

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA  
“ANTONIO NARRO”  
DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL**



**DEPARTAMENTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA EN ALIMENTOS**

**TESIS:**

**“Aislamiento de bacterias ácido lácticas con potencial  
probiótico”.**

Presentada por:

**BEATRIZ SARAHI ALEMÁN GONZÁLEZ**

Tesis presentada como requisito parcial para obtener el  
título de:

**INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA EN ALIMENTOS**

Buenvista Saltillo, Coahuila, México

Noviembre, 2017

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO  
DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL  
DEPARTAMENTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

TESIS

ASLAMIENTO DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS CON POTENCIAL PROBIOTICO

Presentada por:

BEATRIZ SARAHI ALEMÁN GONZÁLEZ

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

INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Aprobada por:

Dr. Mario Alberto Cruz Hernández.



PRESIDENTE

Dra. Ruth Elizabeth Belmares Cerda



SINODAL

Dra. Ana Verónica Charles Rodríguez



SINODAL

Dra. Dolores Gabriela Martínez Vázquez



SINODAL

Dr. José Dueñez Alanís.



COORDINADOR DE LA DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO  
DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL  
DEPARTAMENTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

TESIS

ASLAMIENTO DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS CON POTENCIAL PROBIOTICO

Presentada por:

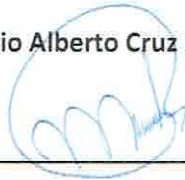
BEATRIZ SARAHI ALEMÁN GONZÁLEZ

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

INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Dirigido por el siguiente comité asesor:

Dr. Mario Alberto Cruz Hernández.



DIRECTOR

Dra. Ruth Elizabeth Belmares Cerda



DIRECTOR EXTERNO

Dra. Ana Verónica Charles Rodríguez



ASESOR

Dra. Dolores Gabriela Martínez Vázquez



ASESOR

## DEDICATORIA

A ti Dios por permitirme concluir esta etapa, porque tus tiempos son perfectos y este era el momento idóneo para cerrar este ciclo, porque tengo fe y sé que me acompañaras a lo largo de mi vida.

Con mucho amor a mi esposo Rafael Martínez por ser una gran persona, un ejemplo de padre, ser parte de mi vida y darme siempre un aliento de seguir adelante.

A mis hijas Beatriz y Lizeth que son lo más hermoso que he tenido en mi vida, son el motor de ella, y agradezco a Dios, por permitirme tenerlas a mi lado y ser el motivo de salir adelante siempre.

A mis padres Beatriz González y Ricardo Aleman porque aunque no estén en este momento a mi lado saben que los amo y todo esto también es gracias a su ayuda, por enseñarme a nunca darme por vencida y apoyarme cuando lo necesitaba.

A mis hermanos en especial a Paco y Mitzy por los consejos y el apoyo de ellos.

A mis sobrinas Karla y Laura porque aunque están chiquitas, siempre sé que cuento con ellas y ellas conmigo, y quiero que me tomen de ejemplo de que nunca se debe uno dar por vencido a pesar de todas las adversidades.

A mi mejor amiga Lorena Rodríguez por ser mi cómplice en todo, por apoyarme y siempre estar a mi lado.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Dr. Mario Alberto Cruz Hernández y su esposa la Dra. Ruth Elizabeth Belmares Cerda, por ser mis asesores, tener la confianza de poner este proyecto en mis manos, por el tiempo, el brindarme un poco de sus conocimientos, pero sobre todo por ser grandes amigos.

A la Dra. Ana Verónica Charles, por ser una gran maestra, y aceptar ser una de mis asesoras.

A la Dra. Gabriela Martínez por su tiempo, comprensión y darme ánimos para seguir adelante.

A mi Alma Terra Mater por formarme como ingeniero.

A mis amigos de la carrera en especial a Anahí y Verónica, que siempre conté y sé que cuento con ellos, por los buenos momentos que pasamos juntos.

A mis maestros, por el tiempo, la dedicación, y los conocimientos brindados.

## INDICE GENERAL

RESUMEN .....	12
1. INTRODUCCIÓN .....	13
2. OBJETIVOS .....	15
2.1 Objetivo general .....	15
2.2 Objetivos específicos .....	15
3. JUSTIFICACIÓN .....	15
4. ANTECEDENTES .....	16
4.1 Alimentos funcionales .....	16
4.1.1. Fibra dietética .....	18
4.1.2. Aceite de oliva: .....	19
4.1.3. Flavonoides cítricos: .....	20
4.1.4. Frutos secos: .....	21
4.1.5 Polifenoles del vino y del té: .....	21
4.1.6. Ajo: .....	21
4.1.7. Soya: .....	21
4.1.8. Colina y lecitina: .....	22
4.1.9. Aloe vera: .....	22
4.2. Leche Materna .....	22
4.2.1 componente de la leche madura .....	24
4.2.2 Inmunología de la leche humana .....	27
4.3. Leche de Vaca .....	30
4.3.1. Composición de la leche y su valor nutrimental .....	30
4.4. Leche de cabra .....	34
4.4.1. Composición de la leche de cabra .....	35
4.5. Morfología macroscópica de las bacterias .....	40
4.5.1. Bacterias ácido lácticas .....	41
4.5.2. Clasificación de las bacterias ácido lácticas. ....	42
- Clasificación de las bacterias acido lácticas según Orla Jensen .....	45
4.6. Probióticos .....	46
4.6.1. Probióticos y sus efectos .....	47
4.7. Prebióticos y simbióticos .....	50
4.7.1. Prebióticos .....	50

4.7.2.	Simbióticos .....	53
4.8.	Bacteriocinas .....	53
4.8.1	Clasificación de Bacteriocinas .....	54
4.8.2.	Modo de acción.....	56
4.8.3.	Bacteriocinas representativas .....	58
4.8.4.	Aplicaciones de las bacteriocinas.....	60
4.8.5	Fundamento del método Kirby Bauer .....	63
4.9.	Patógenos en Alimentos .....	63
4.9.1	<i>Salmonella</i> .....	63
4.9.2.	<i>Escherichia Coli</i> .....	64
4.9.4.	<i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	64
5.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	65
5.1.	Aislamiento.....	65
5.2.	Purificación.....	66
5.2.1.	Tinción de Gram .....	66
5.2.2.	Conservación de bacterias .....	66
5.3.	Caracterización de las bacterias.....	67
5.4.	Evaluación del efecto microbiano de las bacteriocinas .....	67
5.5.	Etapa 4. Identificación molecular de las cepas de BAL. ....	68
5.5.1.	Extracción de ADN de Bacterias Acido lácticas .....	68
5.5.2.	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) .....	71
5.3.2.	Electroforesis de PCR con gel de agarosa al 3%.....	73
6.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	75
6.1.	ETAPA 1: Aislamiento de la Bacterias.....	75
6.2.	ETAPA 2: Purificación e identificación de las bacterias ácido lácticas .....	75
6.2.1.	Características macroscópicas de las BAL aisladas. ....	75
6.2.2	Características microscópicas de las bacterias.....	79
6.2.3.	Conservación de cepas.....	82
6.3.	ETAPA 3: Caracterización de las bacterias ácido lácticas .....	83
6.4	Pruebas contra patógenos .....	84
6.4.1	Cepas Patógenas Purificadas.....	84
6.4.2.	Cuantificación de inhibición .....	86
6.5.	Identificación molecular.....	89

