

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
“ANTONIO NARRO”**



DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL

DEPARTAMENTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

**Evaluación del residuo industrial suero lácteo de cabra para la
propagación de microorganismos probióticos.**

LILIANA ROMERO RIOS

T E S I S

Presentado como requisito parcial para

Obtener el Título de:

INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México, diciembre 2010.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA

"ANTONIO NARRO"

DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL

DEPARTAMENTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

**EVALUACIÓN DEL RESIDUO INDUSTRIAL SUERO LÁCTEO DE CABRA 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:

LILIANA ROMERO RIOS

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

Dra. Dolores G. Martínez Vázquez
VOCAL II

M.C. Lorenzo Suarez 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

Le agradezco a Dios La razón de mi existencia, por darme una vida llena de bendiciones, salud y amor, por guiarme en este caminar de La vida. A ti señor porque hicistes realidad este sueño, por todo El amor con El que me rodeas y porque me tienes en tus manos.

A mi Universidad UAAAN, por darme la oportunidad de construirme como profesionista.

A mis profesores del departamento que influyeron en mi formación profesional: M.C. Xochitl Ruelas Chacón, Q.F.B. Oscar Noé Reboloso Padilla, M.C. Laura Olivia Fuentes Lara, Dra. Lourdes Caballero, Q.F.B Carmen Julia, M.C Carmen Pérez, Dra. Verónica, M.C. María Hernández, Antonio Aguilera Carbo.

A mi asesor de tesis, Dr. Mario Cruz por su apoyo, colaboración, paciencia y asesoría brindada para el desarrollo de este proyecto de investigación.

En agradecimiento a mis padres por el apoyo recibido durante mi formación profesional.

GRACIAS

DEDICATORIA

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 mi corazón, pero quiero darles las gracias por formar parte de mi vida.

A ustedes los formadores de mi destino

*Porque gracias a su apoyo y consejo he llegado a realizar la más grande de mis metas. La cual constituye la herencia más valiosa que pudiera recibir. **A mis padres: Miguel Ángel Romero Cruz y María Guadalupe Rios Chacón.** En reconocimiento a todo, el apoyo brindado a través de mis estudios y con la promesa de seguir siempre adelante. Sabiendo que no existirá una forma de agradecer una vida de sacrificio y esfuerzo, quiero que sientan que el objetivo logrado también es de ustedes y que la fuerza que me ayudó a conseguirlo fue su apoyo. Con amor, cariño y admiración.*

*Como un testimonio de gratitud ilimitada, **a mi hija, Dafne Camila De los Santos Romero** por ser mi fuerza y templanza, porque su presencia ha sido y será siempre el motivo más grande de superación, que ha impulsado para lograr esta meta. Te amo.*

*Como una muestra de mi amor y cariño, agradezco, por todo el amor, comprensión tolerancia y el apoyo brindado **A mi esposo, Roberto De los Santos Vázquez** por estar siempre conmigo en las buenas y en las malas, y por demostrarme que el amor verdadero existe, te amo. Gracias*

*Porque eres de esa clase de personas que todo lo comprenden y dan lo mejor de si mismos sin esperar nada a cambio... porque sabes escuchar y brindar ayuda cuando es necesario porque te has ganado el cariño, admiración y respeto de todo el que te conoce. **A ti mi mejor y verdadera amiga, Nayeli del Rosario Monzón Toledo.** Sinceramente. Te dedico uno más de mis logros,*

A ustedes que me brindaron su apoyo moral y siempre me alentaron para seguir adelante mis hermanos queridos María del Rosario Romero Rios y Ángel Alberto Romero Rios. Son los más grandes hermanos que una gran hermana puede tener.

A todos los que de una u otra manera me brindaron su apoyo incondicional y me hicieron ver que no estoy sola, a mis cuñados, Juan Antonio De los Santo Vázquez, Dania de Jesús Cruz Velásquez y Martha Elena De los Santo Vázquez. A mis tíos, abuelos y primos. A todos ellos que me disculpen por no mencionar su nombre pero los llevo en mis pensamientos y sobretodo en mi corazón de una forma muy especial, Gracias.

GRACIAS

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

Dra. Dolores Gabriela Martínez Vázquez

ÍNDICE DE CONTENIDO

	Pág.
ÍNDICE DE CUADROS	i
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ii
RESUMEN	iii
I. INTRODUCCIÓN	1
HIPOTESIS	3
OBJETIVOS.....	3
OBJETIVO GENERAL	3
OBJETIVOS ESPECIFICOS	3
JUSTIFICACION.....	4
II. REVISION DE LITERATURA	5
2.1 Alimentos Funcionales	5
2.2 Leche de cabra.....	7
2.2.1 Definición.....	7
2.2.2 Producción y Consumo.....	8
2.2.3 Composición e influencia sobre sus derivados.....	11
2.3 Productos de leche de cabra	15
2.3.1 Quesos	16
2.4. Suero lácteo de leche de cabra	18
2.5 Probióticos	18
2.5.2 Acción de los Probióticos a nivel de Tracto Gastrointestinal (TGI).....	20
2.5.3 Resistencia a Microorganismos Patógenos.....	21
2.5.4 Efectos Inmunológicos.....	22

2.5.5 Alimentos Probióticos	23
2.5.6 Quienes pueden consumir Probióticos	24
2.5.7 Dosis.....	24
2.6 Tipos de Microorganismos Probióticos	25
2.6.1 Microorganismos Probióticos	25
2.7 Bacterias acido-lácticas (BAL)	29
2.7.1 Generalidades	30
2.8 Medios de cultivos acido láctico	31
2.9 Cinéticas de producción.....	31
2.9.1 Definición.....	31
2.9.2 Cinética de crecimiento de un cultivo.....	31
III. MATERIALES Y METODOS.....	34
3.1 Activación de los microorganismos	34
3.1.1 Obtención de la muestra.....	34
3.2 Acondicionamiento de material para anaerobiosis	34
3.3 Preparación de medios de cultivo	35
3.3.1 Medio MRS en cultivo líquido	35
3.3.2 Medio Agar MRS.....	36
ETAPA 1. IDENTIFICACION Y CONSERVACIÓN DE MICROORGANISMOS PROBIOTICOS.	37
3.4 Identificación de las cepas	37
3.4.1 Técnica de tinción de Gram.....	38
3.5 Purificación de las cepas	38
3.6 Conservación de las cepas	38
3.6.1 Liofilización.....	38

3.6.2 Congelación	38
ETAPA II: SELECCIÓN DE LA CEPA DE MAYOR CRECIMIENTO UTILIZANDO COMO MEDIO DE CULTIVO EL SUERO DE CABRA.....	39
3.7 Preparación del inculo.....	39
3.7.1 Selección de las cepas en cultivo con suero lácteo de cabra.....	39
ETAPA III EVALUACION CINETICA DE LA PRODUCCIÓN DE LOS PROBIOTICOS EN TRES DIFERNETES MEDIOS DE CULTIVO	39
3.8 Preparación del cultivo 1	39
3.9 Preparación del cultivo 2.....	40
3.10 Preparación del cultivo 3	41
3.11 Cinética de crecimiento.....	42
3.11.1 Evaluación del crecimiento microbiano en los diferentes medios de cultivo.....	42
3.11.1.1 Diluciones seriadas.....	43
3.11.2 Determinación de acido láctico	43
3.11.3 Determinación de biomasa.....	43
IV. RESULTADOS.....	44
ETAPA 1. IDENTIFICACION Y CONSERVACIÓN DE MICROORGANISMOS PROBIOTICOS	44
4.2 Purificación de las cepas	45
4.2.1 Descripción de las cepas.....	46
4.3 Conservación de las cepas.....	47
4.3.1 Liofilización.....	47
4.3.2 Congelacion	48
ETAPA II. SELECCIÓN DE LA CEPA CON MAYOR CRECIMIENTO EN EL SUERO DE CABRA	49

4.4 Desarrollo de tres diferentes medios de cultivo variando la relación C: N en base a suero lácteo de cabra.....	50
4.5 Evaluación de los tres diferentes medios de cultivo	51
4.5.1 Determinación de ácido láctico en medio de cultivo 1	52
4.5.2 Determinación de ácido láctico en medio de cultivo 2	52
4.5.3 Determinación de ácido láctico en medio de cultivo 3	53
4.5.4 Comparación de los resultados de los medios de cultivo	54
4.5.5 Determinación de biomasa en cultivo 1	55
4.5.6 Determinación de biomasa en cultivo 2	55
4.5.7 Determinación de biomasa en cultivo 3	56
4.5.8. Comparación de resultados en determinación de Biomasa.....	57
4.5.9 Cinética de crecimiento cultivo 1	58
4.6.0 Cinética de crecimiento cultivo 2	58
4.6.1 Cinética de crecimiento cultivo 3.....	59
4.6.2 Comparación de resultados UFC/mL	60
V. CONCLUSIONES	61
VI. LITERATURE CITADA.....	62

ÍNDICE DE CUADROS

	Pág.
Cuadro 1. Fracciones de caseínas en leche de cabra y de vaca (por ciento).....	12
Cuadro 2. Alimentos y bebidas lácteas fermentadas con probióticos	27
Cuadro 3. Temperatura Óptima de Crecimiento	32
Cuadro 4. Clasificación de los Microorganismos según el pH	33
Cuadro 5. Composición del medio de cultivo líquido MRS.....	35
Cuadro 6. Composición del medio de cultivo Agar MRS.....	36
Cuadro 7. Reactivos para la preparación del cultivo 2	40
Cuadro 8. Reactivos para la preparación del cultivo 3	41
Cuadro 9: Identificación microscópica de las cepas probióticas seleccionadas. ..	44
Cuadra 10. Análisis bromatológico del suero lácteo de cabra	50
Cuadro 11.Relación C: N de los medios de cultivo 1,2 y 3.	51

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1A. Frasco con medio de cultivo liquido, figura 1B. Frasco con medio de cultivo solido.....	35
Figura 2. reactivos utilizados para preparar medio de cultivo MRS.....	36
Figura 3. Caja petri conteniendo Agar MRS	37
Figura 4. Siembra por el método de estriado.....	45
Figura 5. Cepas probioticas purificadas	46
Figura 6. Cepas probioticas liofilizadas.....	48
Figura 7. Microorganismos probioticos congelado	48
Figura 8. Crecimiento de la cepa.....	49
Figura 9. Determinación de acido láctico en cultivo 1.	52
Figura 10. Determinación de acido láctico en cultivo 2	53
Figura 11. Determinacion de acido lactico en cultivo 3	53
Figura 12. Comparacion de resultados.	54
Figura 13. Determinacion biomasa cultivo 1	55
Figura 14. Determinación de biomasa cultivo 2	56
Figura 15. Determinación de biomasa cultivo3	56
Figura 16. Comparacion de resultados en contenido de biomasa.....	57
Figura 17. UFC/mL del cultivo 1	58
Figura 18. UFC/mL del cultivo 2	59
Figura 19. UFC/mL del cultivo 3	59
Figura 20. Comparacion de resultados UFC/MI.....	60

RESUMEN

El presente trabajo tiene como objetivo seleccionar una de las diecinueve cepas evaluadas que presente mayor producción en los tres medios diseñados en base a suero lácteo de cabra. Para dicho estudio se utilizaron 19 cepas que pertenecen a la colección de microorganismos probióticos de la empresa GBS Global S.A de C.V, estas cepas fueron identificadas de acuerdo a las muestras de donde se aislaron. Primeramente se identificaron las cepas, por lo cual fueron inoculadas en caldo MRS e incubadas en reactores de anaerobiosis a 37°C por 24 horas. Posteriormente fueron sembradas en cajas Petri con Agar MRS, se realizó la tinción de Gram para observar al microscopio óptico e identificar la morfología. Los resultados mostraron que 9 de estas cepas presentan forma de bacilos y las 10 restantes forma de cocos. Las cepas fueron purificadas con estría por agotamiento en placas de Agar MRS. Una vez que las bacterias se observaron puras, se almacenaron en congelación en tubos de Ependorf y en liofilización. Se evaluó el suero lácteo de cabra como medio de cultivo para microorganismos probióticos inoculando en el las 19 cepas probióticas para evaluar el crecimiento microbiano y seleccionar la que presentó el mayor crecimiento. La cepa de jocoque (bacilos Gran positivos) fue la seleccionada de acuerdo a los resultados. Se desarrollaron 3 medios de cultivos diferentes variando la relación C: N, elaborados a base de suero lácteo de cabra, en ellos se inoculo la cepa que presento mayor crecimiento microbiano (jocoque), las variables evaluadas en los 3 medios de cultivo fueron: cinética de crecimiento, determinación de ácido láctico y determinación de biomasa. Los resultados obtenidos muestran que el cultivo 2 relación C: N= 1. /1 presentó los valores más altos de producción de biomasa. El cultivo 3 relación C: N=.0.9/1 el crecimiento microbiano y la producción de ácido láctico

PALABRAS CLAVES:

Suero lácteo de cabra, microorganismos probióticos, cocos, bacilos, cinéticas de crecimiento, medios de cultivos.

I. INTRODUCCIÓN

Los probióticos son los microorganismos vivos adicionados a algunos alimentos para mejorar el balance microbiano intestinal de quien los consume. En el tracto gastrointestinal coexisten bacterias tanto inocuas como patógenas. Mientras se encuentren en un adecuado balance intestinal, los efectos adversos de los patógenos no se manifiestan. Los problemas intestinales diarreico-infecciosos se manifiestan cuando, por diferentes causas, los patógenos presentan un sobrecrecimiento. Los probióticos son bacterias inocuas para el huésped que los consume, pero que además tienen un marcado efecto inhibitor y bactericida contra patógenos responsables de enfermedades diarreicas. Así, estas bacterias restablecen el balance intestinal, lo que se traduce en un efecto protector.

Son numerosos los beneficios que los alimentos con probióticos pueden aportar, ya que no solamente actúan a nivel de tracto gastrointestinal combatiendo patógenos. Además, juegan un papel benéfico importante en el metabolismo de lípidos, disminuyendo las concentraciones sanguíneas de triglicéridos y de colesterol. Por otro lado, algunos estudios muestran que el consumo de probióticos disminuye la generación de cáncer y la recurrencia de infecciones respiratorias y urogenitales, entre otras.

Los microorganismos probióticos al ser ingeridos en cantidades adecuadas producen efectos benéficos para la salud, además de los efectos de nutrición. Estos efectos a la salud, están relacionados con mejoría en enfermedades infecciosas, enfermedades crónicas intestinales como colitis ulcerosa, inmunomodulación, biodisponibilidad de nutrientes, enfermedades cardiovasculares, diabetes mellitus no insulino dependiente, obesidad, osteoporosis y cáncer.

Otros de los beneficios de los alimentos probióticos es la mejora del balance de la flora intestinal, donde se encuentra la mayoría de las defensas del cuerpo, ayudando a mejorar los síntomas y problemas como la astenia, problema de defensas, períodos de lactancia y reforzar el sistema inmunológico. Los alimentos denominados probióticos son cultivos simples o mezclados de estos microorganismos: las bacterias probióticas, las cuales al ser consumidos tanto por humanos como por animales, sobreviven al paso por el tracto gastrointestinal y se implantan en el colon o intestino delgado afectando favorablemente al huésped en términos de mejora de salud. Los lácteos probióticos afectan menos a las personas con intolerancia a la lactosa.

En los últimos años, debido a la alta demanda de los productos adicionados con probióticos y los múltiples beneficios nutricionales y terapéuticos asociados, la investigación sobre estos microorganismos ha progresado considerablemente, se han realizado avances notables en su aislamiento e identificación. El conocimiento de los diversos aspectos del estudio de los probióticos y sus beneficios es esencial para estudiarlas en otras materias primas como en leche de cabra.

