que al momento de cocinarlos se combinan con otros ingredientes aumentando el valor nutricional y funcional de la comida, por ejemplo: frijoles con epazote aportan vitamina K, espinacas con limón que además de aportar más vitamina C, hace que el hierro de la espinaca sea más asimilable, etc. (Sarmiento, 2006).

2.2 PROBIOTICOS

En años recientes, la población ha mostrado gran interés por modificar sus hábitos alimenticios, aumentando el consumo de alimentos benéficos para la salud. Entre las opciones saludables más populares se encuentran, los alimentos probióticos.

La OMS define a los probióticos como microorganismos vivos que administrados en cantidades adecuadas ejercen un efecto beneficioso sobre la salud del hospedador. Para que las bacterias puedan considerarse como probióticos es necesario que cumplan las siguientes características:

- Ser de origen humano ya que las cepas aisladas de seres humanos sanos presentan mayor facilidad para colonizar el intestino humano y probablemente no sean patógenas, habiéndose utilizado para definir esta característica el acrónimo inglés “GRAS” (“generally recognized as safe)
- Deben poseer tolerancia a las condiciones ambientales, ya que los microorganismos probióticos han de llegar viables al lugar de acción (Amores y Calvo, 2004).

2.2.1 Propiedades de un probiótico

Para considerar una especie de bacteria como probiótica, ella debe reunir una serie de características, como son: en primer lugar, no ser patógenas y no transmitir resistencia bacteriana, lo cual tiene que estar muy bien documentado; preferentemente deben ser un habitante normal del intestino, lo cual le asegura resistencia a las condiciones del medio, como por ejemplo, tener capacidad de resistir los ácidos gástricos y la bilis, además, propiedad de adherirse al epitelio intestinal, lo que se asocia a su persistencia en el ambiente intestinal; cuando esto no es así, su consumo recurrente puede asegurar su permanencia por mantenerse en tránsito; lo ideal es que sean capaces de colonizar y establecerse el tracto digestivo, capaces de crecer rápidamente y poder dominar por exclusión competitiva a otros microorganismos en el tracto intestinal.

Por otra parte, deben producir sustancias con capacidad antimicrobiana, además, mantener viabilidad durante los cultivos, procesos, sobre el producto y durante su almacenamiento. Finalmente y muy importante, deben desarrollar efectos beneficiosos sobre el hospedero (Naidu, *et al.*, 1999).

2.2.2 Microorganismos probióticos

Entre los microorganismos comúnmente empleados como probióticos se encuentran las bacterias ácido-lácticas, que agrupan una gran cantidad de géneros que incluyen un considerable número de especies. Las cepas utilizadas generalmente pertenecen a especies de los géneros *Lactobacillus*, *Enterococcus* y *Bifidobacterium* (ver cuadro 2) (Salminen *et al.* 1998).

Cuadro 2. Microorganismos usados como probióticos

<i>Lactobacillus</i> spp.	<i>Bifidobacterium</i> spp.	<i>Lactococcus</i> spp.	<i>Streptococcus</i> 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>	
<i>L.bulgaricus</i>	<i>B.breve</i>	<i>L.diacetylactis</i>	
<i>L.casei</i>	<i>B.lactis/animalis</i>		
<i>L.kefir</i>	<i>B.adolescentis</i>		
<i>L.brevis</i>			
<i>L.reuteri</i>			
<i>L.helveticus</i>			
<i>L.plantarum</i>			
<i>L.salivarius</i>			
<i>L.johnsonii</i>			
Otras especies			
<i>Enterococcus</i> spp.	<i>Bacillus</i> spp.		<i>Saccharomyces</i> <i>cerevisiae</i>
<i>E.faecium</i>	<i>B.subtilis</i>		<i>Saccharomyces</i> <i>boulandii</i>
<i>E.faecalis</i>	<i>B.coagulans</i>		<i>Leuconostoc</i> spp.

Estas bacterias son empleadas en la elaboración de productos lácteos fermentados, entre los que se incluyen los yogures, los cuales son comercializados con el slogan de que «generan un balance de la flora intestinal».

Las *Bifidobacterias* son habitantes normales en el tracto intestinal, generalmente se encuentran en cantidades superiores a 10 por cada gramo de contenido intestinal, comprenden cerca del 25% de la microflora, sin embargo la cantidad de bacterias va disminuyendo con la edad (Zavala, 2005).

Caracterizadas generalmente como Gram-positivas, existen alrededor de 30 especies incluidas en el género *Bifidobacterium*, que fueron aisladas de fuentes humanas (caries dental, heces fecales y vagina).

Los *Lactobacillus* son bacterias Gram-positivas, son microorganismos anaerobios y estrictamente fermentativos. En la actualidad se conocen 56 especies del género *Lactobacillus* distribuidas en varios nichos ecológicos como son el tracto gastrointestinal y el tracto genital y constituyen parte importante de la microflora endógena del humano.

Su distribución se ve afectada por varios factores ambientales, los cuales incluyen pH, disponibilidad de oxígeno, nivel de sustratos específicos, presencia de secreciones e interacción bacteriana (Zúñiga, 2003).

2.2.3 Probióticos en alimentos

En la actualidad se han desarrollado un sin número de productos sobre la base de la incorporación de estas bacterias, que incluyen presentaciones muy variadas, que van desde alimentos como los lácteos (yogurt, leches fermentadas, quesos y helados) además, frutas, jugos, postres, hasta suplementos dietéticos diversos.

La incorporación puede ser bajo la modalidad de cepas simples hasta múltiples y algunas veces adicionalmente combinadas con elementos o sustancias con carácter prebiótico ("Ingredientes no digeribles que afectan beneficiosamente al organismo mediante la estimulación del crecimiento y actividad de cepas de bacterias específicas en el colon"); ello puede realizarse bajo técnicas muy diversas: simple agregado al producto, o buscando un medio de protección a los microorganismos como en el caso de micro encapsulación en una matriz variable (carragenina, alginato, gomas, etc.) o por impregnación al vacío en sustratos con estructura sólida poroso manteniendo su frescura y apariencia (Martínez, 2007).

2.2.4 Tipos de probióticos

Existen diferentes grupos de probióticos y hay grandes diferencias entre ellos.

- Probióticos naturales: Están presentes en la alimentación de todos los días. En forma natural, los probióticos se encuentran en lácteos fermentados como yogures, leche y quesos; vegetales fermentados -aceitunas, chucrut, soya, cereales-; productos cárneos y pescados fermentados; y bebidas alcohólicas artesanales (no destiladas). Sin embargo, se requieren estudios científicos que garanticen la existencia de cepas probióticas entre la microflora láctica silvestre de los alimentos.

- Probióticos comercializados: Durante años, distintas poblaciones han consumido probióticos naturales en su dieta. La industria tomó nota de esta realidad y comenzó a comercializar los productos que contenían probióticos haciendo foco en ello. Es algo similar a lo que sucede con las formulaciones para lactantes, que tratan de emular la leche materna con el objetivo de generar el desarrollo de una microflora intestinal benéfica, como la leche Nan 2 de Nestlé.

- Suplementos alimenticios que contienen probióticos: Se trata de suplementos dietarios que contienen probióticos en forma de cápsulas o en polvo. No es un medicamento y su distribución se rige por las leyes de los alimentos.

- Productos medicinales o agentes bioterapéuticos: Es un probiótico con un efecto terapéutico probado; es decir, es un medicamento. El uso de probióticos en medicina se conoce también con el nombre de “bioterapia”. Los agentes bioterapéuticos son microorganismos que tienen un efecto demostrado. Para ser eficaces deben:

- Ser resistentes a la gran mayoría de los antibióticos que se usan comúnmente.
- Tener efectos terapéuticos inmediatos.
- Tener efectos múltiples: inhibición de la adhesión de los patógenos, efectos de inmunomodulación, competencia con las toxinas por los receptores de éstas y, por supuesto, competencia por los nutrientes.

*Un ejemplo de probiótico como agente bioterapéutico es Bioflora. Este contiene *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Streptococcus faecalis* y *Bifidobacterium brevis*, la cual actúa restableciendo el equilibrio de la flora intestinal. Está indicado para inflamaciones intestinales, encefalopatía hepática e intolerancia a la lactosa. Culturelle es un Suplemento Probiótico que contiene *Lactobacillus GG*, para mantener las defensas naturales del organismo (Mafart, 2007).

2.3 LECHE

La leche puede provenir de varios mamíferos que se explotan para autoconsumo o comercialmente. En orden decreciente de importancia se tiene a la vaca, la cabra, la oveja, la búfala de agua, la yak, la yegua y hembra del reno.

Por su importancia nutricional y económica, histórica y actual, la leche que más se ha estudiado y que se conoce mejor es la de vaca. Es frecuente, entonces, que cuando se habla de la leche en la jerga técnica, comercial o de la vida cotidiana se aluda a la leche de vaca, a menos que se precise el nombre de la especie de donde proviene (Zavala, 2005).

2.3.1 Definición

Definición biológica.

Leche es el producto secretado por los mamíferos hembras para la alimentación de sus crías durante las primeras etapas de su crecimiento.

Definición legal

Leche es el producto íntegro y fresco de la ordeña completa que procede de una o más vacas bien alimentadas, sanas y en reposo, exento de calostro y que cumpla con las características físicas, químicas y bacteriológicas que establece el código sanitario local.

Definición tecnológica

La leche es un sistema fluido muy complejo en el cual coexisten tres subsistemas fisicoquímicos bien definidos, en equilibrio dinámico, a saber: una emulsión aceite-agua (o/w), una suspensión coloidal proteica y una solución verdadera (Villegas, 2004).

2.3.2 Valor nutritivo

La composición de la leche determina su calidad nutritiva y varía en función de raza, alimentación, edad, periodo de lactación, época del año y sistema de ordeño de la vaca, entre otros factores. Su principal componente es el agua, seguido fundamentalmente por grasa (ácidos grasos saturados en mayor proporción y colesterol), proteínas (caseína, lactoalbúminas y lactoglobulinas) e hidratos de carbono (lactosa principalmente).

Así mismo, contiene moderadas cantidades de vitaminas (A, D, y vitaminas del grupo B, especialmente B2, B1, B6 y B12) y minerales (fósforo, calcio, zinc y magnesio) (Hernández, 2003).

2.3.3 Derivados de la leche

En México, el desarrollo de la industria lechera ha garantizado que al menos en los centros urbanos importantes la leche se consume ya pasteurizada. La ventaja de este método de desinfección es que suministra una leche pura, sin gérmenes patógenos en general y sin perder su riqueza vitamínica. Otras formas de presentación que tiene la leche son:

- La leche en polvo, que es sometida a un proceso de desecación y pulverización sin alterar su contenido vitamínico.
- La leche evaporada, que se esteriliza a elevadas temperaturas y también guarda su riqueza vitamínica.
- La leche condensada, preparada al vacío y de uso limitado casi a la repostería por su gran cantidad de azúcar.

Los derivados de la leche en nuestra alimentación cotidiana son la crema, los quesos y la mantequilla.

La crema concentra las grasas de la leche y, en mayor cantidad aún, la mantequilla, la cual se obtiene al aglomerarse los glóbulos grasos de la nata (Spreer, 1991).

Los quesos se preparan coagulando la leche más o menos desnatada mediante la aplicación del cuajo (en el comercio se vende en pastillas), que produce la separación de la caseína de la leche.

El queso es un alimento muy importante en nuestra dieta, ya sea consumido al natural o como parte de infinidad de platillos. Es buen estimulante de la digestión y facilita la asimilación de grasas y carbohidratos.