7.	CONCLUSIONES .....	90
8.	BIBLIOGRAFÍA .....	91
9.	Anexo 1.....	100
10.	Anexo 2.....	101
11.	Anexo 3.....	102



## INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Principales componentes funcionales.....	17
Tabla 2. Comparación de leche en la etapa de calostro y madura.....	27
Tabla 3. Resumen de inmunología de la leche materna.....	28
Tabla 4. Composición promedio de los nutrientes básicos de la leche de diversas especies.....	36
Tabla 5. Contenido de Vitaminas en la leche de cabra y vaca (cantidad en 100 g).....	39
Tabla 6. Contenido de minerales de la leche de cabra y vaca (cantidad en 100 gr).....	39
Tabla 7. Algunos probióticos y sus efectos.....	47
Tabla 8. Fórmulas para la sustitución de los datos obtenidos en la cuantificación del ADN.....	69
Tabla 9. Cantidades de los reactivos utilizados para PCR.....	72
Tabla 10. Tiempos y temperaturas para PCR.....	73
Tabla 11. Nomenclatura de las cepas aisladas y fuente de obtención.....	75
Tabla 12. Extractos obtenidos después de la ultrafiltración.....	83
Tabla 13. Identificación de bacterias Probióticas.....	89
Tabla 14. Halos de inhibición de <i>E. Coli</i> a Temperatura Ambiente a las 48 horas.....	100
Tabla 15. Halos de inhibición de <i>S. Aureus</i> a Temperatura Ambiente a las 48 horas.....	101
Tabla 16. Halos de inhibición de <i>K. Pneumoniae</i> a Temperatura Ambiente a las 48 horas.....	102

## INDICE DE FIGURAS

Fig. 1 Morfología macroscópica de las bacterias .....	40
Fig. 2 Forma y disposición de las células en tres géneros de bacterias del ácido láctico: (a) <i>Lactobacillus</i> ; (b) <i>Streptococcus</i> ; (c) <i>Pediococcus</i> .....	41
Fig. 3 Árbol filogenético de los géneros ácido lácticas, basado en la secuencia del gen del ARNr 16 S.....	42
Fig. 4 Ruta de EMP por la que las bacterias homofermentadoras del ácido láctico convierten la glucosa en ácido láctico .....	43
Fig. 5. Ruta del catabolismo de la glucosa por las bacterias heterofermentadoras del ácido láctico.....	44
Fig.6 Mecanismo de acción de las bacteriocinas por formación de poros en la membrana bacteriana.....	56
Fig. 7 Modo de acción de diversas bacteriocinas .....	57
Figura 8. Precipitado de las células en un tubo eppendorf para la obtención de ADN.....	69
Figura 9. Espectrofotómetro en proceso de calibración para cuantificar ADN.....	70
Figura 10. Cámara de electroforesis horizontal corriendo muestras de ADN en gel de agarosa...	71
Figura 11. Gel de electroforesis sobre sobre el transiluminador de luz UV para observar la calidad de las bandas.....	71
Figura 12. Termociclador con muestras de ADN, preparadas para realizar la PCR. ....	73
Fig. 13. Bacteria denominada como <b>LC2</b> , aislada de leche de cabra.....	75
Fig. 14. Bacteria denominada como <b>BS1</b> , aislada de leche materna.....	76
Fig. 15. Bacteria denominada como <b>BAA</b> , aislada de leche materna.....	76
Fig. 16. Bacteria denominada como <b>BD</b> , aislada de leche materna.....	77
Fig.17. Bacteria denominada como <b>LC1</b> , aislada de leche de cabra.....	77
Fig. 18. Bacteria denominada como <b>XE</b> , aislada de leche de vaca.....	78
Fig. 19. Bacterias denominadas <b>BAA</b> , vistas a 100 x.....	79

Fig. 20 Bacterias denominadas <b>LC1</b> , vistas a 100 x.....	79
Fig. 21. Bacterias denominadas <b>XE</b> , vistas a 100 x.....	80
Fig. 22. Bacterias denominadas <b>BD</b> , vistas a 100 x. ....	80
Fig. 23. Bacterias denominadas <b>BS1</b> , vistas a 100 x.....	81
Fig. 24. Bacteria denominada <b>LC2</b> , vista a 100 x.....	81
Fig. 25. Cepas conservadas en leche descremada con glicerol.....	82
Fig. 26. <i>E. coli</i> purificada vista con microscopio a 100 X.....	84
Fig. 27. <i>K. Pneumoniae</i> vista con microscopio a 100 X.....	84
Fig. 28. <i>Salmonella</i> purificada vista con microscopio a 100 X.....	85
Fig. 29. Halos de inhibición de <i>Salmonella</i> a las 48 horas.....	86
Fig. 30. Halos de inhibición de <i>K. Pneumoniae</i> a las 48 horas.....	87
Fig. 31 Halos de inhibición de <i>S. Aureus</i> a las 48 horas.....	88
Fig. 32. Halos de inhibición de <i>E. Coli</i> a las 48 horas.....	88

## RESUMEN

Las bacterias ácido lácticas (BAL) son un grupo de microorganismos representadas por varios géneros con características morfológicas, fisiológicas y metabólicas en común. En general las BAL son cocos o bacilos Gram (+), no esporulados, no móviles, anaeróbicos, microaerofílicos o aerolerantes; oxidasa catalasa y bencidina negativa, carecen de citocromos, no reducen el nitrato a nitrito y producen ácido láctico como el único o principal producto de la fermentación de carbohidratos.

El presente trabajo se caracterizó por el aislamiento de 6 cepas de bacterias ácido lácticas de diversas fuentes de obtención como son la leche materna, leche de vaca y leche de cabra, identificando sus características macroscópicas y microscópicas.

Dicho trabajo se realizó en el Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.

Las bacterias se sometieron a pruebas contra patógenos como son (*S. aureus*, *Salmonella*, *E. coli* y *K. Pneumoniae*), los cuales mostraron cierta inhibición debido al efecto de las bacteriocinas, para esta evaluación se utilizó el método de Difusión en disco (Kirby y Bauer).

Mediante pruebas de identificación molecular de 16S del ADN se logró identificar el género y especie de las bacterias ácido lácticas.

**Palabras Clave:** Bacterias ácido lácticas (BAL), inhibición, bacteriocinas.

## 1. INTRODUCCIÓN

Existen gran cantidad de procedimientos para la conservación de los alimentos como son los tratamientos químicos y radiaciones, dichos procedimientos se han visto cuestionados sobre sus potenciales riesgos para la salud del consumidor.

En la actualidad el hombre ha optado por el consumo de alimentos sin conservantes químicos ya que la tendencia nos ha llevado a adquirir alimentos más naturales, tratando de prevenir enfermedades de transmisión alimentaria, para ello, ha buscado aditivos naturales que nos permita mantener las características originales de dicho alimento.

Las bacterias ácido lácticas (BAL) son un grupo de microorganismos representadas por varios géneros con características morfológicas, fisiológicas y metabólicas en común, que tienen diversas aplicaciones, siendo una de las principales la fermentación de alimentos como la leche, carne y vegetales, para obtener productos como el yogurt, quesos entre otros; sin embargo también contribuyen en la biopreservación de los alimentos, mejorando las características sensoriales y aumentando la calidad nutritiva.

Dichas bacterias producen sustancias que en ocasiones no son aceptables organolépticamente ya que cambian un poco el sabor de los alimentos al producir diacetilo, ácidos orgánicos y peróxido de hidrógeno. Sin embargo existen otras cepas que son capaces de producir proteínas conocidas como bacteriocinas que pueden inhibir el crecimiento de microorganismos patógenos y deteriorantes de los alimentos.