El Suero de Leche de Cabra, es uno de los materiales más contaminantes que existen en la industria alimentaria, 1,000 litros generan cerca de 35 kg de demanda biológica de oxígeno y cerca de 68 kg de demanda química de oxígeno. Esta fuerza contaminante es equivalente a la de las aguas negras producidas en un día por 450 personas. En México alrededor del 10% de la producción de suero, es empleado para transformarlo en productos de valor agregado. Por lo que, es importante que la industria láctea, cuente con diferentes opciones para emplear el Suero de Leche de Cabra como base de alimentos para consumo humano, con el fin adicional de no contaminar el medio ambiente y de recuperar, el valor monetario del mismo (Lomas y Rojas, 2005).

HIPOTESIS

Es posible que ciertos microorganismos probióticos pueden crecer en el suero lácteo de cabra residuo industrial, el cual únicamente se utiliza como alimento para cerdos por lo cual se busca darle un mayor valor agregado, por ejemplo, como medio de cultivo para la producción de microorganismos probióticos, utilizando tres medios de cultivo diferentes en su relación carbono-nitrógeno.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

1. Seleccionar la cepa que presente mayor crecimiento, de las diecinueve cepas pertenecientes a la colección de probióticos de la empresa GBS Global S.A. de C.V. Además de evaluar cinéticamente el crecimiento microbiano en tres medios de cultivo diseñados con suero lácteo de cabra, variando la relación carbono nitrógeno en los medios.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Caracterizar morfológicamente las 19 cepas probióticas pertenecientes a la colección de la empresa GBS Global S.A. de C.V.
2. Purificar y conservar las cepas probióticas por tres métodos, de corto, mediano y largo plazo.
3. Seleccionar la cepa que presente el mayor crecimiento utilizando como medio de cultivo suero lácteo de cabra.
4. Diseñar tres medios de cultivo a base de suero lácteo de cabra variando la relación C: N, para la evaluación del crecimiento de las cepas probióticas.
5. Evaluar cinéticamente la producción de biomasa, ácido láctico y UFC/mL de la cepa seleccionada en tres medios diseñados.

JUSTIFICACION

Hoy en día las exigencias del mercado y el desarrollo de nuevos productos probióticos son mayores, por lo que las tendencias globales se están enfocando hacia el desarrollo de nuevos proyectos en búsqueda de resultados favorables que cumplan con los criterios establecidos por la FAO-OMS. Según estas organizaciones mundiales, un probiótico es un suplemento dietético microbiano (principalmente localizado en leches fermentadas y productos lácteos) que consumido en ciertas cantidades es capaz de ejercer beneficios sobre la salud, que van más allá de la nutrición básica.

En las últimas décadas, nuestros hábitos dietéticos han variado. Ya no se trata únicamente de reducir los alimentos cuyo exceso puede ser perjudicial para la salud, sino de buscar aquellos que tengan beneficios saludables y ayuden a retrasar la aparición de algunas enfermedades.

Existe un amplio interés científico e industrial hacia el desarrollo de bioprocesos novedosos que puedan mejorar el rendimiento y la productividad tanto en cantidad como en calidad de los productos desarrollados, buscando así también un ahorro económico y la manera de no contaminar más el medio ambiente. Un gran aporte a la industria nacional, sería la producción de los probióticos a partir de suero lácteo de cabra, con la finalidad de ampliar sus aplicaciones a otros alimentos, ya sea para consumo humano o animal. En el estado de Coahuila se tienen sustratos que pueden ser una fuente potencial de bacterias lácticas con actividades probióticas las cuales tienen un bajo costo económico y por el momento no se les da ningún uso.

Debido a esto la presente investigación se realizó con el fin de darle un uso al residuo (suero lácteo de cabra), utilizándolo como sustrato para el crecimiento microbiano y posteriormente para el desarrollo de microorganismos probióticos. Ya que en la actualidad el suero de cabra es utilizado únicamente como desecho, además de que este presenta un alto riesgo de contaminación al medio ambiente.

II. REVISION DE LITERATURA

2.1 Alimentos Funcionales

Se consideran alimentos funcionales aquellos que, con independencia de aportar nutrientes, han demostrado científicamente que afectan beneficiosamente a una o varias funciones del organismo, de manera que proporcionan un mejor estado de salud y bienestar. Estos alimentos, además, ejercen un papel preventivo ya que reducen los factores de riesgo que provocan la aparición de enfermedades. Entre los alimentos funcionales más importantes se encuentran los alimentos enriquecidos.

Los alimentos funcionales deben consumirse dentro de una dieta sana y equilibrada y en las mismas cantidades en las que habitualmente se consumen el resto de los alimentos.

Mientras que los consumidores europeos empiezan a familiarizarse con los alimentos funcionales, los ciudadanos japoneses llevan décadas consumiendo estos productos que gozan de gran popularidad. A mediados de la década de los 80, el incremento de la esperanza de vida de la población japonesa y el consiguiente aumento del gasto sanitario, provocaron que el gobierno nipón se planteara la necesidad de desarrollar productos alimenticios que mejorasen la salud de los ciudadanos para garantizar un mayor bienestar y calidad de vida.

En otros países, como Canadá y EEUU, el consumo de alimentos funcionales está muy extendido y aproximadamente un 40% de la población ya los ha incorporado a su dieta diaria.

Surgieron de la necesidad de compensar una alimentación desequilibrada, muy rica en grasas saturadas y pobre en determinadas grasas insaturadas, minerales, vitaminas y fibra.

En España, se comercializan actualmente alrededor de 200 tipos de alimentos funcionales, como por ejemplo: zumos a los que se les ha añadido vitaminas, minerales, fibra, etc., cereales con fibra y minerales, o leches enriquecidas con calcio, ácidos grasos omega-3, ácido oleico o vitaminas.

Los alimentos funcionales pueden formar parte de la dieta de cualquier persona. Pero además, están especialmente indicados en aquellos grupos de población con necesidades nutricionales especiales (embarazadas y niños), estados carenciales, intolerancias a determinados alimentos, colectivos con riesgos de determinadas enfermedades (cardiovasculares, gastrointestinales, osteoporosis, diabetes, etc.) y personas mayores.

Al iniciarse el nuevo milenio una nueva área dentro de la ciencia de los alimentos y de la nutrición se ha hecho presente con cada vez mayor intensidad, el área de los alimentos funcionales, que se definen como cualquier alimento al que se le ha añadido o que se le han eliminado uno varios ingredientes; o cuya biodisponibilidad de nutrientes se ha modificado con la particularidad de que algunos de sus componentes (sea o no nutriente) afecte a funciones vitales del organismo de manera específica y positiva (Fuller, 1994).

Los alimentos funcionales más relevantes y sobre los que recae la más sólida evidencia científica son los probióticos, microorganismos vivos representados fundamentalmente por los derivados lácteos fermentados.

La idea de los “alimentos funcionales” fue desarrollada en Japón durante la década de los 80`s (Vasconcelos, 2002) clasificó a los “alimentos funcionales” en tres categorías:

1. Alimentos a base de ingredientes naturales
2. Alimentos que deben consumirse como parte de la dieta diaria.

3. Alimentos que al consumirse cumplen un papel específico en las funciones del cuerpo humano incluyendo:
 1. Mejoramiento de los mecanismos de defensa biológica
 2. Prevención o recuperación de alguna enfermedad específica
 3. Control de las condiciones físicas y mentales
 4. Retardo en el proceso de envejecimiento

Existe la creencia de que los alimentos funcionales curan enfermedades, sin embargo la propiedad funcional está relacionada con el papel metabólico estructural o fisiológico sobre el crecimiento, desarrollo, mantenimiento y otras funciones normales del organismo; y no con la capacidad de tratar una patología. Los alimentos funcionales pueden prevenir pero no curar (Consumer, 2002).

Los alimentos funcionales más relevantes y sobre los que recae la más sólida evidencia científica son los probióticos, microorganismos vivos representados fundamentalmente por los derivados lácteos fermentados. Los prebióticos, como los fructanos tipo inulina, son el sustrato trófico de los probióticos y potenciales selectores de la flora colónica. La asociación de un prebiótico y un probiótico se denomina simbiótica. Se conocen innumerables sustancias con actividad funcional: fibra soluble e insoluble, fitosteroles, fitoestrógenos, ácidos grasos monoinsaturados y poliinsaturados, derivados fenólicos, vitaminas y otros fitoquímicos.

2.2 Leche de cabra

2.2.1 Definición

Una de las definiciones más conocidas establece que la leche es un líquido segregado por las glándulas mamarias de hembras sanas bien alimentada, sin calostro, de composición compleja, color blanco y opaco, dos veces más viscosa que el agua, de sabor ligeramente dulce, olor poco acentuado y de pH casi neutro (Santos, 1987).

2.2.2 Producción y Consumo

La producción de leche de cabra es uno de los principales objetivos de la cría de cabras, mas que la producción de carne. En el mundo hay mas personas que consumen leche de cabra que leche de vaca (Lesur, Luis 2004).

La producción de esta se incrementa con fuerza y rapidez después del parto en respuesta al rápido crecimiento del recién nacido, la cima se alcanza alrededor de los dos meses después del parto (Jerry Belanger 1987).

La producción de leche depende de la raza, de la habilidad productora heredada, de la calidad y cantidad de alimentación, de la salud de la cabra y de su sentimiento de confianza y seguridad, tanto durante la ordeña como fuera de ella.

La leche de cabra y sus derivados son recursos alimentarios que han recibido en los últimos años mayor atención mundial. Su producción se ha incrementado notablemente en las últimas dos décadas y por ello está contribuyendo cada vez más a mejorar la economía de productores, industriales y a incrementar el aporte nutrimental en varios sectores de consumidores. En algunas regiones se consume directa en forma líquida, aunque también se procesa obteniéndose derivados, principalmente queso, y además, en el caso de México, de dulce de leche o cajeta. Su composición tiene diferencias con la leche de vaca principalmente en el contenido de las fracciones diversas de caseínas, lo cual puede propiciar rendimientos queseros menores y efectos sobre la textura del producto. La composición en ácidos grasos libres es mayor, lo que hace a la leche de cabra, más susceptible a la lipólisis. Los contenidos mayores de ácidos grasos de cadena corta como butírico, caproico, cáprico y caprílico, le confieren al queso sabores diferentes y atractivos para los consumidores.

La leche que nos produce menos problemas es la de cabra, que es la más parecida a la humana y se asimila mucho más rápido, ya que sus partículas de grasa son más pequeñas que la de la leche de la vaca. Por eso en el régimen del

grupo 0 se elimina la leche directamente, y solo permite el consumo de lácteos transformados procedentes de cabra y oveja: yogurt, queso y cuajada

De acuerdo con la Federación Internacional de Lechería (FIL/IDF, 1999) la producción mundial de leche de cabra representaba el 2.1 por ciento del total de todos los tipos de leche producida en el mundo. Se calculó en el año 2000 que dicha producción fue de 12, 500,000 ton. Thomas y Haenlein (2004), utilizando datos de la Organización Mundial de la Alimentación (FAO por sus siglas en inglés), demostraron que de 1979 a 1998, la producción de leche de cabra en el mundo se incrementó en un 69 por ciento, muy por arriba de la leche de vaca y de oveja con 10 y 2 por ciento respectivamente. La producción de leche de cabra está aumentando a un ritmo ligeramente más alto que al que crece la población mundial (1.8 por ciento vs 1.4 por ciento) (Romero, 2004).

En 2002, México aportó aproximadamente el 1.2 por ciento del total de la producción mundial de leche de cabra con 131,200 toneladas métricas, ocupando el lugar 17 del mundo. Para el año de 2003 la FAO estimó una producción en México de 148,000 toneladas métricas manteniéndose constante en los últimos diez años (FAO, 2004), mientras que la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) informó que en el país se produjeron 150,305 toneladas métricas de leche de cabra (SAGARPA, 2004). En el periodo 2001 a 2003, esa Secretaría informó que el crecimiento en la producción de leche de cabra fue casi del 7 por ciento. Se calcula que la población de cabras en el mundo es aproximadamente de 700 millones de cabezas, de las cuales sólo el 5 por ciento se encuentra en Latinoamérica (35 millones) y aproximadamente de estas unos 9 millones en México (Anónimo, 2004). La FAO en 2004 estimó que la población de cabras en México no rebasaba 9.5 millones de cabezas (FAO, 2004).

Las principales razas caprinas en producción en México son Saanen, Alpina, Toggenburg, Nubia y Murciana, concentradas para la producción de leche en el altiplano Mexicano y Norte del País, principalmente en los estados de Coahuila (34.3 por ciento), Durango (28.2 por ciento), Guanajuato (15.5 por ciento), Zacatecas (8.2 por ciento), Jalisco (3.8 por ciento), Chihuahua (3.6 por ciento), Nuevo León (3.2 por ciento), Michoacán (2.5 por ciento) y el resto de los estados (7.6 por ciento) (Gurría Treviño, 2004).

Las tendencias en el mundo sobre el consumo de leche de cabra y sus derivados difieren entre países y aun entre continentes. De acuerdo con Peraza (1986), es posible observar cuatro situaciones:

1. En la mayoría de los países de Asia y África la leche de cabra se consume en forma líquida en sistemas de autoconsumo familiar.
2. En los países mediterráneos: Francia, España, Italia y Grecia, la mayor parte de la producción de leche caprina se destina a la elaboración de quesos.
3. En países de influencia anglosajona como Canadá, Estados Unidos, Inglaterra y Australia, la leche de cabra se consume pasteurizada.
4. En América Latina, se ubica un sistema mixto en vías de cambio. En Brasil que es el primer país con el mayor inventario de caprinos, la leche se consume tanto en forma líquida como transformada en quesos. En México en forma similar pero también como dulces y cajeta.

En México, la demanda de derivados de leche caprina, se ha incrementado paulatinamente a través del consumo de algunas variedades de quesos y confites como cajetas y dulces similares. De la producción total anual estimada, porque no existen datos oficiales, el 70 por ciento de la leche se consume cruda o se utiliza para elaborar quesos artesanales y su comercialización es local. El 30 por ciento se usa en la industria, de este porcentaje, alrededor del 20 por ciento se

transforma industrialmente en queso y el 10 por ciento restante en cajeta y dulces (Trujillo y Almudena, 2004).

La leche de cabra como sustituto de la tradicional leche de vaca ha comenzado a merecer la atención de gobiernos y entidades privadas. El interés radica en la potencialidad que tienen estos productos, ya que pueden ser consumidos por grupos que presentan intolerancia a los lácteos de origen bovino. Además, se pretende conocer con mas detalle, el efecto de la manipulación de los ingredientes de los alimentos sobre las características físicas y químicas de la leche caprina, en particular sobre la composición de la grasa, asociada a ciertos beneficios nutrimentales en niños, así como en el desarrollo de alimentos funcionales y productos derivados con características sensoriales demandadas por consumidores. Este alimento y sus derivados, son también una opción para dinamizar las economías regionales.

2.2.3 Composición e influencia sobre sus derivados

El valor como materia prima de la leche caprina para fabricar productos derivados está asociado con su composición y propiedades fisicoquímicas, así como su carga microbiana y disponibilidad en el mercado.

De forma similar a la leche de otras especies de hembras de mamíferos, la leche de cabra está mayoritariamente compuesta por agua (85 a 88 por ciento) y además de cantidades apreciables de grasa, proteína, lactosa, sales minerales, vitaminas y otras sustancias en cantidades menores (Juárez, 1986).