En México cada vez hay más variedad de quesos, debido a la influencia de la cocina internacional. En la cocina tradicional mexicana los más comunes son: el queso fresco, el añejo, el asadero, o tipo Oaxaca, y el Chihuahua, obviamente con todas las variaciones posibles y con el sello peculiar de cada región (Galván, 2005).

2.3.4 Producción de leche y lactosuero

La producción mundial de leche en el año 2006 fue de 420 mil millones de toneladas métricas, representando un incremento de 1.9% respecto del año anterior. El grupo de los 25 países que componen la Unión Europea aporta el 31% de la producción, le siguen los Estados Unidos con casi 83 millones de toneladas, con un 19% del total; Asia registra uno de los cambios más importantes destacándose China con un incremento del 19% en producción, mientras que conjuntamente con India van teniendo una participación creciente en el mundo, tal como lo demuestra el hecho de que aportan un 17% del total. Los países de Oceanía en conjunto presentan el 3%; con relación a América, Brasil es el mayor productor, con casi 25 millones de toneladas. En México, la producción es de 10,100 millones de toneladas (Gallardo, 2010).

En el Estado de Puebla existen 187 mil 962 cabezas de bovinos lecheros con una producción promedio diaria de leche de 1,221,449 litros y anual de 372.5 millones de litros, ocupando el décimo lugar de producción de nuestro país hasta diciembre de 2007.

El 30% se destina a la venta de acopiadores para la elaboración de quesos, otro 30% se consume como leche bronca, el 35% se vende a plantas de proceso a otros estados y sólo el 5% es industrializado por el propio productor.

Los países productores de queso y por ende de lactosuero más importantes son Estados Unidos, Francia, Alemania e Italia. La producción mundial anual de suero lácteo es de aproximadamente 145 millones de toneladas, de las cuales 6 millones son de lactosa.

El éxito de los productos lácteos y la obtención de nuevos productos ha aumentado la producción de lactosuero, la cual se incrementa año con año, situación de la que nuestro país no es la excepción.

El suero producido en México es de cerca de 1 millón de toneladas y contiene 50 mil toneladas de lactosa y 5 mil toneladas de proteína verdadera.

A pesar de esta riqueza nutricional, potencialmente utilizable, el 47% de lactosuero es descargado al drenaje y llega a ríos y suelos, causando un problema serio de contaminación. La descarga continua de suero en estos ecosistemas altera sus propiedades fisicoquímicas. En el caso de los suelos, disminuye el rendimiento de las cosechas, pero además se observa el fenómeno de lixiviación. Este fenómeno se presenta porque el lactosuero contiene nitrógeno soluble en agua, el cual es arrastrado a través de diversas capas llegando hasta los mantos freáticos y convirtiéndose en un peligro para la salud de los animales y humanos.

Una industria quesera media que produzca diariamente 40,000 litros de suero sin depurar genera una contaminación diaria similar a una población de 1,250,000 habitantes. Por ello es importante que las industrias lácteas utilice el lactosuero con el fin de no contaminar el ambiente (Gómez, 2007).

2.4 SUERO DE LECHE

2.4.1 Definición

El lactosuero es un líquido que se obtiene por la coagulación de la leche en la elaboración del queso, una vez que se separan la cuajada del queso (la caseína) y la grasa (Montañez, 2000).

2.4.2 Tipos de suero

Existen varios tipos de lactosuero dependiendo principalmente de la eliminación de la caseína, el primero denominado dulce, está basado en la coagulación por la renina a pH 6,5. El segundo llamado ácido resulta del proceso de fermentación o adición de ácidos orgánicos o ácidos minerales para coagular la caseína como en la elaboración de quesos frescos (Spreer, 1999).

En cualquiera de los dos tipos de lactosuero obtenidos, se estima que por cada kg de queso se producen 9 kg de lactosuero, esto representa cerca del 85-90% del volumen de la leche y contiene aproximadamente el 55% de sus nutrientes (Mena, 2003).

2.4.3 Composición

Entre los más abundantes de estos nutrientes están la lactosa (4,5-5% p/v), proteínas solubles (0,6-0,8% p/v), lípidos (0,4-0,5% p/v) y sales minerales (8-10% de extracto seco).

Presenta una cantidad rica de minerales donde sobresale el potasio, seguido del calcio, fósforo, sodio y magnesio. Cuenta también con vitaminas del grupo B (tiamina, ácido pantoténico, riboflavina, piridoxina, ácido nicotínico, cobalamina) y ácido ascórbico (Rico, 2005)

Cuadro 3. Composición del lactosuero fresco

	Suero dulce	Suero ácido
Agua	93-94%	94-95%
Proteínas	0.8-1%	0.8-1%
Grasa	0.2-0.7	0.04
Lactosa	4.5-5.0	3.8-4.2
Sales minerales	0.05	0.4
Acido láctico	4.5-5%	3.8-4.2%
Extracto seco	6-7%	5-6%
Acido cítrico	0.15%	0.1%
Cenizas	0.5-0.7%	0.7-0.8%
Valor de pH	6.45% Índice de SH 4	Alrededor de 5 (índice de SH 20-25)

2.4.4 Alternativas de tratamiento

El lactosuero es uno de los materiales más contaminantes que existen en la industria alimentaria. Cada 1,000 litros de lactosuero generan cerca de 35 kg de demanda biológica de oxígeno (DBO) y cerca de 68 kg de demanda química de oxígeno (DQO). Esta fuerza contaminante es equivalente a la de las aguas negras producidas en un día por 450 personas (Parra, 2008).

Más aún, no usar el lactosuero como alimento es un enorme desperdicio de nutrimentos; el lactosuero contiene un poco más del 25 % de las proteínas de la leche, cerca del 8 % de la materia grasa y cerca del 95 % de la lactosa. Como se mostró anteriormente, por lo menos el 50 % en peso de los nutrimentos de la leche se quedan en el lactosuero.

Los mismos 1,000 litros de lactosuero a los que nos referimos arriba contienen más de 9 kg de proteína de alto valor biológico, 50 kg de lactosa y 3 kg de grasa de leche. Esto es equivalente a los requerimientos diarios de proteína de cerca de 130 personas y a los requerimientos diarios de energía de más de 100 personas (Inda, 2000).

La capacidad contaminante y el valor nutritivo del lactosuero han llevado al desarrollo de tecnologías para su aprovechamiento. En Argentina se producen aproximadamente 450,000 toneladas de suero líquido por año, de los cuales el 62% es utilizado en la alimentación animal, el 33% es transformado como derivados de lactosa, caseínas, caseinatos y concentrados proteicos, el 4% se convierte en suero en polvo y sólo el 1% es tratado como efluente. En nuestro país no existen datos concretos de la utilización del suero, se estima que se aprovecha sólo cerca el 10%. Las alternativas de aprovechamiento del lactosuero pueden ser:

- **Procesos fermentativos.** El lactosuero puede ser utilizado como medio de cultivo para la producción de biomasa (proteína unicelular como la levadura para panificación), metabolitos (lípidos, pigmentos, alcoholes, ácidos orgánicos, biopolímeros) y enzimas.

En este medio la lactosa es la principal fuente de carbono para los microorganismos, incluso se ha utilizado para células vegetales. Además, el lactosuero suele emplearse para la conservación y propagación de cultivos lácticos o en la elaboración de bebidas fermentadas.

- **Elaboración de bebidas.** También se ha estudiado la elaboración de bebidas o fórmulas lácteas con valor nutritivo similar al de la leche y con características agradables al consumidor.

Estas bebidas tienen un gran potencial para utilizarse en programas gubernamentales dirigidos a la población de escasos recursos.

- **Producción de biofertilizantes.** Estos abonos además de nutrir eficientemente los cultivos, se convierten en un restaurador de la flora microbiana del ecosistema del cultivo, además el ácido láctico presente ayuda a eliminar bacterias patógenas. Este biofertilizante puede sustituir a los abonos químicos.

- **Tecnología de empaques.** El lactosuero se usa para producir por vía fermentativa un ingrediente antimicrobiano utilizado en la elaboración de empaques comestibles. De esta forma se obtienen películas biodegradables con actividad antibacteriana, esta película alarga la vida de anaquel, aumentando la caducidad y conservación de los alimentos (Valencia y Ramírez, 2009).

2.5 BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS

Las bacterias ácido-lácticas (BAL o LAB por sus siglas en inglés) han sido utilizadas durante siglos en fermentaciones industriales y han despertado gran atención al ser empleadas en la industria farmacéutica y de alimentos, especialmente para la obtención de ácido láctico, componentes saborizantes, espesantes y bacteriocinas, así como al considerable valor nutritivo que pueden aportar a los productos alimenticios y el bajo coste energético de su producción

Además, durante la última década se ha incrementado el número de estudios sobre el rol de que algunas cepas de BAL pudieran ser empleadas como cultivos probióticos (Rodríguez, 2006)

Las BAL son un conjunto de bacterias Gram-positivas, no esporuladas, en forma de cocos o bastones y catalasa negativa (aunque en algunos casos pueden encontrarse una pseudo-catalasa), con un metabolismo estrictamente fermentativo produciendo ácido láctico como el mayor producto final de la fermentación de los azúcares vía Embden-Meyer –glucólisis-1) y en otras ocasiones producen además etanol, acetato y CO₂ por la vía del ácido-6fosfogluónico (heterofermentación).

En términos generales estas bacterias tienen complejas necesidades de factores de crecimiento: vitamina B, aminoácidos, péptidos, bases púricas y pirimídicas.

Esta es una de las razones del porqué abundan en un medio tan rico nutricionalmente como la leche. A nivel de laboratorio se deben emplear medios selectivos que posean estas características para su aislamiento (por ej., el caldo o Agar MRS, Agar Rogosa).

Otra característica de este grupo de bacterias es su tolerancia al pH ácido (pH = 5, incluso a veces menores), pero conforme el medio se va acidificando, resultan inhibidas un mayor número de especies.

2.5.1 Principales grupos.

En 1919-1920, Orla-Jensen, clasificó las bacterias ácido-lácticas en dos grupos según sus características bioquímicas: las homofermentativas y las heterofermentativas.

Lyhs (2002) divide las BAL en tres grupos de acuerdo con sus características fermentativas: las homofermentativas estrictas, heterofermentativas estrictas, y las heterofermentativas facultativas.

Las BAL homofermentativas estrictas degradan las hexosas exclusivamente a ácido láctico y no fermentan las pentosas o el gluconato. Dentro de este grupo encontramos algunas especies de *Streptococcus* (*St. thermophilus* y *St. lactis*) y *Pediococcus* (*P. acidilactici*, *P. pentosaceus*).

Los heterofermentativos estrictos degradan las hexosas a ácido láctico, ácido acético, etanol y CO₂, y las pentosas a ácido láctico y ácido acético. Algunas especies de *Lactobacillus* (*L. brevis* y *L. buchnerii*) y *Leuconostoc* (*L. mesenteroides*, *L. dextranicum* y *L. cremoris*).

Los facultativos heterofermentativos fermentan las hexosas a ácido láctico y puede producir CO₂ a partir del gluconato pero no de la glucosa. Ellos también fermentan las pentosas para producir ácido láctico y acético.

El género *Lactobacillus* ha sido usado históricamente de forma segura, especialmente en la industria láctea, y juega un papel principal en la producción de leches fermentadas.