Las bacterias del ácido láctico con sus bacteriocinas permiten una significativa reducción en el nivel de aditivos químicos obteniéndose alimentos más sanos. Además representan una herramienta adicional para prevenir enfermedades de transmisión alimentaria.

En los últimos años se han realizado diversas investigaciones sobre las bacteriocinas en torno a su detección, producción, purificación, forma de acción, caracterización química, propiedades bactericidas, entre otras, con el propósito de tener otras formas de conservación de los alimentos, ya que al ser producidas por BAL se asegura al consumidor que dicho alimento no le causara daño alguno, sino por el contrario tendrá beneficios en su salud, al consumir estas bacterias, que son microorganismo importantes para el buen funcionamiento del cuerpo, encargarse de restablecer el equilibrio de la flora intestinal, la cual puede verse afectada o dañada por malos hábitos alimentarios, virus de tipo gastrointestinal, el estrés o la toma prolongada de antibióticos, etc., entre otros beneficios que puede tener al ingerirlos.

El presente trabajo tiene como finalidad, purificar, identificar características macroscópicas, microscópicas y moleculares de 6 cepas de bacterias ácido lácticas aisladas de diversas fuentes, como lo son la leche materna, de vaca y de cabra. Se eligió este tipo de obtención por que la leche de materno como es bien sabido es un alimento ideal y completo ya que contiene grasa, lactosa, proteína, vitaminas hidrosolubles, carotenos y algunos minerales como sodio, zinc. Hablando en específico de los calostros que fue la que se utilizó, podemos mencionar que la concentración promedio de IgA y la lactoferrina que son proteínas protectoras están muy elevadas en esta etapa de la leche, junto a los oligosacáridos, una gran cantidad de linfocitos y macrófagos, confieren a esta una eficiente capacidad de protección contra los gérmenes del medio ambiente y se caracteriza por tener efecto antimicrobianos.

La leche de vaca es un alimento de primera necesidad, de gran demanda por su alto valor nutricional que se refleja en sus componentes, es considerada un alimento básico de toda la población en general, al igual que la leche materna contiene vitaminas, minerales, proteína grasa, hidratos de carbono que son necesarios en una ingesta diaria, atribuyéndole beneficios a los consumidores.

Al hablar de leche de cabra se puede mencionar que Coahuila ocupa el segundo lugar en producción de esta a nivel nacional, según datos del SIAP se estima una producción de 47,441.576 miles de litros al año, teniendo 6 potenciales regiones productoras entre los que podemos mencionar Acuña, Frontera, Laguna, Sabinas y Saltillo, siendo este último el segundo lugar a nivel estatal, esta es una de las razones por la que elegimos esta fuente de obtención, al ser una de las principales actividades de la zona es fácil de conseguir, además de que contiene todos los componentes de las leches antes mencionadas con la diferencia que ella aporta mayor porcentaje de calcio.

Cabe mencionar que otra parte importante de la finalidad de este trabajo es evaluar estas cepas en su efecto antimicrobiano con bacterias patógenas como *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhi*, y *Staphylococcus aureus*. Para determinar cuál es la que tiene mayor inhibición y con qué patógenos.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo general

Aislar bacterias ácido láctico de fuentes de leche materna, vaca y de cabra para su posterior identificación molecular y su caracterización como probióticos mediante comparación de macroscópica y microscópicas, pruebas de tolerancia de pH, resistencia a diferentes temperaturas, e inhibición de bacterias patógenas.

### 2.2 Objetivos específicos

- ✓ Aislar bacterias ácido láctico de diversas fuentes como leche materna, vaca y de cabra.
- ✓ Purificar las bacterias en medios de cultivos sólidos y líquidos, para su posterior conservación en mezcla de glicerol con leche descremada, protegiendo así la cepa.
- ✓ Caracterización de las cepas mediante ultrafiltración y sometimiento de estas a temperaturas de 70 y 80 °C.
- ✓ Realizar pruebas en placa contra patógenos como *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella*, y *Staphylococcus aureus*, para determinar su efecto inhibidor.
- ✓ Identificar molecularmente las bacterias ácido lácticas

## 3. JUSTIFICACIÓN

En la actualidad una de las preocupaciones más grandes en la industria de los alimentos es la conservación de los mismos. Existen diversas investigaciones sobre métodos de conservación de estos, sin embargo el consumidor, así como los fabricantes están optando por la disminución de conservadores y aditivos químicos ya que a corto plazo estos pueden causar daño a la salud de quien lo consume, como son alergias incurables, agravan a los asmáticos, provocan úlceras y hemorragias digestivas, hiperreactividad en los niños, a mediano plazo podemos mencionar que causan, mutaciones genéticas, insuficiencia renal, cefaleas en niños, obesidad, caries dentales y a largo plazo, tumores linfáticos y cáncer.

La cantidad de químicos que se ingiere actualmente al consumir productos como son sopas instantáneas, pasteles, papas embolsadas, refrescos, etc., es relativamente elevada ya que en forma individual cada uno de estos contiene cierto porcentaje de aditivos y conservantes químicos, permitidos por la ley.

En México existen las normas oficiales mexicanas que son las que establecen el tipo y la cantidad permitida para cada aditivo en los diversos alimentos. Uno de los organismos que vela por el bienestar íntegro del consumidor es la COFEPRIS (Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios) la cual cuenta con un amplio reglamento donde se considera cuidar la salud de la población con la producción de alimentos seguros.

La aplicación de microorganismos como bioconservantes en alimentos ha cobrado relevancia en los últimos años debido a las tendencias del mercado por consumir alimentos más naturales.

Este trabajo se enfoca a buscar microorganismos que puedan servir como bioconservantes de alimentos, al mismo tiempo de tener potencial probiótico asegurando al consumidor que ese producto no le causa daños a su salud, por el contrario tendrá efectos benéficos en ella, al consumir organismos que le regulen su flora intestinal a través de una alteración positiva de la microbiota por colonización del intestino, además de prevenir enfermedades como el cáncer, efecto del consumo constante de químicos en cantidades permitidas, y otro objetivo no menos importante de este proyecto es el no permitir que microorganismos patógenos muten y creen defensas sobre químicos, que conllevaría a desencadenar una serie de problemas que van la creación de nuevas enfermedades hasta pérdidas de vidas en lo que se encuentre una forma de contrarrestar lo antes mencionado.

## 4. ANTECEDENTES

### 4.1 Alimentos funcionales

El término Alimento Funcional (AF) fue propuesto por primera vez en Japón en la década de los 80's con la publicación de la reglamentación para los "Alimentos para uso específico de salud" ("Foods for specified health use" o FOSHU) y que se refiere a aquellos alimentos procesados los cuales contienen ingredientes que desempeñan una función específica en las funciones fisiológicas del organismo humano, más allá de su contenido nutrimental. Los alimentos de este tipo son reconocidos porque llevan un sello de aprobación del Ministerio de Salud y Bienestar del gobierno japonés (Arai 1996).

Los alimentos funcionales proporcionan beneficios para la salud más allá de la nutrición normal. Estos son diferentes de los alimentos médicos y los suplementos dietéticos, pero pueden superponerse con aquellos alimentos desarrollados para usos dietéticos especiales y alimentos fortificados.



Los AF son alimentos en los que algunos de sus componentes afectan funciones del organismo de manera específica y positiva, promoviendo un efecto fisiológico o psicológico más allá de su valor nutritivo tradicional. Dicho efecto puede ser contribuir a la mantención de la salud y bienestar, a la disminución del riesgo de enfermar, o ambas cosas (Ashwell 2005).