La leche caprina, no es como se puede creer, un alimento de composición más o menos definida y constante ya que se ha observado, una gran variabilidad en su composición, originada principalmente por factores genéticos y fisiológicos como raza, características individuales, estado de lactación, manejo, clima y composición de los alimentos.

2.2.3.1 Minerales

La leche es la principal fuente de calcio dietario para el ser humano, sin importar si es de cabra, de vaca u otra especie. Comparativamente, la leche de cabra aporta 13% más de calcio que la leche de vaca (Rodden 2004). La leche de cabra no es una adecuada fuente de otros nutrientes como hierro, cobre, magnesio y cobalto (Grand-Pierre *et al.* 1988; Dostaloya 1994).

2.2.3.2 Proteína

Las proteínas de la leche pueden dividirse en dos grandes grupos, las caseínas que se encuentran en la leche principalmente en el estado coloidal y las proteínas del suero disueltas en éste (Angulo y Montoro, 2004).

Las proteínas que contiene la leche de cabra, tienen dos orígenes diferentes: unas se sintetizan en la glándula mamaria de la ubre, como es el caso de los diferentes tipos de caseínas y proteínas del suero como beta lactoglobulinas y alfa albúminas, y las que provienen de la vía sanguínea como seroalbúminas.

Dependiendo de la raza y de otros factores el contenido promedio de proteína de la leche de cabra (28.2 g/L) es ligeramente inferior al de la leche de vaca (31.1 g/L), aunque el de caseínas es muy parecido (23.3 g/L). Las caseínas están constituidas por cuatro fracciones principales: alfaS1, alfaS2, beta y kappa. (Cuadro 1)

Cuadro 1. Fracciones de caseínas en leche de cabra y de vaca (por ciento)

CASEINA	CABRA	VACA
ALFA S1	5	35
ALFA S2	25	10
BETA	50	40
KAPPA	20	15
RELACION ALFA/BETA	30/50	45/40

Las cantidades y composición de las caseínas determina el tamaño de las micelas de proteína de la leche, debido principalmente a los tipos de aminoácidos y los locus que ocupan en las cadenas polipeptídicas y las diferentes cantidades de grupos fosforados. Todo lo anterior varía las cargas eléctricas, su peso molecular y su hidrofobicidad lo que puede causar cambios en las propiedades físicas y químicas de las caseínas.

La capacidad de la leche de cabra a la coagulación está ligada directamente con la estructura y composición de las caseínas. La leche de cabra contiene más caseína soluble que la leche de vaca. Una gran parte de esta caseína está constituida por la caseína beta. Por ello el contenido de proteína coagulable de la leche de cabra es bajo, lo que implica que durante la elaboración de queso y de yogur el rendimiento sea inferior al de leche de vaca. Además se sabe que la variabilidad en la composición de las caseínas influye en la producción de queso ya que afectan la firmeza de la cuajada, el tiempo de coagulación y el contenido final de caseína en el queso (Juárez, Ramos y Martín –Hernández, 1991)

El otro grupo de proteínas de la leche son las del suero, que son aquellas que no precipitan cuando el pH de la leche se reduce a 4.6.

Se puede considerar que las proteínas son el componente de la leche más estable, aunque pueden alterarse debido a la desnaturalización por efecto del calor a partir de 60 a 70°C; coagulación por efecto del aumento en la concentración de ácido láctico producido por las bacterias, llegando el pH hasta 4.6 con precipitación de la fracción caseínica; putrefacción por degradación de proteínas ocasionada por ciertos grupos microbianos, con posterior coagulación y sabor putrefacto.

La relación entre caseínas y proteínas del suero puede verse alterada cuando la leche provenga de animales enfermos de mastitis o leche con contenido elevado de calostro, en ambos casos aumenta la proteína del suero, con posible disminución del rendimiento quesero (Landau y Molle, 2004).

2.2.3.3 Grasa

Los glóbulos grasos de la leche de la cabra tienen tamaño más pequeño que los de la leche de vaca. En igualdad de concentración de grasa, la leche de cabra tiene un número de glóbulos grasos dos veces mayor que la de leche de vaca, con un diámetro medio inferior de 1.99 micras, mientras que el de esta última es de 3.53 micras. Dicha situación es de interés en el campo de la nutrición, ya que se conoce que si el tamaño del glóbulo graso es pequeño, su tiempo de residencia en el tracto gastrointestinal es menor y con ello se favorece su absorción hacia el torrente circulatorio. Sin embargo también se conoce que la pasteurización de la leche de cabra, por ejemplo a 63 °C durante 30 minutos, aumenta en un 12 por ciento el diámetro medio del glóbulo graso, disminuyendo su número total y con ello la absorción es un poco más tardada.

El tiempo de descremado de la leche se ve afectado por el tamaño del diámetro de los glóbulos de grasa, por lo que a diferencia de la leche de vaca, en la de cabra, la grasa tarda más tiempo en separarse.

El color de la leche de cabra es blanco mate, debido a la carencia de beta caroteno que en el caso de leche de vaca se encuentra alojado en la fracción grasa, por lo que el tono de los quesos de cabra es más blanco que los de leche de vaca.

Los ácidos grasos y consecuentemente la grasa, son los componentes de la leche más influidos por la alimentación de los animales, pudiéndose modificar cambiando los ingredientes de la ración que se les ofrece. Dicha modificación ocasiona una composición de ácidos grasos diferente y por lo tanto un efecto sobre las propiedades tecnológicas de la leche caprina. Si por ejemplo aumenta la ingesta de harinas de oleaginosas la grasa láctea será más blanda, en tanto que si se alimenta al ganado con pradera la grasa será mas dura.

La leche caprina, posee características únicas para elaborar quesos, ya que su grasa contiene mayor número de ácidos grasos que intervienen en el sabor del queso, con niveles mas elevados de ácidos: butírico (C4), caproico (C6) caprílico (C8) y cáprico (C10) que la leche de vaca (Oliszewski et al., 2002).

2.2.3.4 Lactosa

El hidrato de carbono característico de la leche es la lactosa, es un azúcar con poder edulcorante bajo. La lactosa debido a la acción enzimática bacteriana sufre fermentaciones diferentes, con productos como ácido láctico, anhídrido carbónico, alcohol, ácidos propiónico y butírico y otros compuestos, que ocasionan la coagulación de la leche, que en el caso de queso, le conferirán parte de su aroma y sabor. El contenido de lactosa de la leche de cabra es parecido al de leche bovina fluctuando entre 44 a 47 g/L, y depende del estado de lactación de los animales (Juárez, Ramos y Martín –Hernández, 1991)

2.2.3.5 Vitaminas

Comparada con la leche materna la leche de cabra contiene prácticamente la misma cantidad de ácido fólico y un poco menos de vitaminas del complejo B (Marre 1978). El contenido de vitaminas E suele considerarse bajo razón por la cual la suplementación puede hacerse necesaria (Grand-Pierre *et al.* 1988; Dostaloya 1994). El caso de contenidos vitamínicos pobres es particularmente importante el caso del ácido ascórbico y la vitamina B12 (USDA et al. 2004).

2.3 Productos de leche de cabra

Una de las satisfacciones de tener cabras, son los productos lácteos que se pueden obtener de ellas, tales como quesos, crema, mantequilla, dulces, cajeta y yogurt.

2.3.1 Quesos

Según el código alimentario se define queso como el producto fresco o madurado, sólido o semisólido, obtenido a partir de la coagulación de la leche (a través de la acción del cuajo u otros coagulantes, con o sin hidrólisis previa de la lactosa) y posterior separación del suero.

La pasteurización previa de la leche será obligatoria para aquellos quesos de tipo frescos y los que se consuman antes de los dos meses tras su elaboración. Es básico para elaborar un queso realizar la cuajada. Es el único proceso necesario y consiste en separar los componentes de la leche, por acción de la temperatura o bacterias.

La separación se logra desestabilizando la proteína de la leche (caseína). Este desequilibrio hace que las proteínas se aglutinen en una masa blanca, separándose del líquido (suero lácteo).

Las bacterias utilizadas (*lactococcus*, *lactobacillus*, etc.) junto con las enzimas que producen y la leche de origen, serán determinantes en el sabor del queso tras su añejamiento.

A partir de ese momento de separación de partes, se trata de ir eliminando el suero. Como consecuencia muchas vitaminas y proteínas hidrosolubles se pierden a través del suero. Pero en términos generales, el queso mantiene todas las grasas de la leche, las tres cuartas partes del calcio y casi la totalidad de la vitamina A. Por otro lado debemos nombrar el papel de la sal en su proceso, puesto que además de aportar sabor salado, mejora la conserva y afirma la textura por su interacción con las proteínas. La sal puede mezclarse directamente en la cuajada o sólo aplicarla en la superficie exterior del queso.

Todas las características finales de los quesos (sabor, textura, olor), además de las materias primas, dependen de las técnicas específicas de elaboración. La

mayoría de los quesos no adquiere su forma final hasta que son prensados en un molde. Al ejercer más presión durante el prensado, se genera menos humedad, lo cual dará como resultado final un queso más duro.

Se necesitan varios litros de leche para obtener un kilo de queso debido a la pérdida de gran cantidad de agua durante su elaboración (dependiendo de que tipo de queso se trate).

2.3.1.1 Desuerado

Este proceso consiste en el drenaje de la fracción líquida producida durante la coagulación. La cantidad y la composición del suero varían en función del tipo de queso que se realice y por lo tanto del tipo de cuajado al que se haya sometido la leche.

Por lo tanto los factores que favorecen el desuerado son:

1. Temperatura ambiente: cuanto más baja más tarda. Es importante mantener la temperatura ambiente durante todo el proceso a la misma temperatura a la que se introdujo la cuajada en los moldes.
2. Acidez: importantísima en los quesos de elaboración mixta con fermentación láctica y cuajo combinados, donde la única intervención mecánica va a consistir en el volteado y por lo tanto una correcta acidez irá acompañada de un correcto desuerado.

Según el tipo de cuajado o la predominancia de uno u otro tipo hay un tipo de desuerado:

Fermentación láctica: El desuerado comienza de forma espontánea cuando se introduce la cuajada en los moldes y por la acción de su propio peso la masa se va compactando eliminando el líquido sobrante con una considerable pérdida de minerales, sobre todo de Calcio y Fósforo. La temperatura actúa de manera positiva porque favorece la actividad bacteriana y por lo tanto la producción de

cuajada. La velocidad de desuerado desciende mucho a 20°C y se para completamente a 10°C.

2.4. Suero lácteo de leche de cabra

Los estudios de microbiología láctica comenzaron con la investigación del proceso de acidificación que ocurre naturalmente en la leche, suero de quesería o suero de manteca (Hassan y Frank, 2001).

El Suero de Leche de Cabra, es un subproducto lácteo, líquido resultante de la coagulación de la Leche de Cabra durante la elaboración del queso. Contiene por lo menos el 50 % en peso de los nutrimentos de la leche, no emplearlo como alimento, es un enorme desperdicio de nutrimentos; ya que esta compuesto de ≥ 25 % de proteínas, 8 % de grasa y 95 % de la lactosa (Lomas y Rojas, 2005).

2.5 Probióticos

Si bien la definición inicial de los probióticos propuesta en 1965 se refería a sustancias secretadas por los microorganismos que estimulan el crecimiento de otros (en oposición a los “antibióticos”), actualmente el término probiótico hace referencia a un preparado o a un producto que contiene cepas de microorganismos viables en cantidad suficiente como para alterar la microflora en algún compartimento del huésped (por implantación o colonización) y que produce efectos beneficiosos en dicho huésped. La definición incluye bien productos que contienen microorganismos (por ejemplo, leches fermentadas) o un preparado de microorganismos (por ejemplo, comprimidos o polvos).

La OMS propone una definición más simple y se refiere a microorganismos vivos que cuando son administrados en cantidad adecuada confieren un efecto beneficioso sobre la salud del huésped.

Los probióticos son AF que se caracterizan por contener microorganismos vivos. El yogur (obtenido de la fermentación de la leche por *L. bulgaricus* y *S. thermophilus*) y otros derivados lácteos fermentados son los principales representantes de este grupo de AF, al que también pertenecen algunos vegetales y productos cárnicos fermentados.

2.5.1 Efectos benéficos de los Microorganismos Probióticos

Los mecanismos por los cuales los probióticos ejercen sus acciones beneficiosas no son bien conocidos, aunque se postulan como los más relevantes la producción de lactasa, la modificación del pH intestinal, la producción de sustancias antimicrobianas, la competición con microorganismos patógenos por sus receptores, lugares de unión y nutrientes precisos para su desarrollo, el estímulo del sistema inmune y la generación de citoquinas.

Es esencial que los probióticos permanezcan vivos durante su tránsito por el tracto gastrointestinal. Lactobacilos y bifidobacterias potencian la inmunidad, favorecen el equilibrio de la microflora colónica, incrementan la biodisponibilidad de ciertos nutrientes, mejoran el tránsito y la motilidad intestinal, estimulan la proliferación celular y elaboran ciertos productos fermentados beneficiosos.

Se ha probado de forma concluyente en diversos estudios que disminuyen la intolerancia a la lactosa y la incidencia y duración de las diarreas por rotavirus en lactantes. *L. casei* es el único que ha demostrado con evidencia científica prevenir y acortar las diarreas por rotavirus del lactante, así como incrementar las concentraciones de IgA en tracto intestinal. *L. acidophilus* y *B. bifidum* estimulan de forma inespecífica la actividad fagocítica de granulocitos y la producción de citoquinas.

Los efectos beneficiosos de los alimentos funcionales están expresados bien directamente por la interacción de microorganismos vivos, bacterias o levaduras, con el huésped o bien indirectamente como resultado de la ingestión de

los metabolitos microbianos producidos durante el proceso de fermentación. Las evidencias científicas indican que la ingestión de ciertos cultivos microbianos ejercen beneficios en la salud, no sólo en el tracto gastrointestinal sino también en el respiratorio y en el urogenital, así como en la modulación del sistema inmune. Los mecanismos de acción de los probióticos son múltiples y cada probiótico puede tener funciones específicas que afecten al huésped, si bien los detalles moleculares de los mecanismos de los probióticos todavía se tienen que descubrir. La mayoría de las bacterias conocidas como probióticos pertenecen al grupo de las bacterias ácido láctico, bacterias que se utilizan para la elaboración de productos fermentados.

2.5.2 Acción de los Probióticos a nivel de Tracto Gastrointestinal (TGI)

Cada vez es mayor el uso de los probióticos en la avicultura intensiva. La razón de esto hay que buscarla en la amplia diversidad de ventajas que ofrece su uso. Se plantea que la introducción de un probiótico es un evento natural el cual actuará beneficiando las interacciones naturales y complejas de la flora intestinal. Sus efectos positivos no solo serán a nivel del TGI, además se reflejarán en resultados zootécnicos tales como ganancia de peso vivo y conversión alimenticia (Prats, 1999).

Los probióticos están encaminados a favorecer la microflora intestinal, la cual está compuesta, en su gran mayoría, por bacterias ácido láctico. Esta microflora es esencial para descomponer las sustancias alimenticias que no fueron digeridas previamente, mantener la integridad de la mucosa intestinal protegiendo así a todas sus paredes, al desdoblar los alimentos producen vitaminas (sobre todo del complejo hidrosoluble) y ácidos grasos, reduce el nivel de colesterol y triglicéridos en sangre, al mantener la estabilidad intestinal logran aumentar la respuesta inmune; se conoce que cuando estos mecanismos son agredidos por algún agente externo es el momento idóneo para entrar a actuar los probióticos. No basta la solo acción de los mismos sino que hay que crearles a las aves un

estado ambiental general adecuado y dietas que suministren los nutrientes necesarios (Pratt et al 2002 y Smolander et al 2004).