Las BAL de importancia en la industria de alimentos pertenecen a los géneros *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Paralactobacillus*, *Pediococcus*, *Streptococcus* y *Weissella* (Lyhs, 2002).

2.5.2 Bacterias lácticas probióticas

Las bacterias lácticas probióticas representan un grupo importante de bacterias que se alojan en el colon humano y que brindan múltiples beneficios para la salud del ser humano; producen bacteriocinas y ácido láctico que inhiben el crecimiento de bacterias patógenas para el humano, estimulan el sistema inmunológico del ser humano e intervienen de forma importante en la reducción del cáncer de colon (Chamorro, 2002).

Los microorganismos de los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* forman parte de las bacterias lácticas probióticas y son utilizados ampliamente para la producción de alimentos lácteos funcionales, como el yogurt y las leches ácidas.

El mercado de los productos lácteos funcionales representa una actividad económica muy importante dentro de la industria de los alimentos. La publicidad utilizada para promover los alimentos lácteos funcionales se enfoca principalmente en los beneficios que las bacterias lácticas probióticas proveen a la salud humana.

Sin embargo, para que las bacterias probióticas puedan ejercer su efecto benéfico en el ser humano se deben de instalar en el colon y para ello primero deben de atravesar el estómago y el intestino delgado, en donde una serie de

barreras físico-químicas (jugos gástricos y bilis hepática) tienen efectos severos sobre la viabilidad bacteriana (Chasquibol, 2003).

2.5.3 Cultivos iniciadores para la industria láctea.

La industria láctea durante siglos ha aprovechado la utilidad de distintos grupos de microorganismos (bacterias, mohos, levaduras) para la obtención de diversos subproductos fermentados, como prueba de ello encontramos entre otros a los quesos, yogures y mezclas de leches y granos fermentados.

La principal aplicación de las BAL como cultivos iniciadores en la industria láctea ha sido para la obtención de yogurt y diversos quesos madurados.

Quesos: Para la obtención de quesos debe lograrse la coagulación de la caseína, para tal fin se emplea de forma normal la adición de cuajo natural (renina) o sintético (enzimas), obteniendo de esta forma una cuajada húmeda, gelatinosa, muy impermeable, que se desuera por calentamiento (queso de pasta cocida), por prensado (quesos de pasta prensada) o cortándola.

Pero en algunas ocasiones suele usarse a las BAL como cultivos iniciadores o el ácido láctico producido por estas, lo que da lugar a una cuajada frágil, compacta, muy friable, permeable y de la que se separa fácilmente el suero.

En síntesis, las BAL empleadas en la industria lechera pertenecen a las familias *Streptococcaceae* y *Lactobacillaceae*, aunque también se pueden emplear bacterias productoras de ácido láctico en menor cuantía como *propionibacterium* (productor de ácido propiónico y ácido acético, y en menor cuantía de ácido isovalérico, fórmico, succínico y láctico).

2.6 MEDIOS DE CULTIVO

Uno de los sistemas más importantes para la identificación de microorganismos es observar su crecimiento en sustancias alimenticias artificiales preparadas en el laboratorio.

El material alimenticio en el que crecen los microorganismos es el Medio de Cultivo y el crecimiento de los microorganismos es el Cultivo. Se han preparado más de 10.000 medios de cultivo diferentes.

Para que las bacterias crezcan adecuadamente en un medio de cultivo artificial debe reunir una serie de condiciones como son: temperatura, grado de humedad y presión de oxígeno adecuado, así como un grado correcto de acidez o alcalinidad. Un medio de cultivo debe contener los nutrientes y factores de crecimiento necesarios y debe estar exento de todo microorganismo contaminante.

La mayoría de las bacterias patógenas requieren nutrientes complejos similares en composición a los líquidos orgánicos del cuerpo humano. Por eso, la base de muchos medios de cultivo es una infusión de extractos de carne y Peptona a la que se añadirán otros ingredientes.

2.7 CULTIVO DE MICROORGANISMOS

El cultivo de microorganismos consiste en proporcionarles las condiciones físicas, químicas y nutritivas adecuadas para que puedan multiplicarse de forma controlada. En general, podemos distinguir cultivos líquidos y sólidos en función de las características del medio y cultivos discontinuos y continuos en función de la disponibilidad de nutrientes en el medio (Zamora, 2003).

2.7.1 Crecimiento microbiano en medio líquido

Si la bacteria crece en un medio líquido, en la mayoría de los casos las células que se producen en cada división continúan su vida independientemente formándose una suspensión de células libres.

En un cultivo discontinuo de bacterias en medio líquido, se pueden diferenciar cuatro fases en la evolución de los parámetros que miden el crecimiento microbiano:

1.- **Fase lag o de adaptación** durante la que los microorganismos adaptan su metabolismo a las nuevas condiciones ambientales (abundancia de nutrientes y condiciones de cultivo) para iniciar la fase de crecimiento exponencial.

2.- **Fase exponencial o logarítmica**: en ella la velocidad de crecimiento es máxima y el tiempo de generación es mínimo. Durante esta fase las bacterias consumen a velocidad máxima los nutrientes del medio.

3.- **Fase estacionaria**: en ella no se incrementa el número de bacterias (ni la masa u otros parámetros del cultivo). Las células en fase estacionaria desarrollan un metabolismo diferente al de la fase exponencial y durante ella se produce una acumulación y liberación de metabolitos secundarios que pueden tener importancia industrial. Los microorganismos entran en fase estacionaria porque se agota algún nutriente esencial del medio o porque los productos de desecho que han liberado durante la fase exponencial hacen que el medio sea inhóspito para el crecimiento microbiano.

La fase estacionaria tiene gran importancia porque probablemente represente con mayor fidelidad el estado metabólico real de los microorganismos en los ambientes naturales.

4.- **Fase de muerte**: se produce una reducción del número de bacterias viables del cultivo (Gamazo, 2003).

2.7.2 Crecimiento microbiano en medio sólido

Las fases, parámetros y cinética de crecimiento discutidas para el caso de los cultivos líquidos se presentan también en cultivos sólidos. La cinética de crecimiento, en este caso, se puede estudiar siguiendo la evolución del número de células viables por unidad de superficie o por unidad de masa.

Cuando una célula aislada e inmóvil comienza a crecer sobre un substrato sólido, el resultado del crecimiento al cabo del tiempo es una colonia.

Por consiguiente, se denomina unidad formadora de colonia (UFC) a una célula bacteriana viva y aislada que si se encuentra en condiciones de substrato y ambientales adecuadas da lugar a la producción de una colonia en un breve lapso de tiempo. Si el número inicial de bacterias por unidad de superficie es muy alto, la confluencia de las colonias da lugar a lo que se llama un césped cuando se realizan los cultivos en placas de laboratorio (Gamazo, 2003)

MATERIALES Y MÉTODOS

El desarrollo de este trabajo se realizó en el laboratorio de la empresa mexicana GBS Global S.A. de C.V., en conjunto con la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Ubicados en la Ciudad de Saltillo Coahuila, México.

3.1 Obtención de la muestra

El suero utilizado en este trabajo proviene del laboratorio de lácteos ubicado en la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. El suero es obtenido de la producción de quesos panela, suave y blanco de leche de vaca pasteurizada, no requiere maduración. La muestra de suero lácteo de vaca se colocó 30 ml de muestra en frascos de vidrio, posteriormente se sometió a esterilizar en autoclave a 121°C por 15 minutos. Se midió el pH inicial antes de inocular las muestras en caldo MRS.

3.2 Medición de pH de las muestras

A las muestra de suero que fueron anteriormente sometidos al proceso de esterilizado se les determinó el pH mediante el uso del potenciómetro (HACH SensION 3), calibrado con una solución buffer pH 4.0, pH 7.0 y 10.0. La acidez en el suero lácteo de leche sirvió como parámetro de contaminación con otros microorganismos.

3.3 Análisis físico-químicos del suero

Al suero lácteo de vaca, que fue utilizado como medio de cultivo, se le realizó un análisis fisicoquímico evaluando, grasa, acidez titulable, proteínas, densidad, sólidos no grasos, sólidos totales, lactosa. Para cada análisis se realizo por duplicado.

3.3.1 Análisis físico-químico de grasa

Para la determinación de grasa en suero lácteo de vaca se realizó por el método Gerber, colocando 10 ml de H₂SO₄ concentrado en el butirometro, después se le agrego 11 ml de leche cuidando que se descienda por la pared del butirometro (agregando agua antes del cuello para poder apreciar el volumen). En seguida se agregó 1 ml de alcohol isoamilico tapando el butirometro, se mezcló suavemente para facilitar la digestión de la muestra. Se centrifugo por 1 min para tomar la lectura en la escala.

3.3.2 Análisis físico-químico de acidez

Este análisis consiste en una volumetría ácido-base valorando la acidez del suero lácteo de vaca, expresada en g de ácido láctico por 100ml de suero lácteo de vaca, en presencia de fenolftaleína. Se colocó 9 ml de la muestra de suero lácteo de vaca en vaso de precipitado, agregando de 3 a 4 gotas del indicador de fenolftaleína y mezclando suavemente. Posteriormente se titulo con NaOH 0.1 N hasta que se obtuvo un color rosa pálido permanente. Se tomó la lectura de los ml de NaOH gastados. Se calculó el porcentaje de acidez que hay en el suero lácteo de vaca con la siguiente formula.

$$\% \text{ acidez titulable} = \frac{(\text{ml de NaOH } 0.1N)(0.009)(100)}{\text{ml de muestra}}$$

3.3.3 Análisis físico-químico de proteína

Para determinar el porcentaje de proteína que se encuentra en el suero lácteo de vaca a la muestra anterior (acidez) se le agrego 2 ml de formaldehido, mezclando y después de 2 min. Se realizó una segunda titulación, se tomó la medida de los mililitros gastados de NAOH calculando el contenido de proteína total y el de caseína con la siguiente formula.

$$\% \text{ caseína} = (\text{ml de NaOH } 0.1N)(1.63)$$

$$\% \text{ proteina} = (\text{ml de NaOH } 0.1)(2.0)$$

3.3.4 Análisis físico-químico de densidad

Para la determinación de la densidad, se debe llenar $\frac{3}{4}$ (200 mL) de la probeta con suero lácteo de vaca, posteriormente se introdujo en lactodensímetro y una vez que se estabilizó se registro la lectura de la densidad y temperatura.

3.3.5 Análisis físico-químico de sólidos no grasos

Este análisis se determino tomando la lectura de densidad multiplicándose por 0.25 que es un número constante.

$$SNG = (\text{lectura del lactodensímetro})(0.25)$$

3.3.6 Análisis físico-químico de sólidos totales

Se determino el contenido de sólidos totales utilizando los resultados de sólidos no grasos mas el contenido de grasa que se encuentra presente en el suero lácteo de vaca.

$$ST = (SNG) + (\text{grasa})$$

3.3.7 Análisis físico-químico de determinación de lactosa

Para este análisis se utilizó el contenido de sólidos totales en el suero lácteo de vaca restándole el contenido de grasa más el porcentaje de proteína y minerales, la formula que se empleo se muestra a continuación.

$$Lactosa = (ST) - (\text{grasa} + \text{proteinas} + \text{minerales})$$

ETAPA I. PURIFICACIÓN

3.4. Adaptación de reactores para crear condiciones de anaerobiosis

Para llevar a cabo el aislamiento de los microorganismos probióticos se emplearon reactores de vidrio para anaerobiosis de diferentes tamaños, de 275 mL para fermentaciones en medio líquido y frascos de 4 litros para fermentaciones de anaerobiosis en medio sólido.