Algunas de las principales funciones son las relacionadas con un óptimo crecimiento y desarrollo, la función del sistema cardiovascular, los antioxidantes, el metabolismo de xenobióticos, el sistema gastrointestinal, entre otros (Palou y Serra 2000).

En Europa se define alimento funcional a "aquel que satisfactoriamente ha demostrado afectar benéficamente una o más funciones específicas en el cuerpo, más allá de los efectos nutricionales adecuados en una forma que resulta relevante para el estado de bienestar y salud o la reducción de riesgo de una enfermedad" (Roberfroid 2000).

Actualmente existen muchos alimentos funcionales en el mundo. En la Tabla se presentan algunos ejemplos de componentes de alimentos funcionales (Hasler 2000).

Tabla 1. Principales componentes funcionales

<b>Clase/componente</b>	<b>Origen</b>	<b>Beneficio potencial</b>
<b>carotenoides</b>		
Beta caroteno	Zanahoria	Neutraliza los radicales libres que podrían dañar a las células.
Luteína	Vegetales verdes	Contribuye a un visión sana
Licopeno	Tomate	Podría reducir riesgo de cáncer de próstata.
<b>Fibras dietéticas</b>		
Fibra insoluble	Cáscara de trigo	Podría reducir el riesgo de cáncer en el colon.
Beta glucano	Avena	Reduce el riesgo de enfermedad cardiovascular.
<b>Ácidos grasos</b>		
Omega 3, ácido graso DHA	Aceites de peces	Podrían reducir el riesgo de enfermedad cardiovascular y mejorar funciones mentales y visuales.
Ácido linoléico	Quesos, productos cárnicos	Podrían mejorar la composición corporal, podrían reducir el riesgo de ciertos tipos de cáncer.
<b>Flavonoides</b>		
Catequinas	Te	Neutraliza radicales libres, podría

		reducir el riesgo de cáncer
Flavonas	Cítricos	Neutraliza radicales libres, podría reducir el riesgo de cáncer
<b>Esteroles vegetales</b>		
Ester estanol	Maíz, soya, trigo	Reduce los niveles de colesterol sanguíneo
<b>Prebióticos/Probióticos</b>		
Fructooligosacáridos	Achicoria, cebolla	Podría mejorar la salud gastrointestinal
Lactobacilos	Yogurt	Podría mejorar la salud gastrointestinal
<b>Fitoestrógenos</b>		
Isoflavonas	Alimentos con soya	Podrían reducir los síntomas de la menopausia.

A continuación se describen algunos alimentos funcionales, sus características y la evidencia científica sobre su papel en la salud:

#### 4.1.1. Fibra dietética

El término “fibra dietética” fue primeramente utilizado por Hipsley en el año 1953 y, en 1969 el Dr. Denis P. Burkitt, fue pionero en relacionar el cáncer de intestino grueso y otras enfermedades a una dieta carente en fibra dietética. A partir de un estudio epidemiológico demostró que estas “enfermedades de la civilización” eran casi desconocidas en países africanos (Kenya, Uganda, Sudáfrica), donde la ingestión de fibra dietaria era más elevada (Bautista y Moreto 1995).

La fibra dietética se reconoce hoy, como un elemento importante para la nutrición sana. No es una entidad homogénea y probablemente con los conocimientos actuales tal vez sería más adecuado hablar de fibras en plural. No existe una definición universal ni tampoco un método analítico que mida todos los componentes alimentarios que ejercen los efectos fisiológicos de la fibra. Según Rojas Hidalgo, “la fibra no es una sustancia, sino un concepto, más aun, una serie de conceptos diferentes en la mente del botánico, químico, fisiólogo, nutriólogo o gastroenterólogo” (Rojas 1994).

Una definición más reciente, añade a la definición previa de fibra dietética el concepto nuevo de fibra funcional o añadida que incluye otros hidratos de carbono absorbibles como el almidón resistente, la inulina, diversos oligosacáridos y disacáridos como la lactulosa. Hablaríamos entonces de fibra total como la suma de fibra dietética más fibra funcional.

Es la materia vegetal resistente a la acción de las enzimas digestivas del tracto gastrointestinal humano (polisacáridos no digeribles). Se clasifica en:

#### 4.1.1.1. Fibra soluble (en agua):

Pectinas, gomas y mucílagos. Las fuentes de fibra soluble son frutas, legumbres y vegetales. Su consumo en cantidades elevadas ha demostrado en estudios epidemiológicos una reducción del riesgo de enfermedad coronaria en hombres y mujeres.

#### 4.1.1.2. Fibra insoluble:

Celulosa, hemicelulosa, lignina y celulosa modificada. Las fuentes de fibra insoluble son cereales, granos, legumbres y vegetales. Su consumo parece hacer disminuir los niveles séricos de colesterol y ejerce un efecto protector sobre la enfermedad coronaria debido a cambios en la agregación plaquetaria. El posible papel de la fibra en la prevención del cáncer de colon procede de estudios realizados en poblaciones africanas, porque son poblaciones donde se consumen elevadas cantidades de alimentos vegetales intactos y presentan una baja incidencia de dicho cáncer. 20 En cuanto al mecanismo de acción de la fibra se ha comprobado que aumenta la velocidad del tránsito intestinal y el tamaño del bolo fecal, favoreciendo la expulsión al exterior de los carcinógenos ingeridos o endógenos. Por todo esto, se puede concluir que las dietas con alto contenido en vegetales intactos y en fibra tienen un efecto protector frente al cáncer de colon y otras patologías.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) recomienda una ingestión diaria de 27 a 40 gramos de fibra dietética mientras que Food and Drugs Administration (FDA) propone a individuos adultos un consumo de 25 gramos de fibra por día cada 2000 kcal/día. Por otra parte el National Cancer Institute (NCI, Estados Unidos) considera un consumo óptimo entre 20-30 g/día para la prevención de cáncer de colon, sugiriendo no excederse de los 35 g/día de fibra dietaria (colli y col. 2003).

#### 4.1.2. Aceite de oliva:

Contiene ácido oleico, un ácido graso monoinsaturado (AGM), que representa entre el 56-84% del contenido de ácidos grasos. También contiene otros ácidos grasos saturados o AGS (palmitoléico, esteárico), y ácidos grasos poliinsaturados o AGP (linoléico, linolénico). El interés del aceite de oliva se debe a que en los países mediterráneos la incidencia de enfermedad coronaria y cáncer (en concreto cáncer de mama) es baja en comparación con otros países en los que no se consume aceite de oliva. La explicación podría estar en que los AGM y AGP reducen a la mitad los niveles de colesterol de la sangre en comparación con los saturados. Los niveles de compuestos fenólicos son junto con el ácido oleico los responsables de la mayor capacidad antioxidante de la Dieta Mediterránea. Los fenoles son muy buenos antioxidantes: cuanto mayor sea el contenido en fenoles del aceite de oliva virgen, mejor será su estabilidad oxidativa. Diferentes estudios

evidencian que existe una asociación entre el consumo de aceite de oliva y una menor incidencia de cáncer de mama debido, quizás, a una menor producción de radicales libres. Parece que también tiene efecto protector frente al cáncer de la cavidad oral y laringe y un mejor perfil lipídico global.