2.5.3 Resistencia a Microorganismos Patógenos.

Son diversas las formas en que los probióticos utilizan para mejorar la resistencia del huésped contra los microorganismos patógenos, entre las que podemos mencionar los efectos de barrera, la competencia por los sitios de adhesión y por nutrimentos, las modificaciones del hábitat intestinal por cambios en el pH y la producción de sustancias antimicrobianas, entre otras.

Son mas de una docena los microorganismos reconocidos como probióticos, y no todos ellos tienen los mismos efectos y mecanismos de acción, y lo que no se puede asumir que los efectos positivos sean en todos los casos similares; actualmente se cuenta con resultados de muchas investigaciones en este campo, algunas de ellas muy alentadoras, dentro de las que destacan las siguientes:

Microorganismos probióticos como *Lactobacillus plantarum* 299 y *Lactobacilos rhamnosus* GG inhiben la adherencia de *Escherichia coli* enteropatógena, eliminando los organismos patógenos de las células epiteliales del intestino a través de incrementar la mucina intestinal MUC 2 y MUC 3 ((Mack D., S. Michail, S. Wei, 1999).

Recientemente, investigadores encontraron que el sobrenadante de un cultivo de la cepa de *Lactobacillus acidophilus* LB inhibe la adhesión de *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* SL 1344 en cultivo de células humanas (Caco -2 /TC-7) induciendo la producción de interleucina -8 ((Coconnier et al., 2000).

También se ha encontrado que *Bifidobacterium breve* y *B. infantis* dependientemente de la dosis, inhiben la invasión de cepas de *Escherichia coli*

enteropatógena, *Yersinia pseudotuberculosis* y *Salmonella typhimurium* (Bernet M *et al.*, 1993).

En un estudio con ratas inmunodeficientes se probó el efecto de probióticos (*Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus casei GG* y *Bifidobacterium animalis*) contra la candidiasis y se encontró que no previenen completamente la candidiasis pero reducen la incidencia y la severidad. Encontraron que las bacterias probióticas también modularon la respuesta inmune a *Candida albicans* (Wagner RD, 1997).

Por otra parte, la suplementación con *Bifidobacterium infantis* reduce la incidencia de enterocolitis necrotizante en un estudio realizado con un modelo con ratas neonatas ((Caplan M, 1999). En una revisión elaborada por Roos y Katan ((Roos N. and M. Katan 2000) se sugiere que los probióticos como *Lactobacillus GG* previenen la incidencia y severidad de diarreas causadas por virus y bacterias.

Los mecanismos de acción de los probióticos para la resistencia a los microorganismos son:

1. Producción de sustancias antimicrobianas como ácido láctico y otros ácidos de cadena corta, metabolitos como peróxido de hidrógeno, diacetilo y bacteriocinas, entre otros.
2. Competencia por receptores de adhesión.
3. Competencia por nutrientes y estimulación inmunológica.
4. Efectos sobre membranas celulares de microorganismos patógenos alterando su permeabilidad (Abee T, F 1994).

2.5.4 Efectos Inmunológicos

Recientemente se ha investigado el efecto de probióticos sobre el sistema inmune con resultados positivos, estos microorganismos pueden alertar al sistema

inmunitario y favorecer el rechazo de microorganismos infecciosos por medio de la modificación de parámetros inmunológicos como lo son la producción de inmunoglobulinas específicas de tipo A (para defensa de las mucosas), concentración de macrófagos, producción de interferón y otras citocinas o en la activación de la fagocitosis. Esto se demuestra en diversas investigaciones, una de ellas desarrollada en 10 personas donde se realizaron pruebas inmunológicas (transformación de linfocitos y títulos de anticuerpo en suero). Los resultados del estudio enfatizan la complejidad de las relaciones que existen entre la microflora intestinal y el huésped ((Kimura K *et al.*, 1997).

Hay estudios que apoyan la hipótesis de que el consumo de yogurt puede aumentar la respuesta inmune e incrementar la resistencia a enfermedades. Asimismo, se encontró que el consumo de yogurt se asocia con una disminución de síntomas de alergia tanto en adultos como en personas mayores ((Van de Water *et al.*, 1999).

2.5.5 Alimentos Probióticos

Cada vez se generan nuevos alimentos que contienen probióticos como es el caso de un queso cheddar, que contiene una cepa probiótica de *Lactobacillus paracasei* y *L. salivarius*, que demostró que éste producto puede ser un vehículo efectivo para que los probióticos puedan ser consumidos (Gardiner G *et al.*, 2000).

También se ha desarrollado leche descremada en polvo usando un método de deshidratación por aspersion para preservar *Lactobacillus paracasei* NFBC 338 y *Lactobacillus salivarius* UCC 118 (cepas probióticas derivadas de humanos), encontraron que los microorganismos presentaban viabilidad y que la producción de bacteriocina de *Lactobacillus salivarius* no fue afectada por el proceso, demostrando así que este método de secado puede ser utilizado para producir grandes cantidades de probióticos (Gardiner G *et al.*, 1999).

Así mismo, se ha desarrollado helado de yogurt y logrado la sobrevivencia de los microorganismos por un periodo mayor a 1 año (Lopez M C, LM Medina & R. Jordano 1998). Por otro lado, se ha elaborado mayonesa que contiene *Bifidobacterium bifidum* y *B. infantis* logrando una sobrevivencia de 8 y 12 semanas respectivamente cuando las cepas fueron encapsuladas con polisacáridos. También se han desarrollado productos de cereales con probióticos que ya están a la venta en algunos países europeos. Es importante señalar que la investigación debe ir de la mano al desarrollo de los productos, para que las declaraciones sobre salud que proponen los productores, estén avaladas por estudios serios y confiables.

2.5.6 Quienes pueden consumir Probióticos

La utilización de probióticos se recomienda a cualquier persona que quiera favorecer el equilibrio de la flora intestinal. En personas con tratamiento antibiótico, en ancianos, en el embarazo, en disturbios intestinales, para mejorar la intolerancia a la lactosa. Se utiliza también para disminuir los efectos de la diarrea y constipación, en enfermedades inflamatorias del intestino ya que al modular la flora intestinal aumenta la producción de inmunoglobulina A y estos pacientes tienen disminuidos los lactobacilos.

2.5.7 Dosis

Los alimentos funcionales elaborados con probióticos deben contener por lo menos 10 millones de células viables por cada 100 ml, dosis ideal para lograr los efectos deseados y aumentar las defensas naturales, sin embargo la dosis dependerá del microorganismo utilizado, de la forma de consumo y del efecto que se desee obtener.

Uno de los estudios realizados en la Corporación universitaria de Santander UDES Cúcuta en Colombia por el programa de Bacteriología con niños de 1-5 años del I.C.B.F. dio como resultado que la dosis de 1.4×10^{10} cell / ml de *Lactobacilos casei* era la concentración ideal para disminuir los casos de diarrea en un 81% causada por parásitos patógenos intestinales (Giardia lamblia)

Como ya lo aseguró Elie Metchnikoff: "Si los esperados y pretendidos efectos no aparecen, por lo menos el consumidor quedará satisfecho por el buen gusto del producto". ¡Salud!

2.6 Tipos de Microorganismos Probióticos

Son microorganismos viables que, usados como suplemento de la dieta, produce efectos beneficiosos en el huésped.

Los microorganismos probióticos han sido clasificados de manera muy amplia en lactobacilos y bifidobacterias y algunas levaduras con características

2.6.1 Microorganismos Probióticos

1. ***Lactobacillus GG*** Adherencia a las células intestinales, estimulación de la respuesta inmune, prevención de la diarrea patogénica.
2. ***Lactobacillus johnsonii*** Prevención de la diarrea del viajero, modulación de la flora intestinal, alivio de la intolerancia a la lactosa.
3. ***Bifidobacterium lactis*** Prevención de la diarrea del viajero, tratamiento contra la diarrea viral incluyendo rotavirus, modulación de la respuesta inmune.
4. ***Lactobacillus casei Shirota*** Modulación de la flora intestinal, efectos positivos en tratamientos contra el cáncer, disminución de la actividad enzimática en las heces fecales.

5. ***Saccharomyces boulardii*** Prevención de la diarrea causada por antibióticos, tratamiento contra la colitis causada por *Clostridium difficile colitis*.
6. ***Lactobacillus plantarum*** Adherencia a las células intestinales humanas, modulación de la flora intestinal.
7. ***Lactobacillus acidophilus*** Inhibición de bacterias patógenas, adhesión a las células intestinales humanas.
8. ***Bifidobacterium longum*** Exclusión competitiva de *Escherichia coli*, inhibición de E. coli de la superficie de la mucosa intestinal humana.
9. ***Lactobacillus reuteri*** Colonización del tracto gastrointestinal.
10. ***Lactobacillus bulgaricus*** Reduce o elimina los síntomas de intolerancia a la lactosa.
11. ***Bifidobacterium bifidum*** Reduce la duración de la diarrea y aumenta la respuesta inmunológica

2.6.1.1 Usos

Estas bacterias son empleadas en la elaboración de productos lácteos fermentados, entre los que se incluyen los yogures, verduras fermentadas, carne y productos de leche fermentada 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 (Hopkins et al., 1998). 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).

2.6.1.2 Aplicaciones

En el mercado existe una variada oferta de productos lácteos fermentados (el más conocido en esta categoría es el yogur –leche fermentada por la acción de las bacterias *Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*), que, si se incorporan en la dieta normal, pueden restablecer o mantener ese equilibrio bacteriano, pues su composición incluye la presencia de diferentes colonias de bacterias benéficas.

Sin embargo, el desarrollo tecnológico ha dado origen a la aparición de las bebidas lácteas fermentadas, las cuales también se venden bajo las denominaciones "alimento lácteo fermentado" o "producto lácteo fermentado". Estos productos, además de que ofrecen agregar diversas bacterias benéficas –y con ello favorecer el equilibrio de las poblaciones bacterianas de nuestra flora intestinal–, son de fácil digestión y producen ácido láctico, que impide la proliferación de bacterias nocivas y la putrefacción de sustancias en el colon; tienen también la facultad de sobrevivir a través del sistema digestivo y, en varios casos, de reproducirse. Ejemplos de éstas son las *bifidobacterias Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus casei Shirota*; a todas ellas también se les denomina con el nombre genérico de “probióticos”. (Cuadro 2)

Cuadro 2. Alimentos y bebidas lácteas fermentadas con probióticos

Denominación Marca /Contenido neto /País de origen	Contenido promedio de proteína/grasa	Contenido de bacterias benéficas vivas	
		Tipo	Cantidad (UFC/g o ml)*
Alimento lácteo fermentado activa danone/ 150 gr México	3.9% / 3.7%	<i>Bifidobacterium bifidum</i> <i>essensis</i> <i>Lactococcus lactis</i> <i>Streptococcus</i> <i>thermophilus</i>	72 a 100 millones

		<i>Lactobacillus bulgaricu</i>	
Alimento lácteo fermentado para beber Activia Danone / 250 g / México	2.6% 3.1	<i>Bifidobacterium bifidum</i> <i>essensis</i> <i>Lactococcus lactis</i> <i>Streptococcus thermophilus</i> <i>Lactobacillus bulgaricus</i>	29 a 250 millones
bebida láctea fermentado Actimel Danone / 100 g / México	2.6% 1.6%	<i>Lactobacillus casei</i> <i>defensis</i> <i>Streptococcus thermophilus</i> <i>Lactobacillus bugaricus</i>	690 a 1200 millones
Bebida láctea fermentada Bio 4 LALA / 110 g / México	2.8% 1.3%	<i>Lactobacillus casei spp paracasei</i>	11 a 17 millones
Producto lácteo fermentado Bonacult /120 ml / México	1.2% 0%	<i>Lactobacilus casei rhamnosus</i>	38 a 190 miles
Producto lácteo fermentado Chamyto Nestlé 76 ml 80 gr México	0.9% 0.1%	<i>Lactobacillus johnsonii</i> <i>Lactobacillus helveticus</i>	6 a 12 millones
Bebida láctea fermentada Kul-tai Del Valle / 80 ml / México	1.4% 0%	<i>Lactobacillus bulgaricus</i> <i>Streptococco thermophilus</i> <i>Bifidobacterium bifidum</i>	150 mil a 6 millones
Alimento lácteo fermentado LC1 Nestlé / 106 ml (110 g) / México	2.6% 1.1%	<i>Lactobacillus johnsonii</i> <i>Streptococcus thermophilus</i>	500 a 3200 millones
Alimento lácteo fermentado Sofúl / 107 g / México	4.0% 2.1%	<i>Lactobacillus casei shirota</i> <i>Streptococcus thermophilus</i>	160 a 380 millones
Producto lácteo fermentado Yakult / 80 ml / México	1.1% 0.1%	<i>Lactobacillus casei shirota</i>	230 a 420 millones
Producto lácteo fermentado Yolact / No declara / México	1.2% 0%	<i>Lactobacillus sp</i>	1 a 6 millones

mayonesa		<i>Bifidobacterium bifidum</i> y <i>B. infantis</i>	
queso cheddar,		<i>Lactobacillus paracasei</i> y <i>L. salivarius</i>	

2.7 Bacterias acido-lácticas (BAL)

Las bacterias acido-lácticas están ampliamente difundidas en la naturaleza, se hayan en el suelo y en cualquier medio que contenga altas concentraciones de carbohidratos, productos de la degradación de proteínas, vitaminas y escaso oxígeno. Varias especies de BAL se hayan en leche cruda lo mismo que en carne y vegetales crudos y algunas especies. También son habitantes normales del cuerpo humano, ciertas especies se han aislado y preparado para emplearlas en la fabricación de alimentos fermentados tales como queso y yogurt.

Las bacterias acido-lácticas son organismos unicelulares, procarióticos por tanto de estructura relativamente simple. Morfológicamente son cocos, *estreptococos* y *bacillus*, son gram positivas anaeróbicas pero aerotolerantes; son inmóviles no pigmentadas, no reducen los nitratos y son catalasa negativas (no la producen).

Las bacterias lácticas son responsables del proceso de fermentación en la elaboración de quesos, degradan las proteínas a compuestos nitrogenados menores, producen ácido láctico y sustancias que otorgan características sápido-aromáticas al producto (Hammes et al, 1992; Teuber et al, 1992).

De todas ellas normalmente cuatro se encuentran en los cultivos lácticos iniciadores; *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Lactococcus* y *Leuconostoc*. Un quinto género, *Enterococcus*, se encuentra en algunos fermentos o cultivos iniciadores

mixtos debido a su efecto beneficioso en el desarrollo del aroma, sabor y textura de los productos lácteos (Hassan y Frank, 2001).

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 (Topisirovic y col, 2006;). 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. Sin embargo, las BAL también han sido asociadas como bacterias alterantes de alimentos y en mayor medida de productos cárnicos.

2.7.1 Generalidades

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- y en otras ocasiones producen además etanol, acetato y CO₂ por la vía del ácido-6- fosfogluconico. 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.

2.8 Medios de cultivos ácido láctico

El ácido láctico es una sustancia producida por el músculo bajo ciertas circunstancias. Sin embargo puede ser producido sintéticamente por industrias de productos biodegradables de ácidos poli-lácticos.