En los frascos de 4 litros se introducían cajas Petri con agar MRS para mantener su anaerobiosis.

Con el fin de crear condiciones de anaerobiosis el cual se le introdujo nitrógeno para poder desplazar el oxígeno, el tiempo de inyección de nitrógeno dependió del tamaño de los reactores utilizados.

3.4.1 Cultivo en medio líquido

Todos los microorganismos aislados en este estudio fueron cultivados en caldo y Agar MRS cuya composición por litro se presenta en el cuadro 4.

Cuadro 4. Composición del Medio de Cultivo líquido

Composición	gr/L
Peptona universal	10
Extracto de carne	5
Extracto de levadura	5
Dextrosa	20
Fosfato de potasio	2
Citrato de sodio	2
Sulfato de magnesio	0.1
Sulfato de manganeso	0.05
Acetato de sodio	5
Tween 80	1 ml

Preparación del medio

Se preparo el medio de cultivo que fue cado MRS (cuyo composición por litro se presenta en el cuadro 5) disolviendo 62.15 gr en 1 litros de agua destilada y se añadió 1 mL de tween 80, se calentó con agitación constante hasta dilución, después de haber obtenido el medio se esterilizó en autoclave 15 min. a 120 libras de presión. Se espero a que se enfriara el medio, se vació en cajas de Petri.



Figura1. Preparación del medio líquido MRS

3.4.2 Cultivo en medio sólido

Se preparó de la siguiente manera: se disolvieron 51 g en 1 litro de agua destilada y añadió 1 mL de Tween 80. Posteriormente se esterilizó en autoclave a 121 ° C durante 15 min. En el cuadro 5 se muestra la composición del Agar MRS empleado en es estudio.

Cuadro 5. Composición del medio de cultivo sólido

Composición	gr/L
Peptona universal	10
Extracto de carne	5
Extracto de levadura	5
Dextrosa	20
Fosfato de potasio	2
Citrato de sodio	2
Sulfato de magnesio	0.1
Sulfato de manganeso	0.05
Acetato de sodio	5
Tween 80	1 ml
Agar bacteriológico	12

Las bacterias aisladas en este trabajo se cultivaron en cajas de Agar MRS para cada prueba. Los cultivos se realizaron en los frascos reactores en donde se suministra nitrógeno para sustituir el oxígeno para llevar a cabo la anaerobiosis y por ultimo se incubó a 37 °C durante 24 horas. Una vez transcurrido el tiempo se cultivó en cajas Petri empleando agar MRS y se colocaron en jarras reactores, igualmente se incubó a 37 °C durante 24 horas.

3.5 Purificación cepas probióticas

Utilizando el método de cultivo MRS las cepas fueron propagadas, en donde se midió 20 mL de medio líquido en cada frasco, se esterilizó a 121 °C durante 15 min., posteriormente se inocularon 100 µL de cada una de las muestras, posteriormente se incubaron durante 24 horas en anaerobiosis.

Las cepas se purificaron por estría continua en placas de Agar MRS, se observó al microscopio óptico para la identificación morfológica y se realizó la tinción de Gram.

Las bacterias que se presentaron puras se almacenaron en congelación en tubos de Eppendorf y sometidos a liofilización.

3.5.1 Caracterización morfológica

La identificación de las cepas se realizó mediante una tinción de Gram (ver anexo A) para después ser observadas al microscopio. La aplicación de esta tinción permite clasificar las bacterias en dos grandes grupos: las bacterias Gram positivas y las bacterias Gram negativas.

Este comportamiento diferencial frente a la tinción de Gram obedece a la distinta composición de la pared celular de estos dos grupos bacterianos, así mientras las bacterias Gram positivas poseen una gruesa malla de peptidoglicano, en su parte más externa, las bacterias Gram negativas poseen sólo una fina capa de peptidoglicano, que está además envuelta por una membrana, la membrana externa (Gamazo, 2005).

3.6 Conservación de las cepas

Para conservar las cepas viables se almacenaron en tubos Ependorff, se preparó una solución de 100 mL leche descremada con 10 mL glicerol y se esterilizó posteriormente se tomó de la solución estéril 500 μ L y 500 μ L del cultivo de cepas, colocándolas en los tubos de Ependorff, posteriormente se almacenaron en congelación.

Para realizar el otro método de conservación se llevó a cabo el proceso de liofilización que es un buen sistema de conservación de cultivos de microorganismos porque la operación es compatible con el procesamiento en condiciones que evitan o minimizan las posibilidades de contaminación (Mafart y Beliard, 1994).

Se colocó 500 μ L de leche descremada y 500 μ L de cultivo de cepas. Se centrifugó a 4,500 revoluciones por 30 minutos, Posteriormente almacenaron en un ultra-congelador a -80°C por 24 h transcurrido el tiempo se colocó en el liofilizador (Labconcon de 6 litros) durante 72 horas.

ETAPA 2. SELECCIÓN DE LAS CEPAS PROBIÓTICAS

3.7 Preparación del inoculo

En un matraz Erlenmeyer de 500 mL se preparó medio líquido de MRS, posteriormente se esterilizó a 121°C durante 15 minutos.

En condiciones de asepsia, se preparó añadiendo a 30 mL del medio en cada frasco, 1 mL de cada una de las cepas. Se incubó durante 24 horas en condiciones anaerobiosis, para garantizar el máximo crecimiento exponencial.

3.7.1 Selección de las cepas en suero lácteo de vaca

Una vez obtenidas las colonias puras de cada una de las muestras, se midió 20 mL de suero de leche de vaca en cada frasco, se esterilizó a 121°C durante 15 minutos, posteriormente se inocularon 100 μ L de cada una de las muestras e incubaron durante 24 horas en anaerobiosis.

Se sembró por estría por agotamiento (ver anexo B) 100 µL en cajas petri con Agar MRS e incubadas a 37 °C durante 24 horas, respectivamente, en una atmosfera anaeróbica. Con la finalidad de tener colonias aisladas para poder realizar el conteo de las colonias y así seleccionar las cepas que mayor crecimiento presenten.

ETAPA 3. PRODUCCIÓN EN MEDIOS

3.8 Desarrollo de medios de cultivo

Se propone la utilización de tres medios de cultivo diferentes, basados en el uso de suero de leche de vaca como componente principal.

3.8.1 Preparación del medio de cultivo 1

El medio de cultivo 1 se preparo utilizando el suero lácteo como único componente en el siguiente cuadro 6 se presenta la composición, lo cual presenta una relación de C:N de 7, lo cual la fuente de carbono se obtuvo del porcentaje de lactosa que se encuentra en suero lácteo de vaca y la fuente de nitrógeno del contenido de proteína presente en suero lácteo de vaca.

Cuadro 6. Composición del medio de cultivo 1

Cultivo 1
Suero de leche

3.8.2 Preparación del medio de cultivo 2

El medio de cultivo se elaboro usando como componentes suero de leche, extracto de levadura, medio mínimo de sales, de las cuales serian: fosfato de potasio (KH_2PO_4 , 0.5g), cloruro de amonio (NH_4Cl , 1.0g), sulfato de sodio (Na_2SO_4 , 2.0g), cloruro de calcio hexahidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.001g), sulfato de hierro (FeSO_4 0.0003g) y cloruro de magnesio (MgCl_2 5 ppm). Con una relación de C:N de 3.5 obteniendo la fuente de carbono de la lactosa presente en suero lácteo de vaca , la fuente de nitrógeno obtenida de la proteína presente en suero lácteo de vaca, de extracto de levadura y cloruro de amonio. En el cuadro 7 se presenta la composición del medio de cultivo

Cuadro 7. Composición del Medio de Cultivo 2

CULTIVO 2	
Suero de leche	1 litro
Extracto de levadura	5 g/L
Fosfato de potasio	0.5 g/L
Cloruro de amonio	1.0 g/L
Sulfato de sodio	2.0 g/L
Cloruro de calcio hexahidratado	0.001 g/L
Sulfato de hierro	0.0003 g/L
Cloruro de magnesio	5 ppm

3.8.3 Preparación del medio de cultivo 3

En el medio de cultivo 3 se utilizará lo siguiente: suero de leche, extracto de levadura (5.0 g/L), peptona caseína (10g/L) y el medio mínimo de sales. La relación C:N para este medio fue de 1.9, como fuente de carbono se obtiene de la lactosa presente en suero lácteo de vaca y como fuente de nitrógeno es obtenida de la proteína presente en suero lácteo de vaca, de extracto de carne, peptona de caseína y cloruro de amonio. En el cuadro se presenta la composición del medio de cultivo.

Cuadro 8. Composición del Medio de Cultivo 3

CULTIVO 3	
Suero de leche	1 litro
Extracto de carne	5 g/L
Peptona de caseína	10 g/L
Fosfato de potasio	0.5 g/L
Cloruro de amonio	1.0 g/L
Sulfato de sodio	2.0 g/L
Cloruro de calcio hexahidratado	0.001 g/L
Sulfato de hierro	0.0003 g/L
Cloruro de magnesio	5 ppm

3.9 Microorganismos evaluados

Para la presente investigación se empleó la cepa de tabasco perteneciente a la colección del centro de microbiología aplicada (CEMAP) la cual se seleccionó para este estudio ya que presentó mejor capacidad de adaptación al suero de vaca, la cual tubo un crecimiento celular de 1.73×10^8 UFC / mL.

3.10 Determinación de cinética de crecimiento

Las cinéticas se llevaron a cabo en 9 fermentaciones en el Shaker (innova 44), la cepa de tabasco se adaptó a las condiciones de fermentación por tres medios de cultivo, en cada caso se utilizó 1 mL de inóculo.

Para cada una de las fermentaciones se preparó un inóculo de 20 mL en un reactor diseñado para utilizarlo en condiciones anaeróbicas, que contenía la composición de cada uno de los medio diseñados para esta investigación. Se incubó por 24 horas en condiciones de anaerobiosis a 37°C antes de la fermentación.

Para realizar las cinéticas de crecimiento se tomaron asépticamente 20 mL de sustrato a las 0, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96 horas de fermentación (el tiempo 0 correspondió a las condiciones iniciales del sustrato).

De la cinética de fermentación se determinaran: medición de crecimiento celular, determinación de la viabilidad celular mediante conteo de unidades formadoras de colonias (UFC), producción de ácido láctico.

3.10.1 Determinaciones de biomasa

El crecimiento celular fue determinado mediante gravimetría en base a las mediciones de peso seco de las muestras (g células/mL), las cuales fueron inicialmente centrifugadas a 10,000 rpm durante 20 min. El sobrenadante se descarta, mientras que el precipitado es lavado con agua destilada y colocado en tubos cónicos de 2 mL de la marca Ependorff. Luego las muestras son secadas, primero a 60 °C durante 3 horas y posteriormente a temperatura ambiente en un desecador durante 12 horas, transcurrido el tiempo se peso con exactitud en una balanza analítica (PCE-ABZ 100C).

3.10.2 Determinación de la viabilidad celular

Se verificó la viabilidad celular mediante conteo de unidades formadoras de colonia (UFC), para determinar el número de bacterias en las colonias, se realizaron diluciones seriadas de 10^{-3} , 10^{-5} y 10^{-7} , sembrando por el método de estría por agotamiento 100 μ L de cada muestra en cajas con agar MRS con la

finalidad de tener colonias aisladas para poder realizar el conteo de las colonias. Posteriormente La incubación se realizó en un medio anaerobio, en una jarra de anaerobiosis de 2,5 L durante 24 horas a 37 °C.