#### 4.1.2.1. Ácidos grasos $\omega$ -3:

Los aceites de pescado son ricos en un tipo de AGP denominados  $\omega$ -3. De ellos, los más importantes son los ácidos docohexaenóico (DHA) y eicosapentaenóico (EPA), que se han estudiado por su papel en la prevención de enfermedades como el cáncer de mama, las enfermedades cardiovasculares (ECV), la artritis reumatoide y diversas enfermedades inflamatorias. Los aceites de pescado ricos en ácidos grasos  $\omega$ -3 disminuyen la concentración plasmática de triglicéridos (TG), colesterol y apolipoproteína B (apoB) en las proteínas de muy baja densidad. Una característica importante es la capacidad del aceite de pescado para disminuir las arritmias cardíacas graves, como la fibrilación ventricular. Estudios realizados en Japón y Holanda confirman también el efecto protector del aceite de pescado frente a la isquemia cardíaca. La suplementación de la dieta con EPA y DHA mejora de forma notoria la función vascular y la actividad de las plaquetas.

#### 4.1.2.2. Ácido linóleo conjugado (CLA):

Nombre genérico para referirse a un conjunto de isómeros del ácido linóleo, de los cuales el más importante es el ácido 9,11-octadecadienoico. Está presente en pequeñas cantidades en los aceites de semillas y es relativamente abundante en las grasas animales, sobre todo la leche de los rumiantes. En la actualidad existe numerosa literatura científica acerca de los efectos del CLA en la salud humana, sobre todo en áreas como el control de la grasa corporal y el sistema inmune. Entre los posibles mecanismos de acción sobre la masa grasa del organismo, se postula que puede actuar aumentando la lipólisis o degradación de tejido graso y disminuyendo la lipogénesis o síntesis de masa grasa y la captación de ácidos grasos por los tejidos. Su acción sobre el metabolismo de los lípidos plasmáticos, disminuyendo el nivel de triglicéridos y del colesterol total en sangre puede ser la responsable de la reducción del riesgo cardiovascular.

#### 4.1.3. Flavonoides cítricos:

Los flavonoides constituyen un grupo de compuestos fenólicos presentes en muchas frutas, verduras, frutos secos, semillas y cereales. También se encuentran en el té y en el vino. Pueden encontrarse en forma libre, como glucósidos o como derivados metilados. Los flavonoides cítricos son metabolitos secundarios de gran actividad biológica y se encuentran sobre todo en los cítricos y en sus zumos. Los efectos beneficiosos que producen sobre la salud son:

- Propiedades antialérgicas
- Propiedades antiinflamatorias

- Propiedades antihipertensivas
- Propiedades diuréticas
- Papel importante en el cáncer y las hiperlipidemias.

Por lo tanto, el consumo de frutas y verduras está asociado con un menor riesgo de desarrollo de enfermedades cardiovasculares y otros procesos degenerativos.

#### 4.1.4. Frutos secos:

Son alimentos de origen vegetal ricos en fibra, macro y micronutrientes y otros componentes bioactivos. Son pocos los estudios realizados en relación al consumo de frutos secos y la enfermedad cardiovascular, pero todos han mostrado un efecto protector importante. Parece que el consumo de frutos secos hace disminuir la mortalidad total. Se han realizado varios estudios sobre el efecto del consumo de algún fruto seco (almendras o nueces) en los lípidos plasmáticos, observándose una disminución en la concentración de colesterol total y de LDL (Light Density Lipoprotein). La proteína de los frutos secos es similar a la de la soja, y puede tener como ésta un efecto beneficioso sobre el colesterol. Los frutos secos también contienen fibra, vitamina E con acción antioxidante, folatos que disminuyen los niveles de homocisteína y el riesgo de enfermedad coronaria; magnesio que mejora la contractilidad del corazón; flavonoides con propiedades antioxidantes, y esteroides, que inhiben la síntesis de colesterol.

#### 4.1.5 Polifenoles del vino y del té:

Según las investigaciones, los polifenoles presentes en las uvas y en el té poseen propiedades antioxidantes, tienen la capacidad de modificar los niveles plasmáticos de colesterol y la concentración de lipoproteínas, así como de inhibir la oxidación de las LDL y la agregación plaquetaria. Los polifenoles también se encuentran en muchas frutas y verduras. Los estudios sugieren que dietas ricas en estos alimentos son beneficiosas en la protección frente al cáncer y los procesos aterogénicos.

#### 4.1.6. Ajo:

Las propiedades medicinales del ajo se conocen desde la antigüedad. Parece que posee propiedades antimicrobianas, así como cierta capacidad de disminuir el riesgo de enfermedad coronaria y cáncer, además de un efecto modulador de la inmunocompetencia y una posible mejora de la función mental.

#### 4.1.7. Soya:

Las semillas de soya son fuente principal de fitoquímicos con efecto beneficioso para la salud. También contiene proteínas de alta calidad nutricional. Los alimentos a base de soja se presentan en cuatro formas: 1- Como ingredientes

crudos: semillas de soja sin procesar, concentrados de soja... 2- Como alimentos de soja tradicionales: “leche” de soja, queso de soja... 3- Como alimentos con soja de segunda generación: hamburguesas, perritos calientes... 4- Como alimentos con soja como ingrediente funcional: productos elaborados con harina de soja. Hay estudios que sugieren que las isoflavonas y la proteína de soja provocan efectos favorables sobre la salud ósea, porque la proteína de soja parece que disminuye la excreción de calcio. Hay que tener en cuenta que los datos de los que se dispone son todavía limitados. Se deben recomendar alimentos ricos en soja, especialmente a mujeres postmenopáusicas que no tienen terapia de reemplazamiento de estrógenos.

#### 4.1.8. Colina y lecitina:

La colina es necesaria para el funcionamiento normal del hígado. Este es el papel sobre la salud y la enfermedad de la colina que mejor se conoce. Además la lecitina y la colina pueden modificar el riesgo de ECV (Enfermedades Cerebro Vasculares). Estudios realizados en humanos sugieren que estas sustancias pueden mejorar la capacidad de aprendizaje y la memoria. Por otra parte, una ingesta crónica de cantidades inadecuadas de colina podría estar involucrada en el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer.

#### 4.1.9. Aloe vera:

Son muchas las propiedades bioactivas reconocidas a esta planta subtropical usada en aplicación externa como cicatrizante, reparadora y antienvjecimiento pero que también tiene importantes acciones internas; inmunológicas, antioxidantes y de protección intestinal.

## 4.2. Leche Materna

La leche humana es un líquido producido por la glándula mamaria, de gran complejidad biológica, constituido por nutrimentos, sustancias inmunológicas, hormonas, enzimas, factores de crecimiento, células inmunoprotectoras, etc., que la hacen nutricional e inmunológicamente apta para que un niño sea alimentado con ella en forma exclusiva durante los primeros seis meses de vida. La OMS recomienda la alimentación al seno materno hasta los dos años de edad, aun cuando se inicie la alimentación complementaria, pues la leche materna ofrece grandes beneficios. Capacitar al personal de salud acerca de sus beneficios, incrementará el apoyo y fomentará este alimento en los lactantes (García 2011).

Por su valor nutricional, la leche es suficiente para suplir las necesidades fundamentales del recién nacido. Sin embargo, no sólo debe ser considerada como la fuente principal de alimento sino como proveedora de inmunidad. A través de la leche materna se transfieren células de estirpe inmunológica al neonato lactante; las estirpes celulares presentes en la leche son varias y entre ellas

tenemos a linfocitos T, B y células Natural Killer en diferente proporción. En el calostro se puede observar una gran cantidad de células de estirpe inmunológica; posteriormente, la composición de la leche cambia y se le denomina de transición para luego ser madura; tanto en la de transición como en la madura puede observarse un menor número de células inmunológicas, aunque se desconoce si su funcionalidad es mayor o menor de la expresada por células presentes en calostro. La inmunidad humoral está mediada por la producción de inmunoglobulinas (Igs) por linfocitos B, siendo la principal la inmunoglobulina A secretora (IgAs); células B presentes en leche podrían colonizar y seguir aportando inmunidad humoral en el intestino del lactante.