El ácido láctico es producido por glicólisis: degradación de los carbohidratos a ácidos por un proceso de fermentación. El ácido láctico es un producto del metabolismo anaeróbico en los músculos.

1 mol de glucosa 2 moles de ácido láctico

$C_6H_{12}O_6$ $2C_3H_6O_3$

Ácido láctico (lactato), sustancia generada en las células como producto de la degradación de la glucosa, y especialmente en las células musculares durante el ejercicio.

2.9 Cinéticas de producción

2.9.1 Definición

La cinética de crecimiento microbiano constituye una de las operaciones más utilizadas por la ingeniería alimentaria y la biotecnología, por lo tanto, es menester conocer los diferentes mecanismos de crecimiento, así como, la forma de cuantificación de los mismos, sus formas de aplicación, las ventajas y desventajas de los diferentes métodos, y sobre todo el monto económico de cada uno de ellos.

2.9.2 Cinética de crecimiento de un cultivo

Se pueden distinguir cuatro fases durante el desarrollo del crecimiento:

1. La fase logarítmica, en la que el microorganismo se adapta a las nuevas condiciones y pone en marcha su maquinaria metabólica para poder crecer activamente. La duración de esta fase es variable y en general es mayor cuanto más grande sea el cambio en las condiciones en las que se encuentra el microorganismo.
2. La fase exponencial.
3. La fase estacionaria, en la que no hay aumento neto de microorganismos, lo que no significa que no se dividan algunos, sino que la aparición de nuevos individuos se compensa por la muerte de otros.
4. La fase de muerte, en la que el número de microorganismos vivos disminuye de forma exponencial con una constante k que depende de diferentes circunstancias.

En la fase de muerte decimos que el número de microorganismos vivos disminuye exponencialmente. Pero ¿qué es un microorganismo vivo en términos microbiológicos? Consideramos vivo al microorganismo que puede multiplicarse (dividirse), y muerto al que ha perdido irreversiblemente la capacidad de dividirse.

2.9.2.1 Efecto de la temperatura

Todos los microorganismos tienen una temperatura óptima de crecimiento.
(Cuadro 3)

Cuadro 3. Temperatura Óptima de Crecimiento

Clasificación	Rango	Optima
Termófilos	25 - 80 °C	50 - 60 °C
Mesófilos	10 - 45 °C	20 - 40 °C
Psicrófilo	-5 - 30 °C	10-20 °C

Esto significa que a determinada temperatura la velocidad de duplicación (o la velocidad de crecimiento poblacional) de los microorganismos es mayor. Hay que tener en cuenta que no todos los microorganismos crecen en el mismo rango de temperaturas.

2.9.2.2 Efecto del pH

La mayoría de los microorganismos crecen en pH cercanos a la neutralidad, entre 5 y 9, cosa que no excluye que existan microorganismos que puedan soportar pH extremos y se desarrollen. Según el rango de pH del medio en el cual se desarrollan pueden dividirse en: (cuadro 4)

Los microorganismos regulan su pH interno mediante un sistema de transporte de protones que se encuentra en la membrana citoplasmática, que incluye una bomba de protones ATP dependiente.

Cuadro 4. Clasificación de los Microorganismos según el pH

Clasificación	pH externo	pH interno
Acidófilos	1.0 - 5.0	6.5
Neutrófilos	5.5 - 8.5	7.5
Alcalófilos	9.0 - 10.0	9.5

El rango de pH óptimo para el desarrollo de los microorganismos es estrecho debido a que frente a un pH externo muy desfavorable se requiere un gran consumo de energía para mantener el pH interno.

III. MATERIALES Y METODOS

El desarrollo de este proyecto se realizó en el Centro de Microbiología Aplicada (CEMAP) Laboratorio de la Empresa Mexicana GBS Global S.A. de C.V., ubicado en la Col. Latinoamericana Saltillo, Coahuila.

3.1 Activación de los microorganismos

Los microorganismos utilizados en este proyecto pertenecen a la colección de cepas probióticas de la empresa GBS Global S.A. de C.V.

3.1.1 Obtención de la muestra

El suero lácteo con el que se realizó la investigación fue obtenido de la fabricación del queso molido de leche de cabras de procedencia mixta obtenida en la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro

3.2 Acondicionamiento de material para anaerobiosis

Se diseñaron reactores para anaerobiosis utilizando frascos de vidrio de diferentes tamaños, de 275 mL para fermentaciones en medio líquido (figura 1A) y frascos de 4 litros para fermentaciones de anaerobiosis en medio sólido (figura 1B). En los frascos de 4 litros se introducían cajas Petri con Agar MRS para mantener su anaerobiosis. A las tapas de aluminio de cada frasco se les realizaron dos perforaciones donde se colocaron tapones de plástico, cerrándolos herméticamente utilizando silicón. Para realizar la anaerobiosis se utilizaron 2 agujas, una para introducir el nitrógeno que desplazaría el oxígeno presente y la otra que se colocaba en el otro tapón que utilizó para sacar el oxígeno.

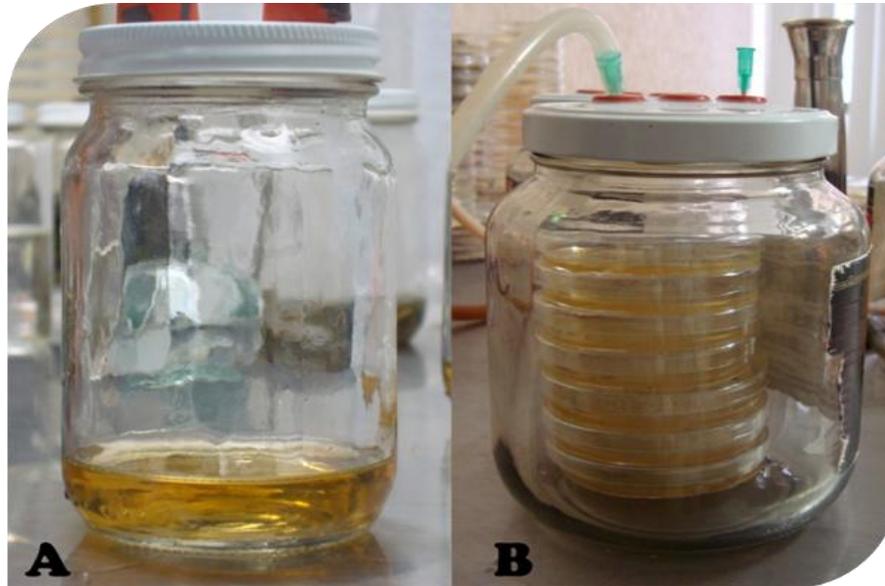


Figura 1A. Frasco con medio de cultivo líquido, figura 1B. Frasco con medio de cultivo sólido.

3.3 Preparación de medios de cultivo

3.3.1 Medio MRS en cultivo líquido

Cuadro 5. Composición del medio de cultivo líquido MRS

Formula (gramos por litro)	
Proteasa peptona	10
Extracto de carne	5
Extracto de levadura	5
Glucosa	20
Tween 80	1 ml
Citrato de amonio	2
Acetato de sodio	5
Sulfato de magnesio	0.1
Sulfato de manganeso	0.05
Fosfato dipotásico	2



Figura 2. Reactivos utilizados para preparar medio de cultivo MRS

3.3.1.1 Forma de preparación

Disolver todos estos compuestos en 1 litro de agua destilada y añadir 1 ml de Tween 80 (Fluka n ° 93.780). Posteriormente se esterilizar en Autoclave a 121 ° C durante 15 minutos.

3.3.2 Medio Agar MRS

Cuadro 6. Composición del medio de cultivo Agar MRS

Formula (gramos por litro)	
Proteasa peptona	10
Extracto de carne	5
Extracto de levadura	5
Glucosa	20
Tween 80	1 ml
Citrato de amonio	2
Acetato de sodio	5
Sulfato de magnesio	0.1
Sulfato de manganeso	0.05
Fosfato dipotásico	2
Agar	13

3.3.2.1 Forma de preparación

Disolver todos estos compuestos en 1 litro de agua destilada y añadir 1 ml de Tween 80 (Fluka n ° 93.780). Esterilizar en Autoclave a 121 ° C durante 15 minutos, enfriar y vaciar en cajas Petri. (Figura 3).



Figura 3. Caja Petri conteniendo Agar MRS

ETAPA 1. IDENTIFICACION Y CONSERVACIÓN DE MICROORGANISMOS PROBIOTICOS.

3.4 Identificación de las cepas

Un total de 19 cepas fueron inoculadas en 20 ml de caldo MRS en reactores de 250 ml diseñados para realizar anaerobiosis los cuales fueron encubados a 37°C por 24 horas en condiciones de anaerobias.

Posteriormente las cepas fueron sembradas en placas conteniendo Agar MRS y colocadas los reactores de 4 litros diseñados especialmente para llevar acabo la anaerobiosis, tienen una tapa metálica la cual esta perforada tiene tapones de goma los cuales permiten la entrada de agujas por las cuales es extraído el oxígeno e ingerido el nitrógeno los cuales son incubados a 37 °C por 24 horas.

Se realizó la tinción de Gram a cada una de las cepas, observo al microscopio óptico para identificar la morfología de cada microorganismo. Para lo cual se realizó la siguiente técnica:

3.4.1 Técnica de tinción de Gram.

Esta técnica se utilizó para observar al microscopio las características de cada microorganismo, utilizando los colorantes siguientes: cristal violeta o violeta de genciana, lugol, alcohol-acetona y safranina.

3.5 Purificación de las cepas

Después de que las cepas fueron identificadas se purificaron por estría por agotamiento en placas de Agar MRS, se observo al microscopio óptico para la identificación morfológica y se realizó la tinción de Gram. Las bacterias que se presentaron puras se almacenaron para su conservación en congelación en tubos de Ependorff y en liofilización.

3.6 Conservación de las cepas

3.6.1 Liofilización

Para realizar este método de conservación se centrifugo a 4500 revoluciones por 30 minutos, colocando 500 µL de leche descremada y 500µL de cultivo de cepas. Posteriormente almacenaron en un ultra-congelador a -80°C por 24 h y se liofilizaron

3.6.2 Congelación

Para conservar las cepas libres de toda contaminación, se congelaron 5 ml de cada microorganismo para lo cual se utilizaron tubos ependorf, en cada tubo se coloco 1 ml de cada muestra los tubos fueron etiquetados con su respectiva identificación y posteriormente colocados en el congelador.

ETAPA II: SELECCIÓN DE LA CEPA DE MAYOR CRECIMIENTO UTILIZANDO COMO MEDIO DE CULTIVO EL SUERO DE CABRA.

3.7 Preparación del inóculo

En frasco de vidrio de 275 ml fueron colocados 30 ml de suero lácteo de cabra, posteriormente esterilizados en autoclave a 121°C por 15 minutos, se dejó enfriar y se inóculo con 1 ml de muestra de las cepas probióticas.

3.7.1 Selección de las cepas en cultivo con suero lácteo de cabra

Todas las cepas probióticas fueron inoculadas en suero lácteo de cabra y posteriormente sembradas en placas con Agar MRS por el método de estriado, para poder realizar el conteo de las colonias crecientes en cada caja y seleccionar la de mayor crecimiento, antes de sembrarlas se realizaron diluciones seriadas de cada muestra de la 10^{-1} a la 10^{-7} dilución.

3.7.2 Conteo de unidades formadoras de colonias

Se llevó a cabo el conteo de las colonias en cada una de las placas que presentaron crecimiento. Para seleccionar la que tuviese mayor número de colonias.

ETAPA III EVALUACION CINETICA DE LA PRODUCCIÓN DE LOS PROBIOTICOS EN TRES DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO

3.8 Preparación del cultivo 1

Para preparar el cultivo 1, únicamente se utilizaron el residuo “suero lácteo de cabra”, y reactores de aproximadamente 60 ml de capacidad cada uno. En cada reactor se colocó 30 ml de muestra (suero de cabra), y se sometió a esterilizar en una autoclave a 121°C por 15 minutos, se dejó enfriar, posteriormente los reactores fueron inoculados con la cepa de jocoque y

sometidos a incubación por 24 h a 37 °C en condiciones anaerobias para llevar acabo la cinética de crecimiento se tomo uno de los reactivos que no fue inoculado para que se tomara como control para las cero horas en la cinética de crecimiento, de la cero a la 96 h.

3.9 Preparación del cultivo 2

Cuadro 7. Reactivos para la preparación del cultivo 2

Reactivos	Gramos / litro
Extracto de levadura	
Fosfato de potasio	0.5 gr/lit
Nitrato de amonio	1.0 gr/lit
Fosfato de sodio dibasico	2.0 gr/lit
Cloruro de calcio hexahidratado	0.001 gr/lit
Sulfato ferroso	0.0003
Cloruro de magnesio	5 ppm = 0.005

Además de la cantidad necesaria del residuo suero lácteo de cabra. Igual que en el cultivo anterior se ocuparon reactores en los cuales se coloco 30 ml de muestra ya preparada con el suero y los reactivos anteriormente mencionados estos fueron sometidos a esterilización, se dejaron enfriara y fueron inoculados con la cepa de jocoque uno de los reactores no fue inoculado para que se tomara como control para las cero horas en la cinética de crecimiento,

3.10 Preparación del cultivo 3

Se preparo el cultivo tres siguiendo el mismo procedimiento que en el cultivo uno y en el cultivo dos.

Fue preparado a base de suero lácteo de cabra y los siguientes reactivos:

Cuadro 8. Reactivos para la preparación del cultivo 3

Reactivos	Gramos /litros
Extracto de carne	5gr/lt
Peptona de caseína	10gr/lt
Medio mínimo de sales	
Fosfato de potasio	0.5gr/lt
Cloruro de amonio	1.0gr/lt
Sulfato de sodio	2.0gr/lt
Cloruro de calcio	0.001gr/lt
Sulfato de hierro	0.0003gr/lt
Cloruro de magnesio	5 ppm

Una vez disueltos los reactivos en el suero lácteo de cabra se colocaron 30 ml de esta muestra en cada uno de los reactores mencionados anteriormente y sometidos a esterilización en autoclave a 121°C por 15 minutos, se dejaron enfriar y se inoculo con la cepa (jocoque) cada reactor, aceptó el que representaría la hora cero en la cinética de crecimiento.

3.11 Cinética de crecimiento

La cinética de crecimiento se realizó para cada uno de los diferentes cultivos, con la finalidad de obtener cual de los tres es el más apto para el crecimiento microbiano. La metodología fue la misma para todos los cultivos.

Los reactores utilizados fueron llenados con 30 ml de muestra, se esterilizaron, después fueron inoculados con la capa (jocoque) la cual presentó mayor crecimiento en el suero lácteo de cabra, el reactor tomado como control no fue inoculado en la cinética de crecimiento la cual se hizo cada 12 horas comenzando de la hora cero hasta la hora 96.

La cinética de crecimiento se llevó a cabo de la siguiente manera:

Los reactores fueron sometidos a anaerobiosis y colocados en una incubadora de agitación (shaker), a una temperatura de 36°C, cada 12 horas un reactor era retirado de la incubadora hasta completar la hora 96 que fue cuando se retiró el último de los reactores.