3.10.3 Producción de ácido láctico

La concentración final de ácido láctico en cada una de los cultivos se determinó por la técnica analítica de titulación ácido-base.

Este análisis consiste en una volumetría ácido-base sencilla, en la que se valora la acidez de la leche, expresada en g de ácido láctico por 100 mL de leche, en presencia de fenolftaleína.

Este ácido es producto de la fermentación de la lactosa, con la relación siguiente: 1mol de glucosa equivale a 2mol de ácido láctico. De ahí, que cuando una leche se acidifica, disminuya su contenido en lactosa, ya que esta se convierte en ácido láctico. Esta descomposición se llama glicólisis (Sierra, 2007). Los análisis se realizaron por duplicado, presentando la metodología en el anexo C.

RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1 Análisis físico-químico del suero

El pH obtenido (6.53) permite clasificar al lactosuero utilizado como dulce, el valor de proteína fue de 0.8%, considerándose similar al reportado por Mena, (2003) de 6.5 para lactosuero dulce.

En el cuadro9 se presenta los resultados de los análisis fisicoquímicos realizados al suero lácteo de vaca que se utilizó para el desarrollo de los 3 medios de cultivo variando la relación C:N.

Cuadro 9. Caracterización fisicoquímica del lactosuero

Análisis	Resultados (%)
Grasa	0.2
Acido láctico	0.14
Proteínas	0.8
Densidad	0.0312
Sólidos no grasos	7.25
Sólidos totales	7.45
Lactosa	5.65

El contenido de grasa obtenido fue de 0.2%. El porcentaje de grasa en el lactosuero debe ser bajo (menor 0.8%); de lo contrario causaría mal sabor y aroma durante el almacenamiento (Montañez, 2000). Los sólidos totales 7.45% se encuentran dentro de los valores normales de este producto a mayor cantidad de sólidos totales mayor será el rendimiento de producción de biomasa.

Tomando en consideración que la composición del lactosuero varía en función a los procesos tecnológicos en la elaboración del queso y de la leche departida, se puede decir que el suero obtenido del procesamiento del queso del departamento del laboratorio de lácteos de la UAAAN presenta las características fisicoquímicas necesarias para ser utilizado como sustrato.

ETAPA 1. PURIFICACIÓN DE CEPAS PROBIOTICAS

4.2 Purificación de cepas probióticas

Las cepas proporcionadas fueron verificadas en cuanto la calidad de pureza mediante resiembras en placas conteniendo agar MRS, por el método de estría por agotamiento. Se obtuvieron la purificación de 19 cepas probióticas aisladas y puras. Luego de observaciones al microscopio las 19 cepas presentaron morfología Gram positivas. En el cuadro 10 se presentan las diversas características de los microorganismos probióticos.

Cuadro 10. Características morfológicas de las cepas probióticas pertenecientes al banco de microorganismos de CEMAP.

CEPAS	TAMAÑO	TINCION	FORMA
02-1	Chicas	Gram +	Esféricos
Manzana	Grandes	Gram +	Esféricos
Maíz	Chicas	Gram +	Bastón
Frijol	Grandes	Gram +	Bastón
Alfalfa	Chicos	Gram +	Bastón
Tabasco	Grandes	Gram +	Bastón
Ciruela	Chicos	Gram +	Bastón
Sotol filtrado	Chicos	Gram +	Esféricos
Pozol	Chicos	Gram +	Esféricos
Agua miel	Grandes	Gram +	Bastón
Calabaza	Chicos	Gram +	Bastón
M1	Chicas	Gram +	Bastón
Soto sin filtrar	Chicos	Gram +	Esféricos
M2	Chicos	Gram +	Esféricos
Suero	Grandes	Gram +	Bastón
Jagüey	Grandes	Gram +	Esféricos
San Rafael	medianos	Gram +	Esféricos
Jocoque	Chicos	Gram +	Esféricos
Leche	Grandes	Gram +	Bastón

Los microorganismos probióticos aislados se muestran en la Figura 2. Después de la incubación a 37 °C durante 24 horas en condiciones anaerobias fueron examinadas mediante la tinción de Gram.

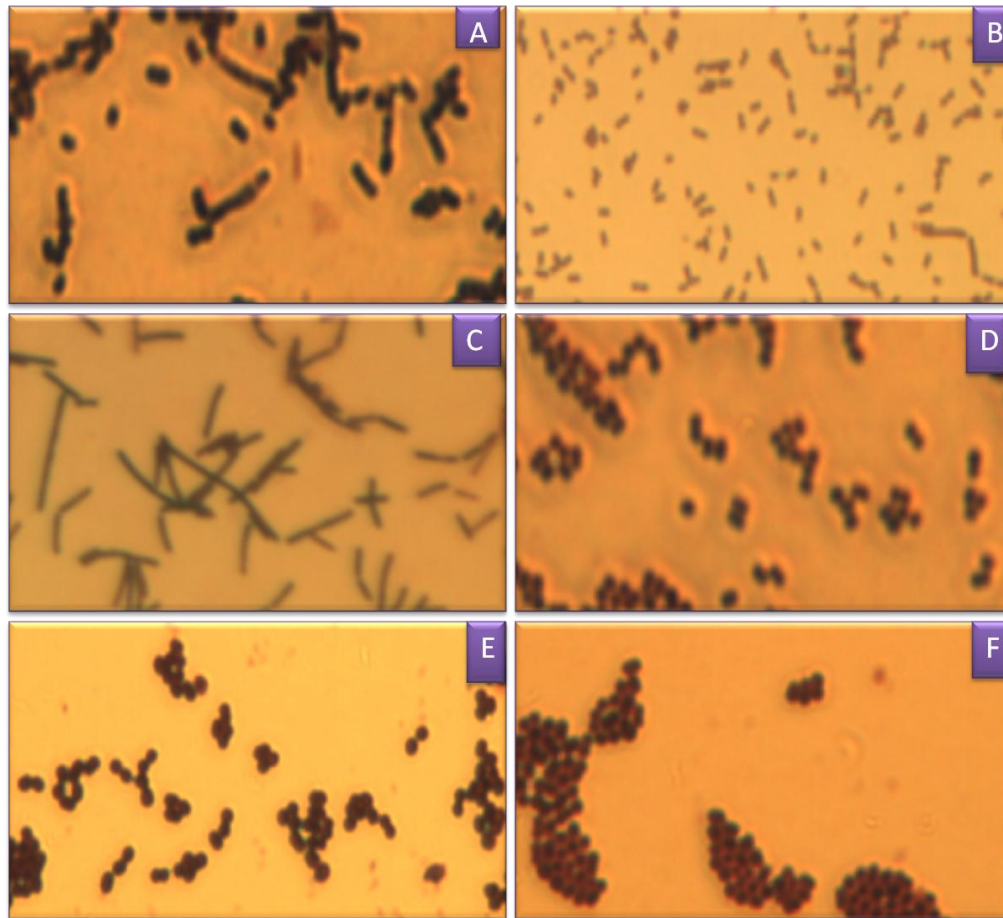


Figura 2. Fotografía de los microorganismos probióticos purificados. A) Tabasco, B) Alfalfa, C) leche, D) 02-1, E) manzana, F) soto filtrado.

Los resultados de la realización de tinción de Gram posteriormente la observación al microscopio fueron los siguientes: la bacteria aislada de pozol negro (A) de origen de tabasco presentó una morfología de bacilos largos formando cadenas largas, separadas entre unas cadenas y otras, la de bacteria aislada de forraje de alfalfa (B) y la bacteria aislada de leche de cabra (C), se aprecia de acuerdo a su morfología microscópica que fueron bacilos largos y delgados separados uno de otros, en la bacteria de 02-1 (D) aislada de heces de bebe se presento la morfología de cocos pequeños, formando colonias en ramilletes.

La bacteria aislada de la fruta de manzana (E) fueron cocos grandes formando colonias muy ramificadas, y en la bacterias aislada de sotol filtrado (F) se encontraron cocos pequeños, unidos en cadenas ramificadas, en todas las cepas se fijó el color purpura y como lo indica la literatura indica que la coloración presentada por estos microorganismos corresponde a los Gram positivos; los resultados que se presentaron coinciden con los que reporto Carlos y col. 2003 que en dicho estudio emplearon bacterias ácido-lácticas obteniendo resultados que presentan características morfológicas de bacilos y cocos Gram positivas.

4.3 Conservación de cepas probióticas

Como resultado de esta etapa se tuvo la colección de las 19 cepas probióticas, teniendo las siguientes características: contener el máximo número de células viables, estar libre de contaminantes, ser activo en las condiciones de procesamiento.

El método de conservación debe permitir mantener las características del microorganismo por las cuales fue seleccionado. En este trabajo se empleo el método de la congelación y la liofilización para la conservación bacteriana a largo plazo.

La congelación es un método efectivo para mantener la viabilidad de las bacterias, por lo tanto se pudo emplear como método de conservación de cultivos bacterianos, principalmente microorganismos empleados en fermentación.

Una de las ventajas que se obtuvieron en la liofilización es que las bacterias pueden volver a su estructura original por adición de agua, es un buen sistema de conservación de cultivos de microorganismos porque la operación es compatible con el procesamiento en condiciones que evitan o minimizan las posibilidades de contaminación.

En la figura 3 se muestra las cepas liofilizadas en viales de 4mL.



Figura 3. Fotografía de las cepas conservadas

ETAPA 2. SELECCIÓN DE LAS CEPAS PROBIÓTICAS EN SUERO DE VACA

4.4 Selección de las cepas en suero de vaca

La inoculación de las muestras en las placas de Agar MRS produjo abundante crecimiento microbiano por lo que se tuvo que hacer diluciones seriadas de 10^{-3} y 10^{-5} . Una vez obtenidas las cepas previamente aisladas se realizó el conteo de las colonias teniendo como resultado un mayor crecimiento en las cepas de jocoque, M2 y tabasco. Como se muestra en la Figura 4. Posteriormente se seleccionó la cepa de tabasco que presentó una mayor producción de 173×10^6 UFC/mL, la cepa seleccionada se evaluó en siguiente etapa.

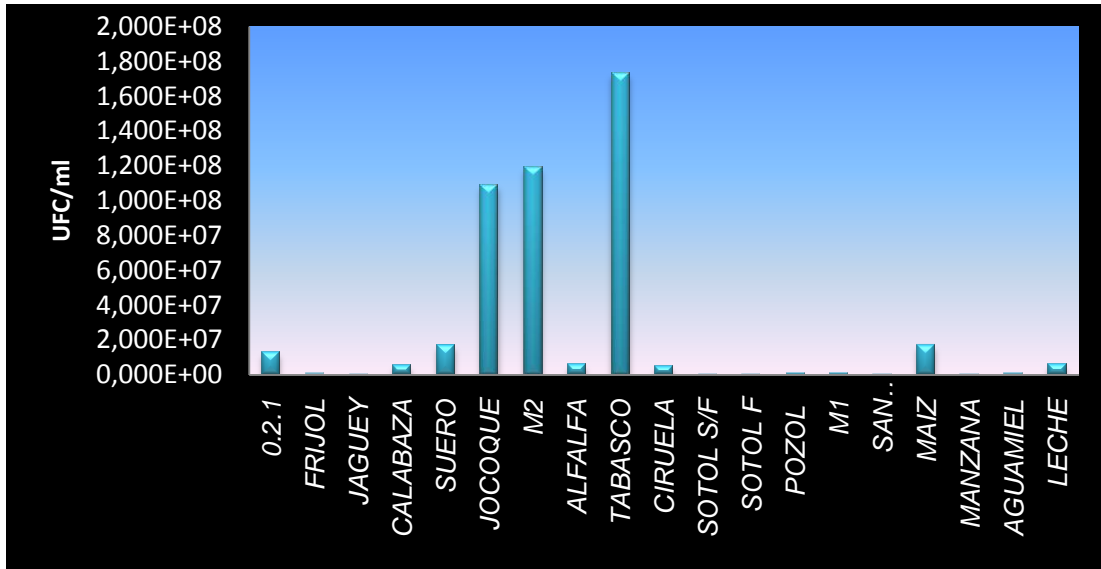


Figura 4. Evaluación del crecimiento de los probióticos en suero de vaca.