- **Precalostro.** Es un exudado del plasma que se produce en la glándula mamaria a partir de la semana 16 de embarazo. Cuando el nacimiento ocurre antes de las 35 semanas de gestación, la leche producida es rica en proteínas, nitrógeno total, inmunoglobulinas, ácidos grasos, magnesio, hierro, sodio y cloro. Tiene bajas concentraciones de lactosa, ya que un recién nacido prematuro tiene poca actividad de lactasa.

- **Calostro.** Se secreta cinco a siete días después del parto, aunque en las mujeres multíparas puede presentarse al momento del nacimiento del bebé. Tiene una consistencia pegajosa y es de color amarillento por la presencia de  $\beta$ -carotenos. Su volumen puede variar de 2 a 20 mL/día en los tres primeros días; a medida que el bebé succiona, aumenta hasta 580 mL/día hacia el sexto día (Lawrence 2007).

Contiene una mayor cantidad de proteínas y menos cantidad de lactosa y lípidos que el precalostro. El calostro contiene linfocitos T, B y NK específicamente sensibilizados que se originan en el tejido linfático adyacente al tubo digestivo y que migran a la glándula mamaria, aportando a la leche células B inmunológicamente activas secretoras de IgA (Borgat 2006).

El calostro protege contra infecciones y alergias ya que transfiere inmunidad pasiva al recién nacido por absorción intestinal de inmunoglobulinas; además, contiene 2000 a 4000 linfocitos/mm<sup>3</sup> y altas concentraciones de lisozima (Lawton 1979).

- **Leche de transición.** Se produce durante el cuarto y hasta el décimo día postparto; en ella se puede detectar un aumento en el contenido de lactosa, grasa y vitaminas hidrosolubles con respecto al calostro; puede observarse una disminución en las proteínas, inmunoglobulinas y vitaminas liposolubles y en resumen un aumento sustancial de calorías. Estos cambios ocurren bruscamente y se estabilizan alrededor del día decimocuarto; el volumen promedio que produce la glándula mamaria es de entre 600 a 750 mL/día.

Progresivamente se elevan sus concentraciones de lactosa, grasas, por aumento de colesterol y fosfolípidos y vitaminas hidrosolubles; disminuyen las proteínas, las inmunoglobulinas y las vitaminas liposolubles debido a que se diluyen por el incremento en el volumen de producción, que puede alcanzar 660 mL/día hacia el día 15 postparto. Su color blanco se debe a la emulsificación de grasas y a la presencia de caseinato de calcio.

- **Leche madura.** Comienza su producción a partir del día 15 postparto y puede continuar por más de 15 meses. Su volumen promedio es de 750 mL/día, pero puede llegar hasta 1,200 mL/día en madres con embarazo múltiple. Contiene una alta concentración de grasa y proteínas de alto peso molecular.

#### 4.2.1 componente de la leche madura

- **Agua.** Representa el 87% del total de sus componentes 3,6 y cubre satisfactoriamente los requerimientos del bebé, aún en circunstancias extremas de calor, por lo que no se requieren líquidos suplementarios.
- **Osmolaridad.** La carga renal de solutos en la leche humana es de 287 a 293 mOsm, cifra mucho menor si se compara con la de fórmulas infantiles de leche entera de vaca (350 mOsm). Su importancia estriba en que a mayor carga renal de solutos, mayor será el requerimiento de líquidos claros que deben darse al bebé.
- **Energía.** Aporta 670 a 700 kcal/L en su mayoría a través de los hidratos de carbono y las grasas.
- **Hidratos de Carbono.** Aportan energía al sistema nervioso central. La lactosa es el principal hidrato de carbono que contiene; favorece el desarrollo de la flora intestinal por las *Bifidobacterias* e impide el crecimiento de microorganismos patógenos por ser acidificante; mejora la absorción de calcio y mantiene estable la osmolaridad de la leche porque conserva bajas concentraciones de sodio y potasio (Kunz y col. 2000; García 2011). La galactosa, sustrato del anterior, es fundamental para la formación de galactopéptidos y galactolípidos cerebrósidos en el sistema nervioso central. Cuenta además con más de 50 oligosacáridos que funcionan como factores de crecimiento de *Bifidobacterias*, falsos receptores para bacterias patógenas de la vía aérea contra *H. influenza* y *N. catharralis* y en la vía urinaria e intestinal, contra *E. coli* (Coppa y col. 1993; García 2011).
- **Grasas.** El volumen de lípidos difiere entre mujeres (de 1 a 7 g/dL). La leche humana aporta ácidos grasos de cadena larga cuyos precursores son el ácido linolénico (AAL, 18:3n-3) y el ácido linoléico (AL, 18:2n-6). Se conocen como ácidos grasos indispensables ya que no pueden ser sintetizados de *novo* por el ser humano y deben provenir de la dieta de la madre. Estos ácidos grasos se convierten en ácidos grasos poliinsaturados (LC-PUFA's) tales como el ácido docosaenoico (ADH; 22:6n-3)x3, vital en el desarrollo estructural y funcional de los sistemas visual-sensorial, perceptual y cognitivo del lactante; y el ácido araquidónico (AA; 20:4n-6), útil como sustrato para la síntesis de eicosanoides como las prostaglandinas, los leucotrienos y tromboexanos, que modulan las respuestas inflamatoria e inmune al activar la proliferación de linfocitos, células



asesinas, la producción de citocinas y de IgE en las células inflamatorias (Calder 2003).

La industria no ha podido igualar la relación que hay de 1.3:1 entre ácidos grasos poliinsaturados/saturados de la leche humana, cuya importancia clínica es contribuir a la absorción de calcio y fósforo. 3 Aporta concentraciones altas de colesterol, una grasa que se requiere en la proliferación de neuronas y en la mielinización de células gliales (Lawrence 2007). Además, favorece la constitución y especialización de enzimas como la hidroximetil-glutaril Coenzima A reductasa hepática y la 7  $\alpha$  hidroxilasa biliar, así como los receptores de lipoproteínas lo que durante la infancia se traduce en concentraciones séricas elevadas de colesterol total y lipoproteínas de baja densidad (LDL) para regular la diferenciación, proliferación y distribución de adipocitos en la vida adulta (Demmers 2005; García 2011). Además son un factor de protección contra la enfermedad coronaria aterosclerosa, ya que estas concentraciones séricas descienden. Finalmente, contiene lipasa, una enzima que mejora la digestión de las grasas por el lactante.