3.11.1 Evaluación del crecimiento microbiano en los diferentes medios de cultivo

Para seleccionar cual de los tres cultivos permitía un mayor crecimiento microbiano, se sembró en placas conteniendo Agar MRS el extracto de cada reactor, ocupando únicamente 0.5 mL de muestra. La siembra se realizó utilizando la técnica de estriado (con una varilla de vidrio). Para poder realizar el conteo de las colonias crecientes en cada placa, antes de la siembra se realizaron diluciones seriadas esto con el propósito de disminuir el crecimiento microbiano en cada caja. Para lo cual se realizó la siguiente técnica:

3.11.1.1 Diluciones seriadas

Para realizar las diluciones se ocuparon tubos de ensayo, los cuales fueron llenados con 9 ml de solución salina, esta se preparo ocupando 0.85 gr de cloruro de sodio por cada 100 ml de agua, los tubos fueron esterilizados en autoclave a 121 °C por 15 minutos. En el primero de los tubos a ocupar se coloco 1 ml de la muestra a diluir, el tubo fue agitado en el vortex, posteriormente se retiro 1 ml de muestra de este tubo y se coloco en el segundo de los tubos y se agito en el vortex. Esto se realizo a cada uno de los tubos.

Este procedimiento fue el mismo para diluir el contenido de los reactores de los 3 cultivos.

3.11.2 Determinación de acido láctico

Este cálculo se hizo para los tres diferentes cultivos, utilizando la misma técnica. La determinación de acido láctico se llevo acabo mediante una titulación para esto se tomaron 9 ml de muestra a la cual se le agrego tres gotas de fenolftaleína y posteriormente se titulo con hidróxido de sodio al 0.1M.

3.11.3 Determinación de biomasa

Para la determinación de biomasa se ocuparon tubos ependorf, estos fueron pesados en una balanza analítica tomando nota de cada uno de los pesos, en los tubos se coloco 1ml de muestra, cada uno de los tubos era identificado con un número, para evitar confusiones debido a que las muestras eran diferentes, se centrifugo a 10,000 rpm. Después los tubos fueron acomodados en una estufa de secado por 72 horas para lograr el secado perfecto de la muestra, los tubos fueron pesados nuevamente y posteriormente se realizo el cálculo de la cantidad de biomasa presente en cada microorganismo.

IV. RESULTADOS

Las cepas utilizadas en la presente investigación pertenecen a la colección de microorganismos de la empresa GBS Global S.A. de C.V. Las 19 cepas proporcionadas fueron aisladas, identificadas, purificadas en placas con Agar MRS y conservadas mediante los métodos de congelación y liofilización.

ETAPA 1. IDENTIFICACION Y CONSERVACIÓN DE MICROORGANISMOS PROBIOTICOS.

Las cepas se observaron al microscopio realizando tinciones de Gram, la caracterización morfológica se realizó identificando el tamaño de las cepas, la forma y la tinción. Las cepas seleccionadas presentaron la siguiente morfología (Cuadro 9):

Cuadro 9: Identificación microscópica de las cepas probióticas seleccionadas.

CEPAS	TAMAÑO	TINCION	FORMA
02-1	Chicas	Gram +	Circular
Manzana	Grandes	Gram +	Circular
Maíz	Chicas	Gram +	Bastones
Frijol	Grandes	Gram +	Circular
Alfalfa	Chicos	Gram +	Bastones
Tabasco	Grandes	Gram +	Bastones
Ciruela	Chicos	Gram +	Bastones
Sotol filtrado	Chicos	Gram +	Circular
Pozol	Chicos	Gram +	Circular
Agua miel	Grandes	Gram +	Bastones
Calabaza	Chicos	Gram +	Bastones

M1	Chicas	Gram +	Bastones
Soto sin filtrar	Chicos	Gram +	Circular
M2	Chicos	Gram +	Circular
Suero	Grandes	Gram +	Bastones
Jagüey	Grandes	Gram +	Circular
San Rafael	Medianos	Gram +	Circular
Jocoque	Chicos	Gram +	Circular
Leche	Grandes	Gram +	Bastones

Los resultados observados al microscopio muestran que todos los microorganismos son Gram positivos, característica particular de los probióticos, diez de las cepas tienen morfología de cocos y nueve de ellas de bacilos, once de los microorganismos son de morfología pequeña, siete de tamaño grande y uno de tamaño mediano.

4.2 Purificación de las cepas

Las cepas utilizadas en esta investigación presentaban contaminación, microbiana motivo por el que fueron sembradas en cajas Petri conteniendo Agar MRS por el método de estriado, realizando posteriormente tinción de Gram para observar al microscopio, hasta lograr la purificación de cada una de ellas.



Figura 4. Siembra por el método de estriado

La figura 4. Muestra las fotografías obtenidas en el microscopio de las cepas purificadas. La observación microscópica se realizó para identificar cada microorganismo y poder descartar contaminaciones. Los resultados obtenidos muestran las cepas purificadas, después de realizar la tinción de Gram, las cepas se observa limpias y libres de contaminación.

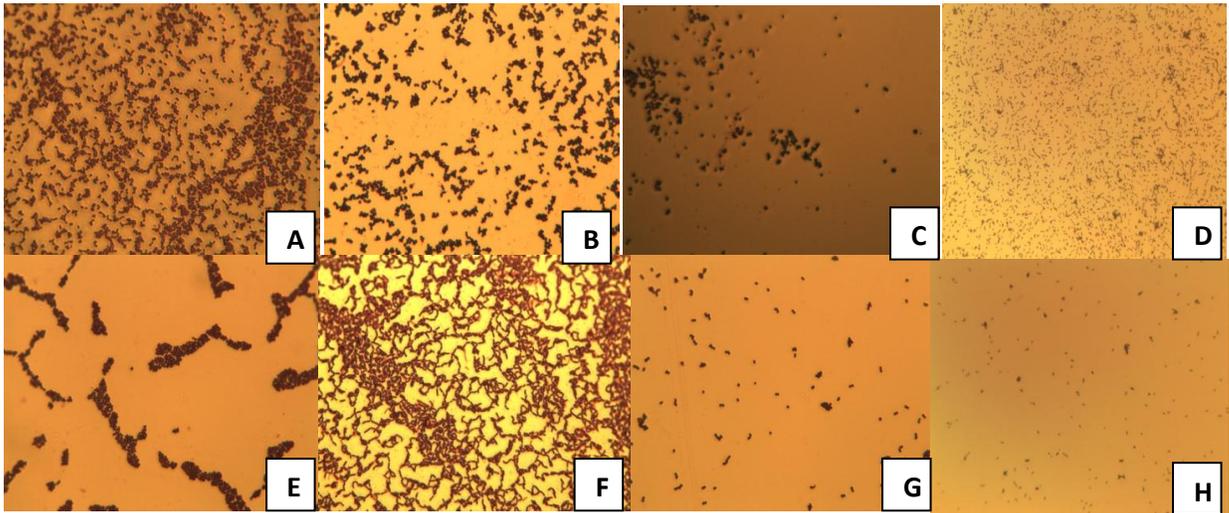


Figura 5. Cepas probióticas purificadas

4.2.1 Descripción de las cepas

A tinción de Gram: pertenece a la cepa denominada 02- 1, la cual fue obtenida de heces de bebe esta presenta morfología de cocos pequeños, tinción Gram positiva.

B tinción de Gram: pertenece a le cepa denominada manzana, los cuales son cocos grandes, tinción Gram positiva.

C tinción de Gram: pertenece a la cepa de frijol con características de cocos grandes, tinción Gram positiva.

D tinción de Gram: es la cepa denominada alfalfa, son bacilos grandes, tinción Gram positiva.

E tinción de Gram: pertenece a la cepa identificada como sotol filtrado la cual presenta características de cocos pequeños, tinción Gram positiva.

F tinción de Gram: muestra las características de la cepa Agua miel que son bacilos grandes, tinción Gram positiva.

G tinción de Gram: representa la cepa de San Rafael, con características de cocos grandes, tinción Gram positiva.

H tinción de Gram: pertenece a la cepa de Jocoque, obtenida de leche de cabra, tiene morfología de cocos pequeños, tinción de Gram positiva.

Todas las fotos fueron capturadas en objetivo 100x.

4.3 Conservación de las cepas

4.3.1 Liofilización

Las cepas probióticas fueron liofilizadas para poder conservarlas en buen estado por un periodo largo de tiempo, la forma y característica del producto final son esencialmente las originales pero con un contenido muy bajo de humedad (Figura 6).

La liofilización es el método de desecación en el que se elimina el agua por congelación del producto húmedo y posterior sublimación del hielo en condiciones de vacío. Al suministrar calor el hielo sublima y se evita el paso por la fase líquida.

La liofilización de cultivos bacterianos después de una selección de cepas bacterianas benéficas así como otros microorganismos benéficos de muy alta contaminación es un proceso de conservación para productos perecederos en su estado inicial.

Su reducido peso y volumen, la facilidad de incorporar **vitaminas y oligoelementos** y la capacidad de almacenaje bajo cualquier situación por

periodos de incluso hasta mas de 5 años, ya que es un método de conservación a largo plazo, estas son sus principales características. Esta práctica industrial sirve para preparar grandes cantidades, conservar largo tiempo y comercializar los probiótico.



Figura 6. Cepas probióticas liofilizadas

4.3.2 Congelacion

La conservación consiste en la conservación de los microorganismos a temperaturas inferiores a cero grados centígrados. Se basa en la paralización del metabolismo celular por la disminución del agua disponible. (Figura 7)



Figura 7. Microorganismos probióticos congelado

La congelación bacteriana es un método físico químico que permite conservar microorganismos viables por un tiempo sin sufrir cambios genotípicos. En este proceso se involucra el agua como microambiente y es ella la que cambia su estado de líquido a sólido; de otro lado, la bacteria inmersa en este medio debe adaptarse a las condiciones de este nuevo ambiente, transformar la velocidad de su metabolismo, conservar su viabilidad y evitar que los cristales de hielo formados por el cambio de temperatura del agua le ocasione algún daño.

ETAPA II. SELECCIÓN DE LA CEPA CON MAYOR CRECIMIENTO EN EL SUERO DE CABRA

La siembra de las muestras en placas conteniendo Agar MRS, produjo mayor crecimiento en tres de las cepas, jocoque, aislada de leche de cabra, 02-1 obtenida de heces de bebé y tabasco aislada de bebida fermentada. Mientras que las cepas de agua miel, san Rafael, pozol, obtuvieron un crecimiento medio, y por ultimo las de menor crecimiento fueron las de M2, sotol sin filtrar, sotol filtrado, suero, frijol, jagüey, calabaza, alfalfa y leche (Figura 8).

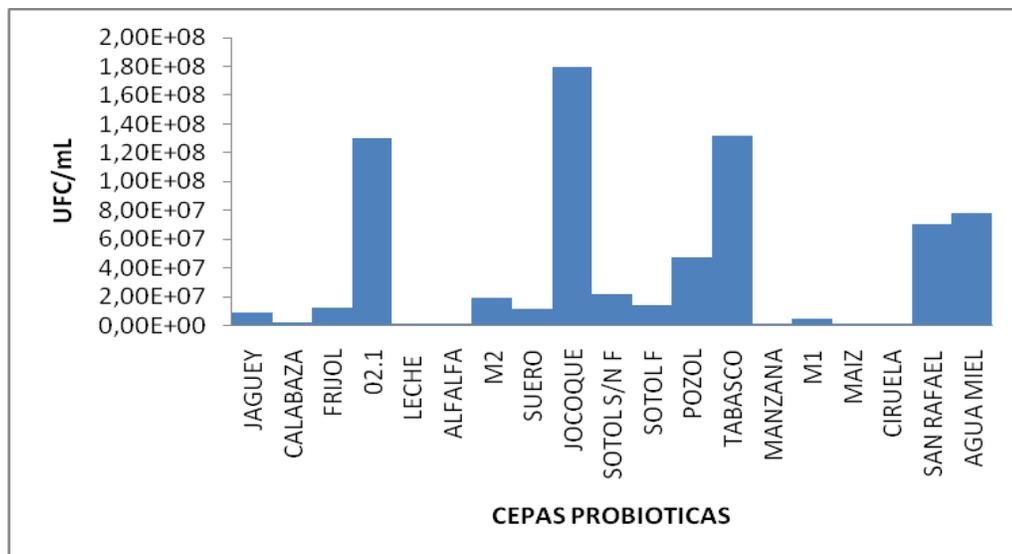


Figura 8. Crecimiento de las cepas.

De las 5 cepas que presentan el mayor crecimiento, la cepa identificada como jocoque produjo 1,80E+08 UFC/ml casi el doble que las ufc producidas por sanrafael y aguamiel. Las cepas de tabasco y 02-1 produjeron una cantidad de ufc/ ml muy similar. Por lo cual la cepa seleccionada fue Jocoque aislada de leche de cabra, debido a su rapida adaptación al medio de cultivo y su alta producción de ufc.

4.4 Desarrollo de tres diferentes medios de cultivo variando la relación C: N en base a suero lácteo de cabra.

Se realizo el análisis físico-químico al suero lácteo de cabra obteniendo como resultado un considerable contenido de proteína, caseína y de lactosa, sin embargo no contiene grasa ya que toda se deposita directamente en el queso dejando solo trazas grasa en el suero. (Cuadro 10)

Cuadro 10. Análisis físico-químico del suero lácteo de cabra

Análisis físico- químico del suero de cabra	contenido en %
Acidez	0.56
Proteína	3.8
Caseína	3.09
Grasa	Trazas
Lactosa	4.6

El calculo de la relación C: N da como resultado que el cultivo 1 tiene 1.2 gr de carbono el cual lo obtiene de la cantidad de lactosa presente en el suero lácteo de cabra, y 1 gr de nitrógeno obtenido de la cantidad de proteína en el suero lácteo de cabra, teniendo una relación C:N de 1.2/1.

En el cultivo 2 la cantidad de carbono es de 1 gr, lo obtiene del suero lácteo de cabra, el nitrógeno lo obtiene de la proteína del suero de cabra, extracto de levadura y del cloruro de amonio teniendo una cantidad de 1 gr, por lo cual la relación C: N es de 1/1.

Los resultados del cultivo 3 son muy similares al cultivo 2 con un resultado de 0.9 gr de carbono presentes en el suero de cabra, y 1 gr de nitrógeno obtenido del extracto de carne, peptona de caseína, cloruro de amonio y la proteína que contiene el suero lácteo de cabra, teniendo una relación C:N de 0.9/1. (Cuadro 11)

Cuadro 11.Relación C: N de los medios de cultivo 1,2 y 3.

MEDIOS DE CULTIVO	CARBONO	NITROGENO
MEDIO DE CULTIVO 1	1.2 gr.	1 gr.
MEDIO DE CULTIVO 2	1 gr.	1 gr.
MEDIO DE CULTIVO 3	0.9 gr.	1 gr.

4.5 Evaluación de los tres diferentes medios de cultivo

Los medios de cultivo fueron evaluados, para determinar cual de los tres es más factible para la producción de microorganismos probióticos, tomando en cuenta tres variables, determinación de ácido láctico, determinación de biomasa, y UFC/mL.

4.5.1 Determinación de ácido láctico en medio de cultivo 1

Los resultados indican que la cantidad de ácido láctico producido en el cultivo 1 va en aumento teniendo mayor contenido a las 96 h con un total de 2.05 gr/mL. Teniendo a las 36 h su fase estacionaria. (Figura 9).