En la figura 5 se observa el crecimiento de la cepa de jocoque(A) presentando cocos pequeños formando colonias entre ellos, mostrando un menor crecimiento en comparación con la cepa de M2 (B) que fueron colonias de bacilos formando cadenas largas separadas entre ellas, en ambas cepas no se presenta contaminación de levaduras.

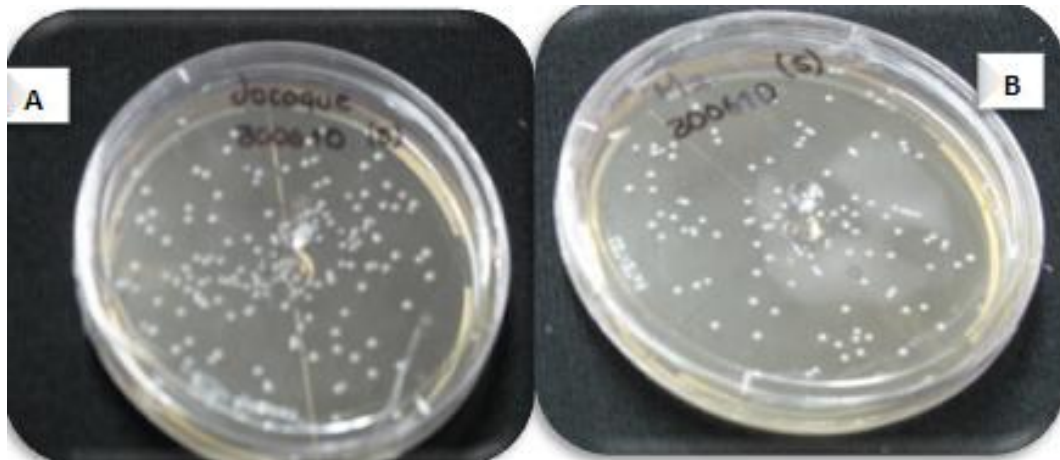


Figura 5. Crecimiento de la cepa de (A) jocoque y la cepa de M2 (B) en suero de vaca

ETAPA 3. PRODUCCIÓN EN MEDIOS

4.5 Desarrollo en medios de cultivo

En figura 6 se muestra el cultivo 1 (A), con las siguientes características: líquido de color blanco, con pequeños grumos. En la figura 6 (B) se muestra el cultivo 2, presentando aglomeraciones debido al proceso de esterilización, mostrando un color amarillo claro. En la figura 6 (C) se muestra el cultivo 3 este no presenta aglomeraciones en comparación a los otros dos medios, se obtiene un color naranja.

Figura 6. Medios de cultivo



4.6 Resultados de cinéticas de crecimiento

4.6.1 Cinética de crecimiento de cultivo 1

Las condiciones óptimas para el crecimiento de las cepa de tabasco son a 37°C en condiciones anaerobiosis. A estas condiciones se obtuvo un máximo de productividad de biomasa de 10.433 g/L, la productividad máxima de ácido láctico de 3.6 gr/L a un tiempo de incubación de 96 horas, y una viabilidad celular de UFC/mL fue de 4.60×10^7 UFC/mL a un tiempo de incubación de 36 horas.

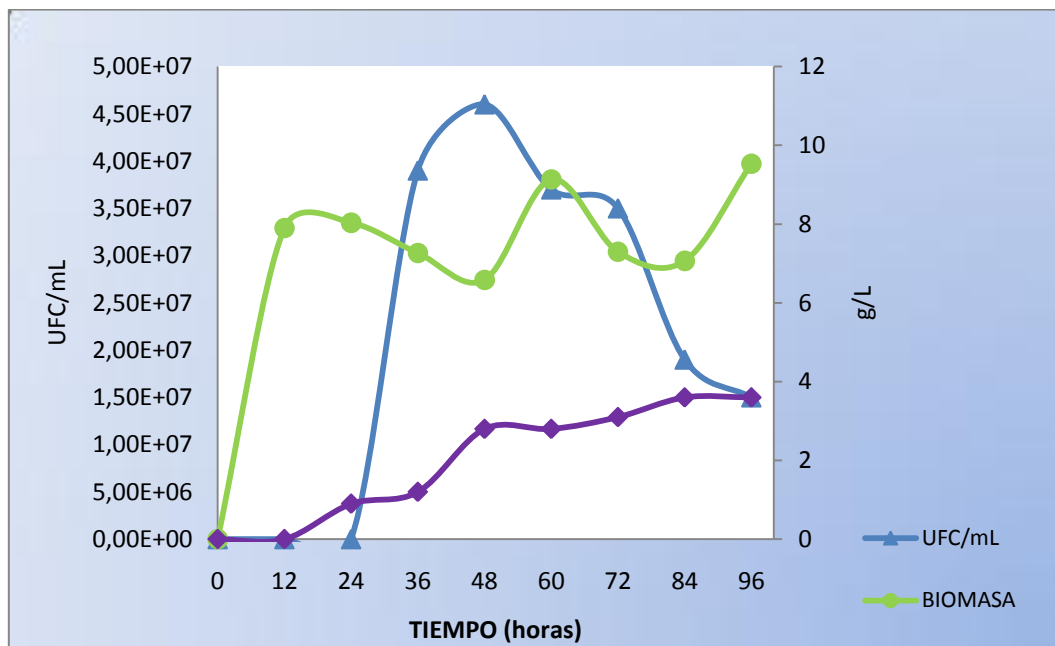


Figura 7. Cinética de crecimiento del cultivo 1

En la producción de ácido láctico hay un aumento en la producción hasta las 24 h y luego se mantiene constante, teniendo una máxima producción de 4.1 gr/l

4.6.2 Cinética de crecimiento del cultivo 2

Como resultado se tiene que la cepa en cuanto a crecimiento presentó una tendencia de aumento de bacterias viables, obteniendo un valor máximo a las 24 horas de incubación y posteriormente disminuyó hasta 2.10×10^5 UFC/mL a las 60 horas de fermentación.

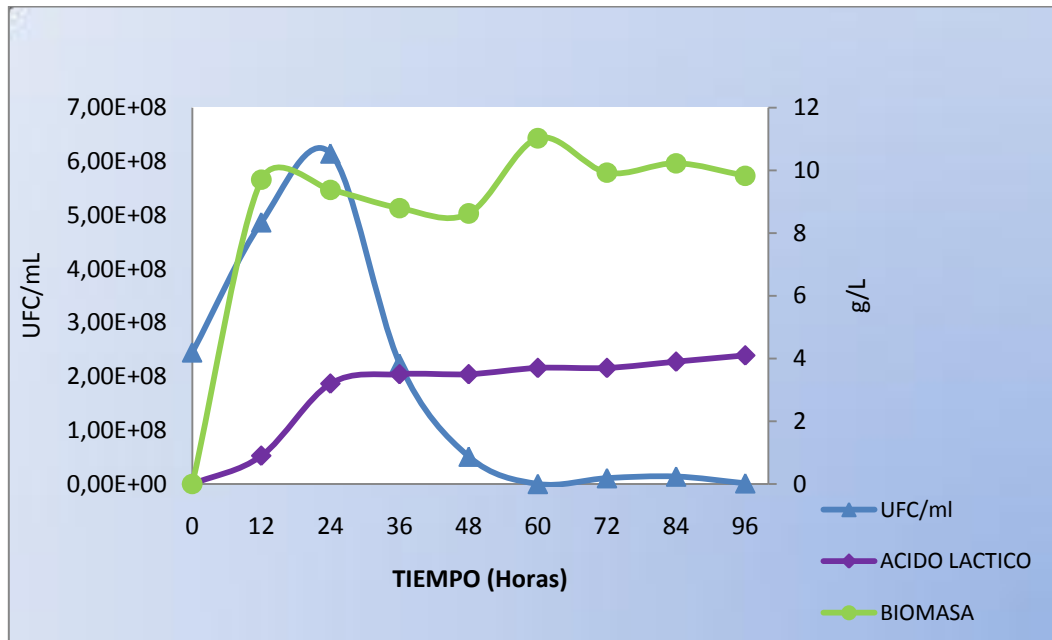


Figura 8. Cinética de crecimiento del cultivo 2

A las 12 horas de fermentación inició la producción de biomasa, a partir de las 24 h se mantiene constante, se puede apreciar un aumento a las 60 h, alcanzándose la máxima concentración de biomasa de $11,025$ gr/L. se observa un crecimiento exponencial máximo hasta las 24 horas disminuyendo rápidamente en las siguientes horas, la acidez llega a su máximo también a las 24 horas manteniéndose posteriormente casi constante.

4.6.3 Cinética de crecimiento del cultivo 3

En el cultivo 3 se observó como la cepa entra a la fase de adaptación rápidamente creciendo exponencialmente durante las 12 horas, siendo la mayor concentración de 6.24×10^8 UFC/ml a una temperatura de 37°C en condiciones de anaerobiosis.

La cepa mostró una disminución en la producción durante las 48 horas de fermentación, posteriormente la tendencia es de aumento con una máxima productividad de ácido láctico de 14 gr/L. y de biomasa de 14.8 gr/L, por lo cual se considera a las 48 horas la hora óptima de producción.

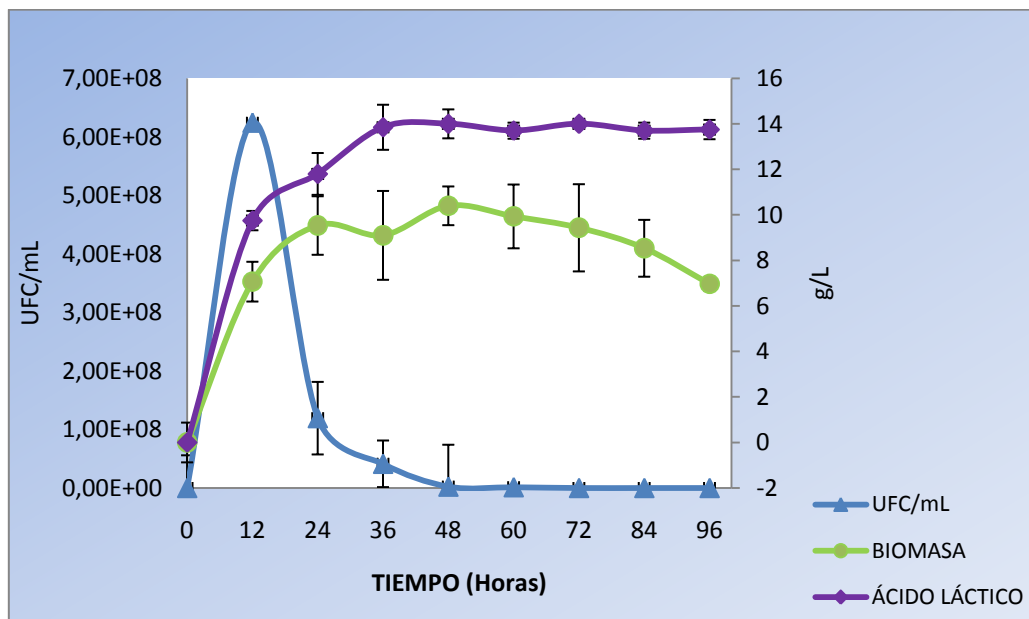


Figura 9. Cinética de crecimiento del cultivo 3

Hay que destacar que en este medio se produjo una cantidad de ácido láctico mucho mayor que en los otros medios.