- **Proteínas.** En la leche materna hay entre 8.2 y 9 g de proteína por litro; su concentración se reduce con el progreso de la lactancia, independientemente de las proteínas que consume la madre (Feng y col. 2009). El tipo de proteínas que contiene la leche humana, la hacen única para la especie humana, ya que son de mejor biodisponibilidad gracias a la presencia de enzimas digestivas como la amilasa. Las proteínas de la leche humana se dividen en dos grupos: Las proteínas del suero, de las cuales la  $\alpha$ -lactoalbúmina es la más abundante (37%). Su importancia estriba en que actúa como cofactor en la biosíntesis de lactosa. Tiene baja alergenicidad, debido a un peso molecular de 14,500 Da, mucho menor si se compara con la  $\beta$ -lactoglobulina, que llega a pesar 36,000 Da, como en la leche entera de vaca y por tanto, en las fórmulas infantiles (Lopez 2007, Heine 1991; Ionnerdal 2003). La lactoferrina representa el 27% de total de seroproteínas. Se une al hierro para mejorar su transporte y absorción. La trascendencia protectora de la leche materna a nivel de mucosas como la boca, la nariz y el oído del lactante se debe a la inmunoglobulina A secretora que liga antígenos específicos en el tubo digestivo porque resiste la digestión debido a su estabilidad por un pH bajo. Finalmente, la lisozima actúa frente a la pared celular de bacterias Gram positivas.

La caseína, contribuye al transporte de calcio, fósforo y aminoácidos para fines estructurales a nivel celular. En la leche materna sólo hay dos de las tres subunidades que existen: la  $\beta$ -caseína que se une con la K-caseína y con los iones de fósforo para formar micelas de pequeño tamaño (30-75 nm) que comparado con los 600 nm que mide la  $\alpha$ -caseína de la leche de vaca, son mejor digeridas en el intestino del bebé (López 2007).

En los primeros diez días posparto la leche humana tiene una relación proteínas del suero/caseína de 90/10; cambia a 60/40 hasta los ocho meses y se mantiene en 50/50 hasta el fin de la lactancia, lo cual la vuelve fácilmente digerible. Entre los compuestos nitrogenados de la leche se encuentran los aminoácidos de los que sobresalen la taurina, por favorecer la digestión de grasas y el desarrollo del

sistema nervioso central; la carnitina, necesaria para la oxidación de lípidos en la mitocondria del cerebro y el ácido glutámico, la cistina y la glutamina que actúan como neuromoduladores y neurotransmisores. Y a los aminoazúcares, los péptidos y el factor de crecimiento epidérmico que contribuyen al desarrollo y función de la mucosa intestinal. Se han identificado en la leche humana 13 nucleótidos; destacan la adenosina, la cistidina, la guanosina, la uridina y la inosina que promueven el crecimiento y la maduración intestinal, favorecen la función inmune, modifican la microflora intestinal, incrementan la biodisponibilidad del hierro y aumentan la concentración de lipoproteínas de alta densidad y los ácidos grasos de cadena larga (Reyes 2011; Lönnerdal 2010).

- **Vitaminas.** En la leche madura las vitaminas hidrosolubles tienen una concentración óptima; la niacina y la vitamina C son las más abundantes (Aguilar 2005). De las liposolubles, la leche de mujer contiene mayores concentraciones de  $\beta$ -caroteno y la vitamina E (Allen 2008). A pesar de no tener niveles óptimos de vitamina D los bebés alimentados con leche materna no padecen raquitismo, ya que sí poseen un sulfato de esa vitamina, adquirida por vía transplacentaria que tiene actividad durante los primeros tres meses. En la leche materna los niveles deseables se alcanzan dando un suplemento a la madre; en forma exógena se adquiere por la acción del sol y de los rayos ultravioleta (Taylor y col. 2008).

La vitamina K nunca es óptima en leche materna (2 mcg/L) si se compara con los requerimientos diarios de 12 mcg/día, por lo que debe aplicarse a todo recién nacido 1 mg intramuscular en dosis única (Greer 1999).

- **Minerales.** Destaca el hierro, cuyas concentraciones se reducen a lo largo de la lactancia hasta mantenerse estable a los seis meses. Se absorbe entre 45 y 75% de su contenido total, mientras que la leche de vaca sólo es de 10%. Una explicación para esto es que el hierro en la leche materna se encuentra unido a las seroproteínas en 65 a 81% y una baja cantidad (2 a 14%) unido a la caseína, que al tener un paso lento por el estómago, sufre una degradación (Lönnerdal 2009). La relación calcio/fósforo de la leche materna es de 1.2 a 2; esto es útil en la absorción hasta de 75% del calcio, comparado con sólo 20% de la leche entera de vaca. De esto depende la formación del tejido óseo en la infancia (Abrams 2006).

- **Oligoelementos.** El zinc es parte de los sistemas activadores de las enzimas; su concentración en la leche humana es de 2 a 4  $\mu\text{g/mL}$  y tiene biodisponibilidad elevada: 45 a 58% de la fracción sérica de las proteínas.

El flúor, a pesar de su baja cantidad en leche materna, es útil para evitar las caries, lo cual es evidente si se compara a los niños alimentados al pecho materno con los alimentados con biberón. Finalmente, el magnesio se mantiene en equilibrio muy estable con el calcio en la leche humana para prevenir hipocalcemia en el recién nacido (Lönnerdal 2009).

Tabla 2. Comparación de leche en la etapa de calostro y madura

Componente	Calostro	Leche madura
Calorías (cal/L)	670	750
Minerales cationes (mEq/L) sodio, potasio, calcio, magnesio	70	50
Minerales aniones (mEq/L) fósforo, azufre, cloro	30	40
<b>Oligoelementos (µg/dL)</b>		
Hierro	70 µg/dL	3mg/dL
Cobre	40	1.1
Zinc	40	30
Proteínas (g/L)	10-12	23
Aminoácidos (g/L)	12	12.8
Nitrógeno no proteico (mg/L)	910	30-500
Lisozima (mg/L)	460	390
Hidratos de Carbono (g/L)	57	60-70
Grasas (g/L)	30	35-45
<b>Vitaminas (mg/L)</b>		
Vitamina A	1.61	0.61
Caroteno	1.37	0.25
Tocoferol	14.8	2.4
Tiamina	0.019	0.142
Riboflavina	0.302	0.373
Vitamina B <sub>6</sub>	-	0.15
Ácido nicotínico	0.75	1.83
Vitamina B <sub>12</sub> (mcg/L)	0.45	0.5
Biotina (mcg/L)	0.5	2
Ácido Fólico	0.5 µg/L	24-30 mg/L
Ácido pantoténico	1.8	2.5
Ácido ascórbico	72	52
<b>Adaptado de Aguilar 2005.</b>		

#### 4.2.2 Inmunología de la leche humana

Las células B ejercen la inmunidad específica contra un patógeno a través de la producción de anticuerpos. Las inmunoglobulinas presentes en la superficie de las células B se unen a sus antígenos complementarios; esta señal inicia la diferenciación de los linfocitos B para transformarse en células plasmáticas secretoras de anticuerpos. Las inmunoglobulinas presentes en leche humana cumplen funciones de neutralización y de opsonización. La leche materna contiene anticuerpos contra antígenos del medio ambiente. Los antígenos que penetran en la mucosa intestinal o a pulmones llegan al tejido linfóide asociado a la respectiva

mucosa (placas de Peyer en intestino o tejido linfoide en bronquios); es en este tejido linfoide donde el antígeno coexiste con linfocitos; tales linfocitos son entonces sensibilizados contra los antígenos ingeridos y luego viajan a la glándula mamaria y allí sintetizan y secretan anticuerpos. Cuando el neonato es alimentado con leche adquiere anticuerpos contra microorganismos ambientales a los que fue expuesta su madre. Sin embargo, hasta el momento se desconoce el origen preciso de las células B presentes en la glándula mamaria materna y si estas células llegaron a este tejido en condición de activación celular o si adquieren tal estado después de cierto tiempo de estancia en la glándula. Responder tales preguntas podría ayudarnos a comprender la fisiología inmunitaria de la leche y los mecanismos de adaptación inmunológica materno-neonatal (Calixto y col. 2011).