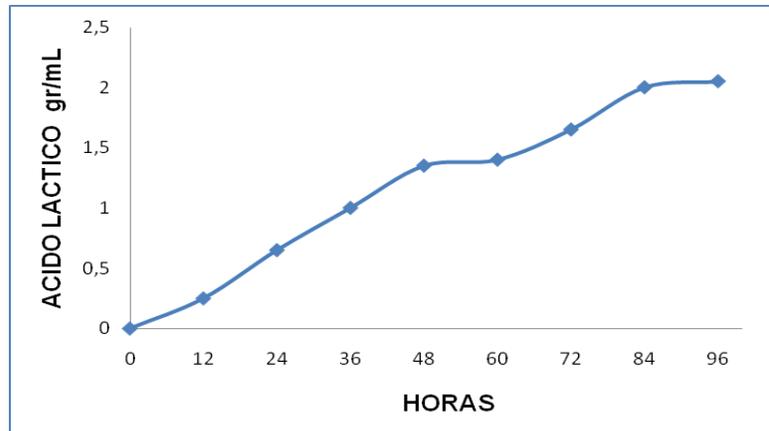


Figura 9. Determinación de ácido láctico en cultivo 1.

La cantidad de ácido láctico presente en el cultivo 1 se produce desde las 12 h con muy poco contenido en comparación con los cultivos 2 y 3, la mayor cantidad se presenta a las 96 h

4.5.2 Determinación de ácido láctico en medio de cultivo 2

Los resultados expresados en la figura 10 muestran que el contenido de ácido láctico en el cultivo 2 alcanza su nivel máximo a las 60 h con una cantidad de 4.4 gr/mL de ácido láctico, teniendo una disminución a la 72 h a 4.1 gr/mL, aumentando nuevamente a 4.3 gr/ mL a la hora 84 y manteniéndose con la misma cantidad a la hora 96.

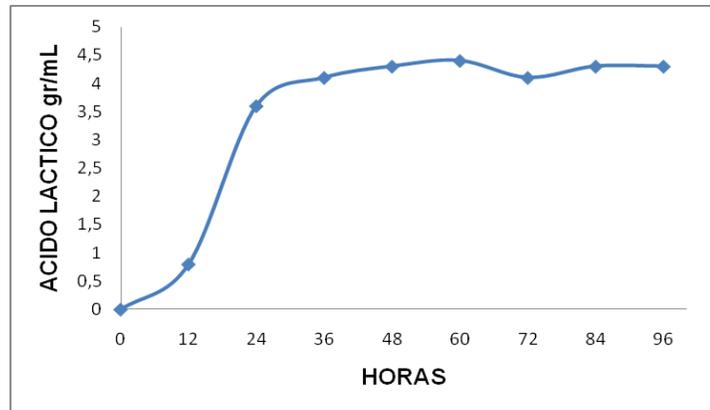


Figura 10. Determinación de ácido láctico en cultivo 2

Tomando en cuenta lo observado en la figura anterior se presenta la producción de ácido láctico a las 24 h con un valor de más del doble que el que se obtuvo en el medio de cultivo 1. Esto indica que el aumento en la cantidad de nitrógeno favorece la producción del Acido láctico.

4.5.3 Determinación de ácido láctico en medio de cultivo 3

Los resultados muestran que en la hora 60 se presenta la mayor cantidad de ácido láctico con un total de 11.25 gr/mL, pasando de esta hora el contenido del ácido láctico desciende, teniendo una ligera disminución a 9.8 a la hora 96.

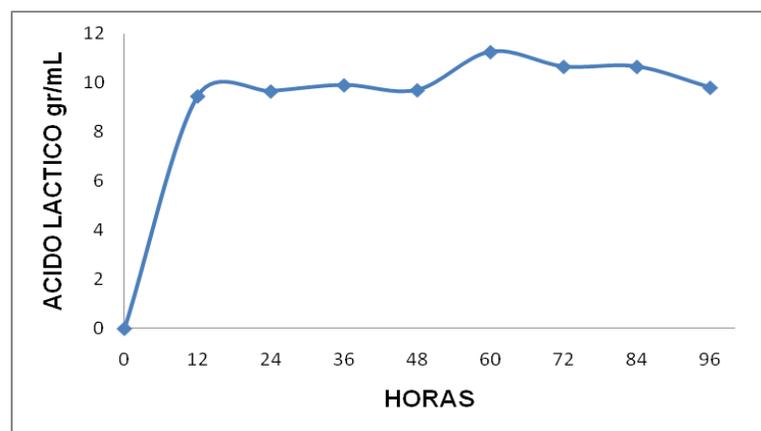


Figura 11. Determinación de ácido láctico en cultivo 3

La producción de ácido láctico en el cultivo 3 es demasiado alta comparándolo con el cultivo 1 y cultivo 2, obteniendo una cantidad superior al doble, la producción es constante en todas las horas comenzando con muy buen contenido desde las 12 h.(Figura 11).

4.5.4 Comparación de los resultados de los medios de cultivo

La determinación de ácido láctico fue evaluada en los diferentes medios de cultivo para seleccionar el que presenta mayor producción.

Los resultados indican que en el cultivo 3 es donde se produce la mayor cantidad de ácido láctico a la hora 60 de ahí en adelante la producción comienza a disminuir. El cultivo 2 y el cultivo 1 presentan muy baja producción en el cultivo 2 la mayor producción se presenta a la hora 60, mientras que en el cultivo 1 a la hora 96.

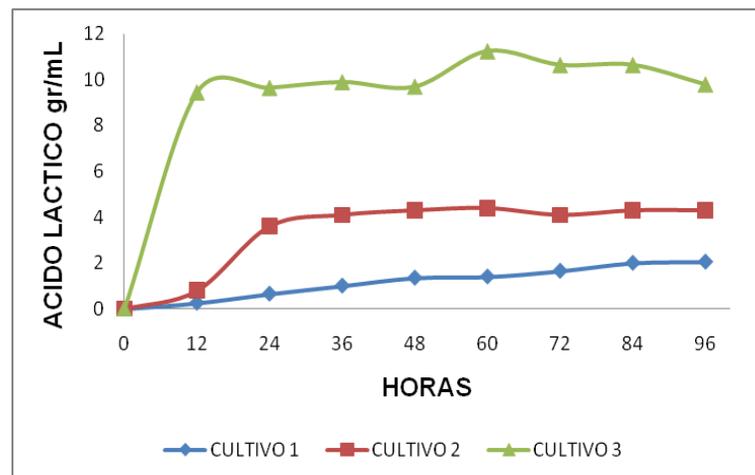


Figura 12. Comparación de resultados.

Los resultados indican que el cultivo 3 es mejor en la producción de ácido láctico teniendo un contenido superior al doble en comparación con el cultivo 1 y 2, su producción es constante comenzando con un alto contenido desde las 12 h manteniéndose constante hasta las 96 h, esto indica que el contenido de nitrógeno presente en este cultivo favorece la producción de ácido láctico (Figura 12).

4.5.5 Determinación de biomasa en cultivo 1

La determinación de biomasa en el cultivo 1 indica que el mayor contenido lo alcanza a las 60 h con un total de 9.5 g/L, manteniéndose constante, a la hora 84 y a la hora 96 con la misma cantidad en peso de biomasa (Figura 13)

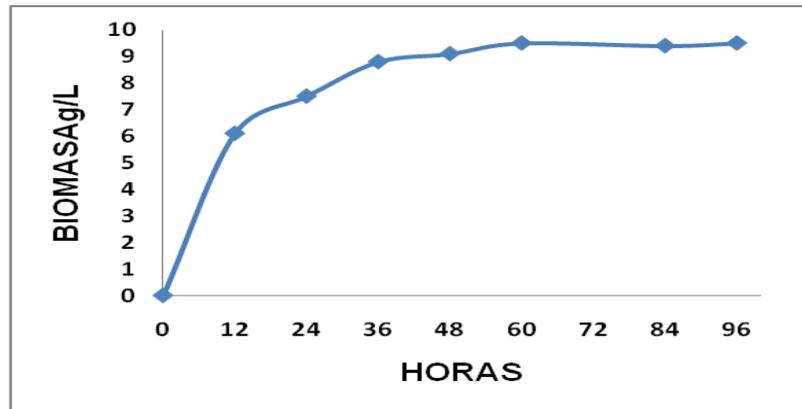


Figura 13. Determinación biomasa cultivo 1

La producción de biomasa en el cultivo uno presentó un contenido en peso considerable comenzando desde las 12 h, teniendo una producción constante hasta las 96 h, comparando con la producción del cultivo 2 y 3 el contenido de este cultivo es bajo, el resultado se ve influenciado por la cantidad de nitrógeno presente en este cultivo

4.5.6 Determinación de biomasa en cultivo 2

En el cultivo 2 los resultados obtenidos en determinación de biomasa varían un poco, alcanzando su máximo en peso a la hora 36 con un contenido de 13.7 g/L, a la hora 48 comienza a descender, llegando a la hora 84 este vuelve a subir, para posteriormente a la hora 96 tener un descenso.

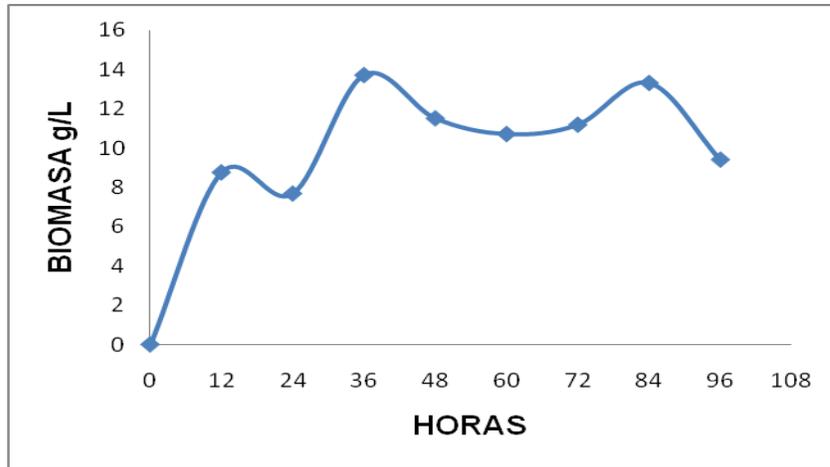


Figura 14. Determinación de biomasa cultivo 2

El contenido en peso de biomasa en el cultivo 2 es demasiado alto, la producción no es constante, teniendo altas y bajas, presentando un mayor peso a las 36 h. en comparación con el cultivo 1 su producción es mucho mayor (Figura 14).

4.5.7 Determinación de biomasa en cultivo3

En la figura 15 podemos observar que en el cultivo tres el máximo en peso lo alcanza a la hora 12 con una cantidad de 11 g/L, a la hora 24 este comienza a desender teniendo la mínima cantidad de biomasa a las 96 h.

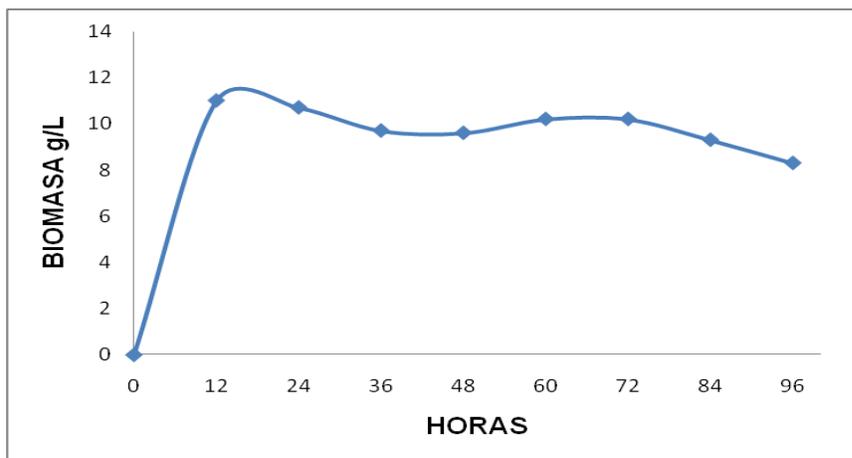


Figura 15. Determinación de biomasa cultivo3

La cantidad de biomasa en el cultivo 3 es constante durante la cinética de crecimiento alcanzando su máximo en peso rápidamente a las 12 h. mientras que el cultivo 1 su máximo en peso se presenta hasta las 96 h y en cultivo 3 a las 36 h, los resultados están relacionados con el contenido de nitrógeno presente en cada cultivo.

4.5.8. Comparacion de resultados en determinacion de Biomasa

Los resultados obtenidos en la determinacion de biomasa arrojan que el cultivo 2 es el que presenta mayor contenido, a la hora 36 con 13.7 g/L, seguido del cultivo 3 el cual tiene una mayor produccion de biomasa a las 12 h con 11 g/L el cultivo 1 fue el de menor produccion obteniendo la mayor cantidad de biomasa a la hora 60, con un total de 9.5 g/L de biomasa en peso (Figura 16).

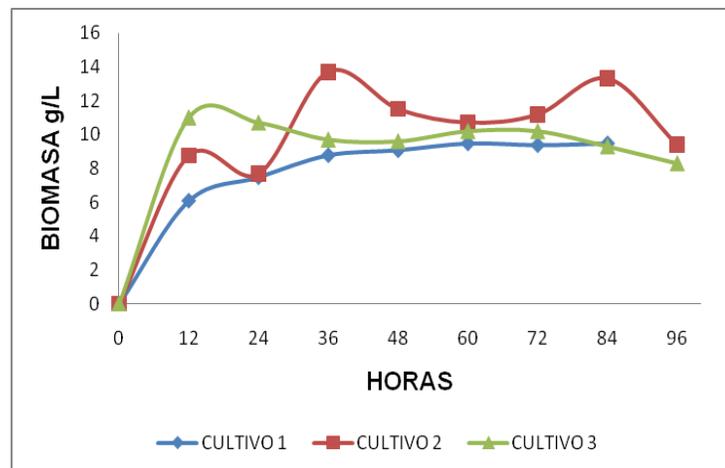


Figura 16. Comparacion de resultados en contenido de biomasa

La figura 16 indica que la mayor produccion de biomasa la presenta el cultivo 2, superando al cultivo 3 por una minima cantidad de 2.7 g/L y al cultivo 1 por un total de 4.3 g/L, por lo tanto el cultivo 2 es el indicado para la produccion de biomasa.

4.5.9 Cinetica de crecimiento cultivo 1

Los resultados plasmados en la figura 17 muestran que el mayor crecimiento de microorganismos probioticos se presenta en la hora 60, con crecimiento total de 5566000 colonias a la hora 72 los microorganismos alcanzan su fase de muerte.

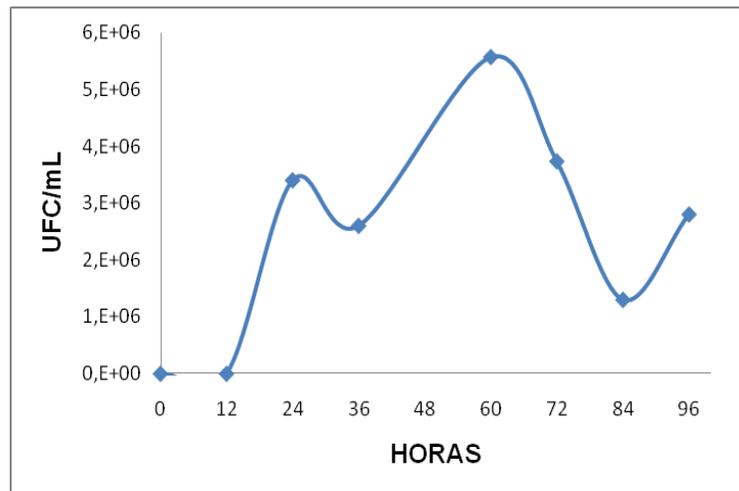


Figura 17. UFC/mL del cultivo 1

El crecimiento microbiano en el cultivo 1 es minimo la fase logaritmica de los microorganismos se presenta a las 24 h, durante la cinetica de crecimiento de este cultivo no se presenta una fase estacionaria al igual que en los cultivos 2 y 3.