4.7 Determinación de cinética de crecimiento

En el cuadro 11 se presenta la comparación de los resultados obtenidos para cada cultivo, se puede observar que el mayor crecimiento celular, para la cepa de tabasco se da en cultivo 3 y al comparar este medio, con el medio 1 que presento

En el yogur, la concentración de bacterias lácticas debe ser como mínimo de 10×10^6 UFC/ml (NM, 1983b) y en los tres tipos de cultivo analizados se encontraron, concentraciones superiores a 10×10^8 UFC/ml, lo que convierte al suero en una importante fuente de bacterias lácticas, que pudieran funcionar como probióticos.

Cuadro 11. Comparación de los resultados obtenidos de biomasa, ácido láctico y viabilidad celular.

MEDIOS	1	2	3
BIOMASA (g/L)	10.4g/L (96 horas)	11.02g/L (60 horas)	10.4 g/L (48 horas)
ACIDO LÁCTICO (g/L)	3.6 g/L (96 horas)	4.1 g/L (96 horas)	14 g/L (48 horas)
VIABILIDAD DE CÉLULAS UFC/mL	4.60×10^7 UFC/mL (36 horas)	6.15×10^8 UFC/mL (24 horas)	6.24×10^8 UFC/mL (12 horas)

4.7.1 Comparación de producción de biomasa en los 3 medios

La mayor concentración de biomasa se presenta en el cultivo 2 (11.02 g/L) a las 60 horas, el cultivo 1 se obtuvo 10.4 g/L a las 60 horas de fermentación, lo que varía es en el tiempo de recuperación de biomasa, en el cultivo 1 fue a las 96 horas, en comparación del cultivo 2 fue a las 60 horas, y al cultivo 3 que se obtuvo a las 48 horas, si buscamos disminuir el tiempo de incubación donde se reducen costos de funcionamiento del fermentador el cultivo 3 sería el indicado pero si buscamos mayor producción de biomasa se sugiere el cultivo 2.

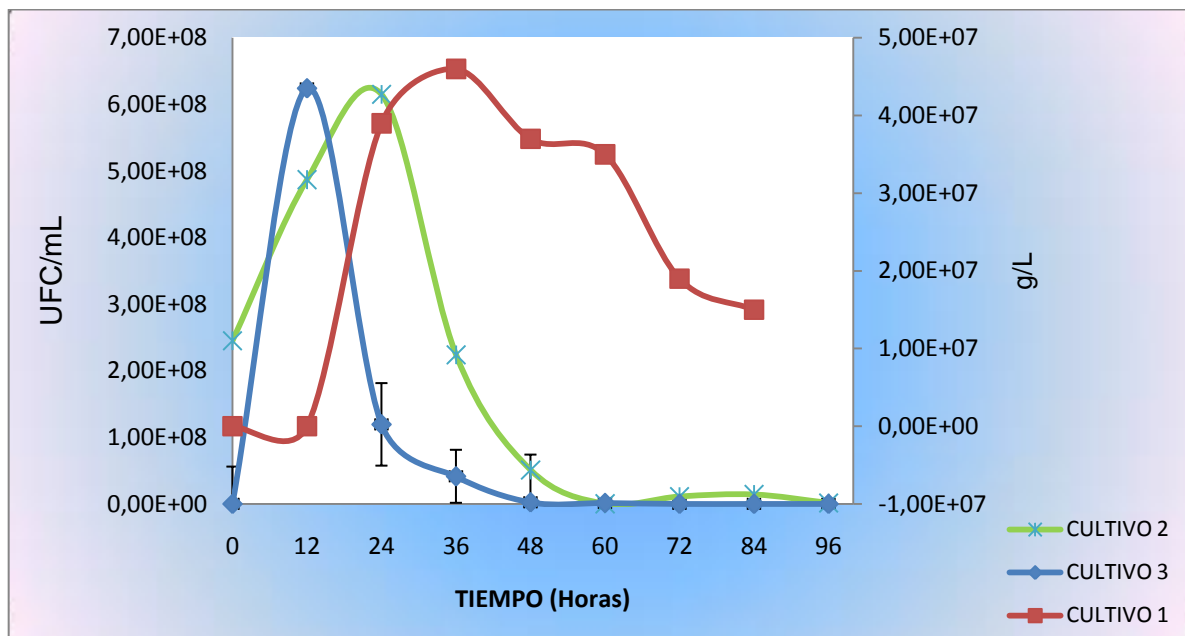


Figura 10. Evaluación de producción de biomasa

4.7.2 Comparación de determinaciones de viabilidad celular en los 3 medios

Se realizó la cuenta viable de las cepas en cada cultivo, presentando los resultados en la figura 11. Muestra el crecimiento de la cepa de tabasco en los 3 medios de cultivos. El cultivo 3 obtuvo la mayor concentración (6.24×10^8 UFC/mL) a las 12 horas, siendo este tiempo menor que en los otros casos. Probablemente, este crecimiento pudo estar asociado a la alta concentración de nutrientes presentes en el cultivo 3.

Según Román Jiménez, 2002 presentó la investigación donde utilizó sustratos naturales (agua de coco, jugo de caña, jugo de naranja, suero de queso) para el crecimiento de *Lactobacillus casei* teniendo con mayor crecimiento en el suero de queso, seguido del jugo de naranja, con esto se determina que el suero de queso constituye sustratos adecuados para el crecimiento de microorganismos probióticos.

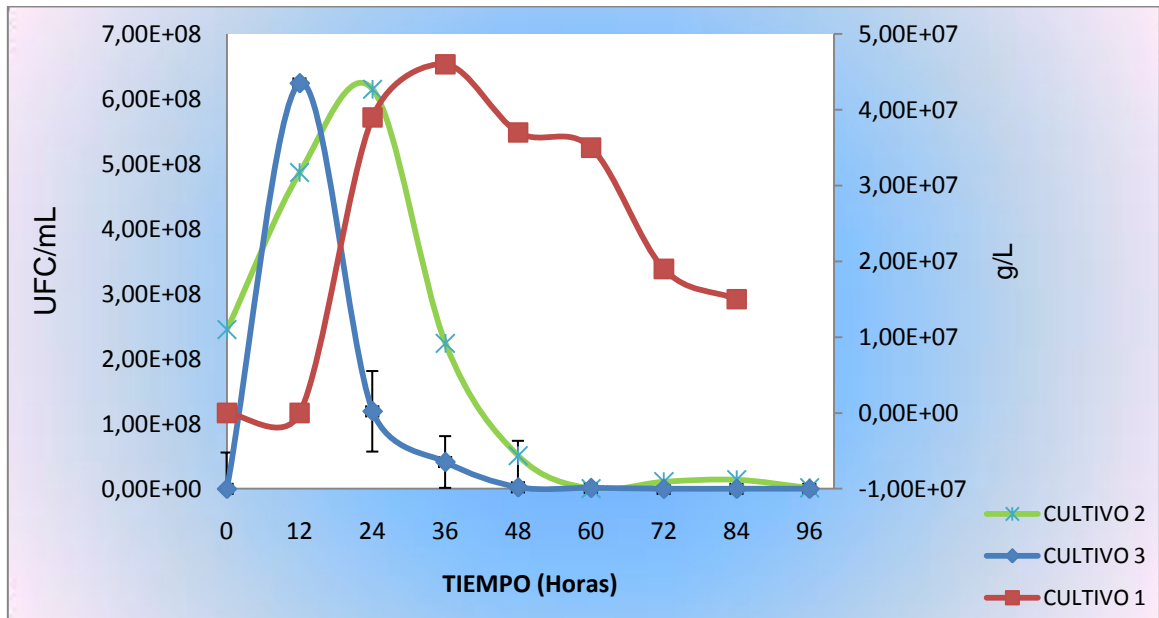


Figura 11. Crecimiento de los probióticos en los medio de cultivo.

4.7.3 Comparación de producción de ácido láctico en los 3 medios

La producción de ácido láctico, la máxima producción se obtuvo en el cultivo 3 (14 g/L) a 48 horas de fermentación. Esto se debe a la alta concentración de nutrientes que tiene el cultivo lo que facilita que las bacterias metabolicen los azúcares para producir ácido láctico. Como se muestra en la figura 8 que la menor producción se da en el cultivo 1 que nada más esta compuesto de suero lácteo, como lo menciona Urribarrí, 2000, que el suero tiene alta concentración de proteínas pero para mejorar el crecimiento bacteriano y aún así tener mayor producción de ácido láctico se sugiere la adición de fuentes proteicas. Como resultado obtenido puedo confirmar lo anterior, agregándole peptona de caseína y extracto de carne al suero se tiene una mayor producción de ácido láctico.

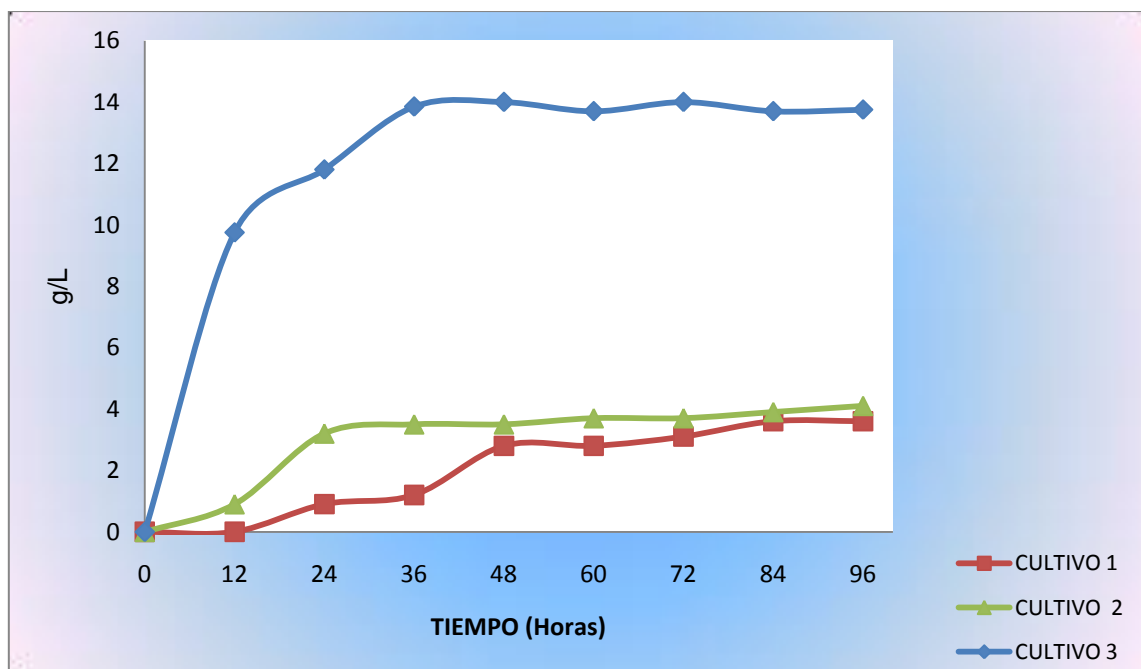


Figura 12. Resultados de producción de ácido láctico

CONCLUSIONES

Se lograron purificar e identificar las 19 cepas de microorganismos probióticos pertenecientes a la colección de centro de microbiología aplicada, manteniendo 8 cepas de cocos Gram positivos y 11 cepas bacilos Gram positivos.

El método de conservación que se realizaron a las 19 cepas purificadas fueron métodos de conservación a mediano y largo plazo, basados en la congelación y liofilización que permiten obtener un mayor porcentaje de recuperación de células viables después del proceso.

El empleo del suero permite mantener las propiedades funcionales de las cepas cultivadas, pero para obtener una mayor producción de microorganismos probióticos es necesario agregarle otra fuente de nitrógeno como peptona de caseína, extracto de carne y además de algunas sales ya mencionadas anteriormente.

En este estudio se encontró que la cepa de tabasco es una bacteria probiótica que produce hasta 14 g/L de ácido láctico en el medio de cultivo 3. La concentración de fuente de carbono y nitrógeno, cumple un rol importante en la conversión completa de la glucosa para la producción de ácido láctico.

Las cinéticas de producción de ácido láctico, biomasa, viabilidad de las células dependen del sustrato de fermentación y del tiempo de fermentación. En el cultivo 3, la producción de ácido láctico y la viabilidad de las células son considerables, por lo cual este sustrato podría ser utilizado para la producción comercial de microorganismos probióticos, dado a su bajo costo de obtención.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Amores R.**, Calvo A., Maestre J.R.; Martínez Hernández D. **Probióticos**. Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid. Rev. Esp. Quimioterap, junio 2004; vol. 17 (Nº 2)
- Barrera S.**; Salas C.; Ciampi L. (2002) Aislamiento y esporulación de *Helminthosporium solani*. En XII Congreso Nacional de Fitopatología. Puerto Varas X Región. Chile. p 34.
- Barró Rodríguez Luis.** **Alimentos Funcionales.**; XIII Congreso Nacional Farmacéutico Granada, octubre 2002
- Chamorro Losada.** Tecnología de alimentos. **El análisis sensorial de los quesos.** Mundi-prensa, 2002pp 38-235.2002
- Chasquibol S.** Nancy, Lengua C. Laura, Delmás Inés, Rivera C. Dolores, Bazan Doras, Aguirre M. Rosa, Bravo Martha. **Alimentos Funcionales ó Fitoquímicos, Clasificación e Importancia.** Revista Quím. Vol. 5 Nº 2, 2003. Pp 7-12.2007
- Ferrer Lorente B.**; Dalmau Serra J.; **Alimentos Funcionales: Probióticos.** Revista UNIVA. La Universidad Católica. Año XXII Núm. 58, pp10-43 Mayo-Agostos 2007. <http://Revista.Univa.Mx/N58/Art.%20coronadorepor.Html>.
- Gallardo-Nieto J.L.**; **Situación actual y perspectiva de la producción de leche de bovino en México 2010.** <http://www.sagarpa.gob.mx/ganaderia/Publicaciones/Lists/Estudios%20de%20situacion%20actual%20y%20perspectiva/Attachments/22/sitlech05.pdf>.
- Galván-Díaz M.** Proceso básico de la leche y el queso. Revista Digital Universitaria. pp 13-45 10 de septiembre 2005.Volumen 6 numero 9.
- Gamazo C.**, Lopéz-Goñi I., Días R. “Manual práctico de Microbiología”. Barcelona, España.3º edición. Editorial MASSON, S.A. Gallardo2005 pp. 29-43. 2003
- García Galaz A.**, Pérez Morales R. y Acedo Félix E.; Probióticos: ¿Una opción saludable en alimentación?; Coordinación de Ciencia de los Alimentos. Pp 15-30 Venezuela, 2005
- Gómez-Alcántara A.**; Cervantes-Escoto F; Reyes-Altamirano J.; Garza López Jesús Ma. La competitividad del sector quesero en México: el caso del Valle de Tulancingo, Hidalgo, pp 5-18. 2007.

- Hernández** Alicia, Alfaro Ileana, Arrieta Ronald. Microbiología Industrial. Edición gráfica. Editorial EUNED. Junio 2003. pp 87-267
- Inda** Cunningham Arturo E. **Optimización de rendimiento y aseguramiento de inocuidad en la industria quesera.** Saltillo, Coahuila, México. 2000 pp.63-157.
- Jiménez-Vera** R.; González-Cortés N.; Magaña-Contreras A; Chab-García C.; Zetina-Moreno Z; **Crecimiento de biomasa probiótica en sustratos naturales;** Semana de Divulgación y Video Científico 2008.
- López** A, García-Garibay M., Quintero-Ramírez R., López-Munguí A. **Biología alimentaria.** Editorial Limusa, 2002 - 636 página.
- Mafart** P. y Béliard, E. 1994. **Ingeniería Industrial Alimentaria.** Volumen 1. Procesos físicos de conservación. Editorial Acirbia, S.A. Zaragoza. pp 27, 1999
- Martínez** Valdivieso, R. (2007). **Simposium sobre Bacterias Probióticas.** IX Congreso Latinoamericano de Microbiología e Higiene de los Alimentos. 16 al 18 de Mayo de 2007. Isla de Margarita, Estado Nueva Esparta. Venezuela. En Memorias del Congreso.
- Mena**, A. **Alternativas de utilización del suero.** Curso control y procesamiento de productos lácteos. Fundación CIEPE. San Felipe, Venezuela. Pp 58-69. 2003.
- Montañez**, O; **Uso del lactosuero como ingrediente en productos alimenticios.** U.C.V. Caracas. (trabajo especial de grado) pp 71-87. 2000.
- Naidu**, A.S., Biblack, W.R., Clemens, R.A. (1999)-. **Probiotic spectra of lactic acid bacteria (LAB).** Crit. Revs. Food Sci. & Nutr., 39: 13-126.
- Parra** Huertas Ricardo Adolfo. **Lactosuero: importancia en la industria de alimentos.** Septiembre del 2008. Tunja, Colombia.
- Rico-Molina** D.; Hernández-Sánchez H.; **Aprovechamiento del suero de quesería, para la elaboración de un alimento;** Congreso nacional de Biotecnología y Bioingeniería; VII Simposio Internacional de producción de Alcoholes y Levaduras, 2005.
- Rodríguez** Juan Manuel. Microorganismos y salud. **Bacterias lácticas y Bifidobacterias probióticas.** Editorial Complutense S.A. 1º edición: diciembre 2006.
- Salminen** S., Roberfroid M., Ramos P. Y., Fonden R. (1998). **Prebiotic substrates and lactic acid bacteria.** En: Lactic Acid Bacteria 2. Edition (Salminen S. y von Wright A., eds.) Marcel Dekker, Inc., New York. pp. 343-358

- Sanz Y.;** Collado M.C.; Dalmau J.; **Probióticos: criterios de calidad y orientaciones para el consumo.** Acta pediátrica Española, vol. 16 núm. 9 2003.
- Sarmiento** Rubiano L. A.; **Alimentos funcionales, una nueva alternativa de alimentación.** Revista ORINOQUIA- universidad de los Llanos- Villavicencio, Meta. Colombia. 2006 Volumen 10 núm. 1 año. pp 5-9.
- Sierra-Alonso I,** Morante-Zarcero S., Pérez-Quintanilla D. Ciencias Experimentales y Tecnológicas. **“Experimentación en Química Analítica”.** Editorial DYKINSO, S.L. Madrid, 2007. pp 53-161.
- Spreer** Edgar; lactología industrial.”**Leche preparación y elaboración, máquinas, instalaciones y aparatos, productos lácteos”.** Edit. ACRIBIA, S.A. 2º edición. Zaragoza, España 1991. pp.527- 617.
- Urcia F.;** Guevara M. (2002) **Eficacia de medios de cultivo con infusiones de variedades de papa en la identificación del Trichophyton rubrum.** Rev. Perú Med. Exp. Salud Pública. 19 (4):206-208.
- Urribarrí** Lauris, Alex Vielma, Gisela Paéz, José Ferrer, Zulay Mármol y Eduardo Ramones; **Producción de ácido láctico a partir de suero de leche, utilizando lactobacillus helveticus en cultivo continuo.** Revista Científica, FCV-LUZ / Vol. XIV, N° 4, 297 - 302, 2004.
- Valencia-** Denicia E., Ramírez -Castillo M. L. **La industria de la leche y la contaminación del agua.** Elementos No. 73, Vol. 16, Enero - Marzo, 2009, Página 27. Revista Elementos, Ciencia Y Cultura [Http://Www.Elementos.Buap.Mx/Num73/Htm/27.Htm](http://www.Elementos.Buap.Mx/Num73/Htm/27.Htm).
- Veisseyre, R.** **Lactología industrial.** Zaragoza. Editorial ACRIBIA S.A de C.V. pp459 1991.
- Villegas** de Gante, Abraham. **Tecnología quesera.** Editorial TRILLAS, S.A. de C.V.1º edición septiembre 2004 México. pp 13,26-398.
- Zavala** Mauricio J.; **Aspectos Nutricionales Y Tecnológicos De La Leche.** Dirección General De Promoción Agraria Ministerio De Agricultura. Dirección De Crianzas. Julio 2005.
- Zúñiga-Estrada, A.,** Santos-López, E.M., Sánchez-Ortega I., Román-Gutiérrez, A.D., Castro-Rosas J., Filardo-Kerstupp S. **Los probióticos en la alimentación humana.** Centro de Investigaciones Químicas. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Pachuca-Tulancingo.

Zamora-Rodríguez; Aislamiento, identificación y conservación de cultivos de bacterias lácticas antagonista de microbiota contaminante de sangre de matadero. Universidad de Girona, instituto de Tecnología Agroalimentaria. Tesis doctoral, pp 180-259 julio 2003

ANEXOS

Anexo A. Tinción de Gram

- Recoger muestra estéril
- Hacer el extendido en espiral
- Dejar secar a temperatura ambiente
- Fijar la muestra al calor (flameando 3 veces aprox.)
- Agregar azul violeta (cristal violeta) y esperar 1 minuto. Este tinte dejara de color morado las bacterias Gram positivas.
- Enjuagar con agua y agregar lugol, esperar 1 minuto
- Enjuagar con agua
- Agregar safranina y esperar 30 segundos. Este tinte dejara de color rosado las bacterias Gram negativas.
- Enjuagar con agua.

Anexo B. Descripción de la técnica de estría por agotamiento

Con el asa estéril tomamos la muestra y hacemos extensiones en la placa. Volvemos a esterilizar el asa de siembra y extendemos parte de la extensión anterior en otra dirección. Volvemos a esterilizar el asa de siembra y volvemos a extender parte de la segunda extensión en otra dirección. Esterilizamos y repetimos la operación.

Anexo C. Determinación de ácido láctico

- Se midió 9 mililitros de cada una de las muestras
- Agregando 3 gotas del indicador que fue fenolftaleína, se agito suavemente. Se lleno la bureta con la solución de NaOH 0.1 M hasta nivelar en el 0. Enseguida se realizo la valoración agregando gota a gota la solución de NaOH 0.1 M desde la bureta a cada uno de las muestras, se detiene la valoración en el momento que aparezca la coloración rosada que persista por más de 30 segundos.