4.6.0 Cinetica de crecimiento cultivo 2.

Los resultados de la cinetica de crecimiento en el cultivo 2 muestran que la hora donde los microorganismos alcanzan su nivel maximo de produccion es a las 48 h, con un total de 19000000 UFC/mL, apartir de la hora 60 los microorganismos comienzan su fase de muerte.

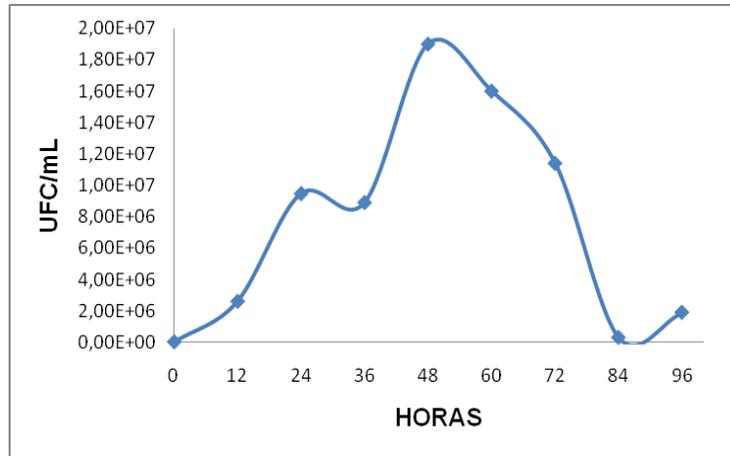


Figura 18. UFC/mL del cultivo 2

La producción de microorganismos durante la cinética de crecimiento en el cultivo 2 es mayor que la producción del cultivo 1 y menor que la producción del cultivo 3 (Figura 18)

4.6.1 Cinética de crecimiento cultivo 3

En el cultivo 3 los resultados obtenidos muestran que la mayor producción de microorganismos probióticos se presenta a las 12 h con un total de 32500000 colonias, a las 24 h el crecimiento desciende a 29500000 colonias, al llegar la hora 48 al canza su fase de muerte teniendo una producción de 0 colonias.

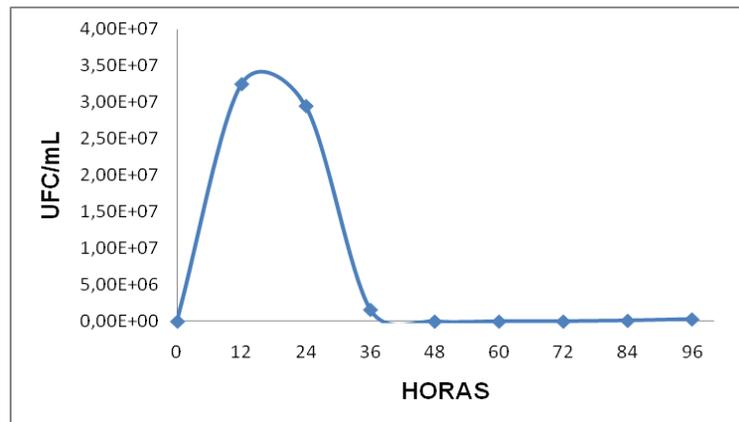


Figura 19. UFC/mL del cultivo 3

En el cultivo 3 la producción de microorganismos es alta y se presenta rápidamente a las 12 h, alcanza su fase de muerte a las 36 h, comparando con cultivos anteriores tiene una mayor producción microbiana y una fase de muerte mas rapida debido al contenido de carbono presente en el cultivo (Figura 19).

4.6.2 Comparacion de resultados UFC/mL

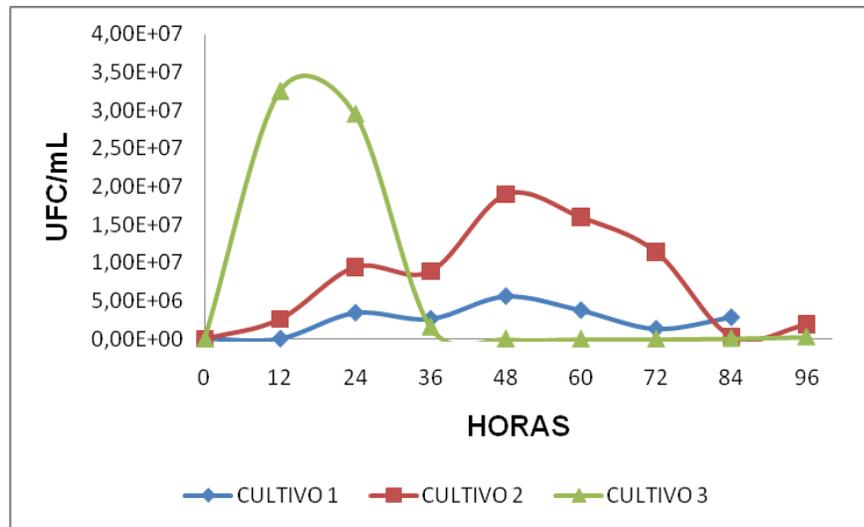


Figura 20. Comparacion de resultados UFC/mL

Los resultados obtenidos en la cinética de crecimiento indican que el cultivo tres presenta una rápida y alta producción de microorganismos a la hora 12, y a la hora 24, alcanzando su fase de muerte de forma rápida a la hora 36. El cultivo 2, tiene poca producción de microorganismos pero se mantiene hasta llegar a la hora 72 alcanzando su fase de muerte a la hora 84, el cultivo 1 su máximo nivel de crecimiento microbiano lo alcanza a la hora 48. (Figura 20).

V. CONCLUSIONES

Las 19 cepas pertenecientes a la colección de la empresa GBS Global S.A. de C.V. fueron identificadas morfológicamente obteniendo que nueve de ellas son cocos, las diez cepas restantes bacilos todas estas cepas son Gram positivas principal característica de los probióticos.

Se logro purificar y conservar las cepas probióticas mediante métodos diferentes de conservación, a corto plazo en placas, a mediano plazo congelación y a largo plazo liofilización.

La cepa prebiótica de Jocoque es la que mejor se adapto al medio de cultivo fabricado a base de suero lácteo de cabra, presentando la más alta producción de colonias en comparación con las demás cepas.

En la cinética de producción el cultivo 3 es el que presento mayor cantidad de UFC/mL y acido láctico, siendo el cultivo 2 el que presenta mayor cantidad de biomasa en peso, los resultados están influenciados por la diferencia en relación C:N de los medios de cultivo.

VI. LITERATURE CITADA

- Abee T, F.M Rombouts, J. Hugenholt, G. Guihard & L. Letellier 1994 Mode of action of Nisin Z against *Listeria monocytogenes* Scott a grow at high and low temperatures. Appl. Env. Microbiol. 60 (6) :1962-1968
- Abee T, TR Klaenhammer & L. Letellier 1994 Kinetic studies of Lactacin F, a bacteriocin produced by *Lactobacillus johnsonii* that form poration complex in the cytoplasmic membrane. Appl. Env. Microbiol. 60 (3) : 1006-1013
- Angulo, C. y Montoro, J. (2004). El sector lácteo de Castilla – La Mancha. Control basado en el sistema ARPCP.
<http://www.jccm.es/sanidad/salud/agroalimentaria/mlacteos>.
- Aurelio Hernández Muñoz, "Microbiología", Editorial Paraninfo, Madrid, 1997.
- Bernet M F, D. Brassat, JR Nesser & AL Servin 1993. Adhesion of human Bifidobacterial strain to cultured human intestinal epithelial cell and inhibition of Enteropatogen - cell interactions. Appl. Env. Microbiol. 9 (12) : 4121-4128.
- Blanca Edelia González-Martínez y Maribel Gómez-Treviño* Facultad de Salud Pública y Nutrición (Universidad Autónoma de Nuevo León) Julio-Septiembre 2001 *Facultad de Ciencias Biológicas (Universidad Autónoma de Nuevo León) E-mail: bgozale@ccr.dsi.uanl.mx probioticos
- Caplan M., R. Miller-Catchpole, S. Kaup, T. Russell, M. Lickerman, M. Amer, Y. Xiao & R. Thomson Jr. 1999. Bifidobacterial Supplementation Reduces the Incidence of Necrotizing Enterocolitis in a Neonatal Rat Model. Gastroent. 117: 577-583.
- Coconnier M., V. Liévin, M. Lorrot & A. Servin 2000. Antagonistic Activity of *Lactobacillus acidophilus* LB against Intracellular *Salmonella enterica* serovar Typhimurium Infecting Human Enterocyte-Like Caco-2/TC-7 Cells. Appl. Env. Microbiol. 66 (3) : 1152-1157.
- Consumer, Revista., Alimentos funcionales o enriquecidos. Obtenido Marzo 2003. Disponible en <http://revista.consumer.es/web/es/20020101/alimentacion/>

- Enrique Alfonso Cabeza Herrera² Bacterias ácido-lácticas (BAL): aplicaciones como cultivos estarter para la industria láctea y cárnica¹. "Enciclopedia Autodidáctica", Editorial Quillet, Barcelona, 1998.
- FAO. (2004). Statistical database. <http://apps.fao.org>.
- Fuller, R., 1994, History and development of probiotics, In, Probiotics, Ed. R. Fuller. Chapman y Hall, N.Y
- Gardiner G., R. Ross, JK Collins., G. Fitzgerald & C. Stanton 1999. Development of a Probiotic Cheddar Cheese Containing Human-Derived *Lactobacillus paracasei* Strains. Appl. Env. Microbiol. 64 (6) : 2192-2199.
- Gardiner G., R. Ross, JK Collins., G. Fitzgerald & C. Stanton 2000. Comparative survival rates of human-derived probiotic *Lactobacillus paracasei* and *L. salivarius* strains during heat treatment and spray drying Appl. Env. Microbiol. 66 (6) : 2605-2612.
- Gurría Treviño, F. (2004). "Situación del sector caprino en México", en: Revista Cabras. Marzo-Abril. 27-28.
- Hammes, W.P., N. Weiss, and W. Holzapfel. (1992). The Genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. In *The Prokaryotes*. Vol. II, eds. Ballows, A., H.G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder, and K.H. Schleifer. 2^oEd. Springer-Verlag, N.Y
- HASSAN, A.N. y FRANK, J.F. Starter cultures and their use. En H.E. Marth y L. Steele; Applied dairy microbiology. Second edition. Revised and expanded. Ed. Marcel Dekker, INC, New York, EEUU. 2001.
- Jerry Belanger, agosto 1987, Cría moderna de cabras lecheras, compañía editorial continental S. A., México
- Juárez, M., Ramos, M. y Martín –Hernández, C. (1991). Quesos españoles de leche de cabra. Fundación de estudios lácteos (FESLAC). Madrid. 34 pp.
- Juarez, M. (1986). "Physico –chemical characteristics of goat milk as distinct from those of cow milk", en: Production and utilization of Ewe's and Goat's Milk. International Dairy Federation, Bulletin 202.

- Khalil A H and E.H Mansour 1998 Alginate encapsulated Bifidobacteria survival in mayonnaise. J. Food Sc. 63 (4) : 702- 705
- Kimura K., A. McCartney, M. McConnell & G. Tannock 1997. Analysis of fecal populations of bifidobacteria and lactobacilli and investigation of the immunological responses of their human hosts to the predominant strains. Appl. Env. Microbiol. 63 (9) : 3394-3398.
- Landau, B y Molle, G. (2004). "Improving milk yield and quality through feeding", en: The future of the sheep and goat dairy sectors. International Dairy Federation, Zaragoza, Spain. 28 –30 Octubre.
- Lesur, Luis, manual del ganado caprino: una guía paso a paso: México: Trillas, 2004, 80 p.: il. Col; 27 cm –(como hacer bien y fácilmente), ISBN 968-24-7000-5
- Lomas Y., Rojas C., (2005). Aprovechamiento de suero de leche de cabra como sustrato para el desarrollo de un producto fermentado probiótico con *Bifidobacterim bifidun* y *Lactobacillus acidophilus*. VII séptimo Congreso Nacional de ciencia de los Alimentos y III Foro de ciencia y Tecnología de Alimentos. Guanajuato, Gto. p. 475-484.
- Lopez M C, LM Medina & R. Jordano 1998 Survival of Lactic Acid Bacteria in commercial frozen yogurt. J. Food Sc. 63 (4) : 706- 708.
- Los Microorganismos", ed. Círculo Lectores, 4ta edición, Barcelona, 1998
- Mack D., S. Michail, S. Wei, L. McDougall & M. Hollingsworth 1999. Probiotics inhibit enteropathogenic *E. coli* adherence in vitro by introducing intestinal mucin gene expression. Gastrointestinal and Liver Physiology. 276 (4) G941-G950.
- MARRE, H.P. 1978 Goat milk an use as hypo-allergenic infant food. Dairy goat Journal 43:363-365
- Meydani Nikbin S. and Ha woel-Kyu 2000. Immunologic effects of yogurt. Am. J. Clin. Nut..71 (4) : 861-872.

- Oliszewski, R., Rabasa, A., Fernández, J., Poli, M. y Núñez, M. (2002). "Composición química y rendimiento quesero de leche de cabra criolla serrana del noroeste argentino", en: *Zootecnia Trop.* 20 (2): 179 –189.
- Ph.D en Ciencia y Tecnología de los Alimentos, Universidad de León, España.
Microbiólogo, Especialista en Protección de Alimentos, Universidad de Pamplona, Colombia Email: enalcahe@unipamplona.edu.co
- Prats, C.A.1999. Establecimiento de un protocolo experimental para determinar la Adherencia in vitro de Lactobacilos a las células intestinales del cerdo.
Tesis
Presentada en opción al título de Másters en Radioquímica. ICA.
- Romero, J. (2004). "Programa de investigación e innovación tecnológica de la cadena alimentaria de carne y leche de caprinos". INIFAP, en: *Memorias de la XIX Reunión Nacional sobre Caprinocultura.* Acapulco, Gro. Noviembre.
- Roos N. and M. Katan 2000. Effects of probiotic bacteria on diarrhea, lipid metabolism, and carcinogenesis: a review of papers, published between 1988 and 1998. *Am. J. Clin. Nut.* 71 (2) : 405-411.
- Santos, A. (1987). *Leche y sus derivados.* México, Trillas. 224 pp
- Szilagyi A. 1999. Prebiotics or probiotics for lactose intolerance: a question of adaptation. *Am. J. Clin. Nut.* 70 (1): 105-106.
- Torres, Domínguez, C. (2004). "Principales razas caprinas en México", en: *Revista Cabras.* Marzo-Abril. 6-8.
- Trujillo, A. y Almudena, F. (2004). "Consumo de quesos de cabra en la Ciudad de Tequisquiapan, Qro. México", en: *Memorias de la XIX Reunión Nacional sobre Caprinocultura.* Acapulco, Gro. Noviembre.
- Van de Water, CL Keen & ME Gershwin 1999. The influence of chronic yogurt consumption on immunity. *J. Nut.* 129 : 1492S-1495S
- Vasconcelos, J.A. 1998. *Alimentos Funcionales. Conceptos y beneficios para la salud.* World of food science. The World of Food Science. Encontrado Febrero 22, 2002.

Wagner RD., C. Pierson, T. Warner, M. Dohnalek, J. Farmer, L. Roberts, M. Hilty & E. Balish 1997. Biotherapeutic Effects of Probiotic Bacteria on Candidiasis in Immunodeficient Mice. *Infect. Immun.*, 65 (10) ; 4165-4172.