Por otro lado, diversos reportes sugieren que la inmunidad celular que confiere la leche es mediada por linfocitos T y que depende de células que expresan inmunofenotipos de CD3+CD4+ o CD3+CD8+ positivos. Algunos de estos estudios reportan que las células T presentes en mayor cantidad en la leche humana son aquellas con capacidades de regulación, sugiriendo que éstas podrían ser uno de los primeros subtipos celulares que colonizan al organismo del lactante receptor (Acosta y col.1994). Se ha reportado que los linfocitos T contenidos en la leche materna expresan una menor capacidad proliferativa en comparación con los linfocitos sanguíneos después de utilizar diversos activadores. Este resultado indicaría que las células T Podrían no ser funcionales en el lactante colonizado (Crago y Mestecky 1984).

Tabla 3. Resumen de inmunología de la leche materna

Componente	Función
Celular	
Macrófagos	Fagocita microorganismos ( <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> , <i>Salmonella</i> ), Hongos ( <i>Candida</i> ), virus (herpes simple) y protozoos por lactoperoxidasas. Madura enzimas del intestino por factor de crecimiento celular.
Polimeorfonucleares	Protege al tejido mamario de mastitis.
Linfocitos	Estimula inmunidad de memoria por la vía entero-mamaria.
Humoral	
Inmunoglobulinas (A,G,M,E,D)	Ofrece inmunidad pasiva al recién nacido. Antimicrobianos y antivirales al promover fagocitosis de neutrófilos. Formas anticuerpos contra bacterias y virus.
Proteínas	
Lactoferrina	Bacteriostático y antimicrobiano al atacar la membrana

	celular, secuestrar el hierro y bloquear el metabolismo de hidratos de carbono de <i>S. aureus</i> , <i>Vibrio cholerae</i> , <i>E. coli</i> , <i>Pseudomonas</i> . Antiviral (contra VIH, CMV; HSV)
Lisozima	Bactericida por lisis bacteriana de los peptidoglicanos de las bacteria, inmunomodulador y reductor del efecto endotóxico.
K-caseína	Antiadherente, promotor del crecimiento de <i>Bifidobacterium bifidum</i> .
Vitaminas (A, C y E)	Antiinflamatoria por eliminar radicales libres de oxígeno.
Nucleótidos	Madura células T, incrementa la actividad de las células asesinas, la reacción de anticuerpos frente a vacunas, la maduración intestinal y la reparación entérica después de las diarreas.
Enzimas	
Lipasa	Antibacteriana y contra protozoarios.
Catalasa	Antiinflamatoria, degrada el H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
Glutación peroxidasa	Antiinflamatoria, previene la peroxidación lipídica.
Factor activador plaquetario	Protege contra enterocolitis necrosante.
Hormonas	
Prolactina	Desarrollo linfocitos T y B, promueve la diferenciación del tejido linfoide intestinal.
Cortisol, tiroxina, insulina y factores de crecimiento	Madura el intestino y desarrolla mecanismos de defensa.
Citocinas	Inmunomoduladores del sistema inmunitario.
Factores bifidus	Estimula el crecimiento de <i>Bifidobacterium bifidum</i> y <i>Lactobacillus bifidus</i> , acidifican intestino al producir ácidoacético, ácido fórmico y ácido succínico Gram negativo ( <i>E. coli</i> , <i>Shigella</i> , <i>Bacteroides fragilis</i> , <i>S.aureus</i> ) y Protozoarios.
Complemento	Específicamente C3 y C4. Provoca lisis bacteriana junto con anticuerpos específicos (IgG e IgM) y tiene actividad opsonizante, quimiotáctica y bacteriolítica.
<b>Reyes y Martínez 2011.</b>	

### 4.3. Leche de Vaca

La leche es un líquido secretado por las glándulas mamarias de las hembras de los mamíferos, tras el nacimiento de la cría. Es un líquido de composición compleja, blanco y opaco, de sabor dulce y reacción iónica (pH) próxima a la neutralidad. La función natural de la leche es la de ser el alimento exclusivo de mamíferos jóvenes durante el período crítico de su existencia, tras el nacimiento, cuando el desarrollo es rápido y no puede ser sustituida por otros alimentos.

En la vaca, existen en realidad cuatro glándulas independientes habitualmente llamadas “cuartos” (anterior derecho, anterior izquierdo), que no tienen en común más que la envoltura cutánea. La mama se encuentra suspendida de la región pubiana del abdomen mediante ligamentos carentes de elasticidad. En otras numerosas especies de mamíferos, las mamas se encuentran separadas y dispuestas simétricamente, dos a dos, de la región torácica a la región inguinal.

En la ubre de la vaca, los ácinos se reúnen en racimos formando los lóbulos; éstos se comunican, por un conducto colector ramificado, con la cisterna (seno glactóforo) situada en la base de la mama. Esta cisterna desemboca en el seno del pezón por un repliegue de la mucosa. El pezón el exterior mediante un fino canal único, ocluido por un pequeño esfínter liso. El conjunto forma reservorio de importante capacidad, estimado en unos 8 litros para la totalidad de los cuatro cuartos de una vaca lechera de tipo medio (Charles 1985).

La leche de vaca es un alimento de primera necesidad, de gran demanda por su alto valor nutricional que se refleja en sus componentes, es considerada un alimento básico en la dieta de niños, ancianos, enfermos, y en general de toda la población.

#### 4.3.1. Composición de la leche y su valor nutrimental

De todos los alimentos que consume el hombre, sólo la leche tiene como único objetivo el de servir de alimento como tal. Consecuentemente, se espera que su valor nutritivo sea muy alto. La leche es un alimento casi completo, ya que sólo es pobre en hierro, vitamina D y vitamina C. Su riqueza en energía, proteínas de fácil asimilación, grasa, calcio, fósforo y varias vitaminas hacen de la leche el alimento básico del lactante y, en general, del niño en sus primeros cuatro años de vida, aunque también es muy importante en otras etapas de la vida (Korhonen H y Pihlanto A. 2003). Está compuesta por grasa, proteína, lactosa, minerales (sólidos totales) y agua. Su valor nutricional así como el económico están directamente asociados con su contenido de sólidos (Steijns. 2008).

#### 4.3.1.1. El agua

El agua es la fase dispersante, en la cual los glóbulos grasos y demás componentes de mayor tamaño se encuentran emulsionados o suspendidos.

Las sustancias proteicas se encuentran formando un coloide en estado de .sol. liófilo (caseína y globulina) o liófilo (albúmina), mientras que la lactosa y las sales se hallan en forma de solución verdadera. El peso específico de la leche oscila entre 1.027 y 1.035, con una media de 1.032. El punto de congelación se encuentra por término medio entre  $-0.54^{\circ}\text{C}$  y  $-0.55^{\circ}\text{C}$  (valores límites:  $-0.51^{\circ}\text{C}$  y  $-0.59^{\circ}\text{C}$ ) en virtud de la lactosa y sales disueltas; la técnica de su determinación se llama crioscopia y ha sido también adoptada en el examen de la leche para determinar posibles adulteraciones por adición de agua. También puede influir sobre el punto de congelación de la leche la acidificación, en cuyo caso el punto crioscópico disminuye. El calentamiento de la leche origina la elevación del punto de congelación (Lerche Martín 1969).

#### 4.3.1.2. Proteínas

La proteína contenida en la leche es del 3,5% (variando desde el 2.9% al 3.9%). Esta proteína láctea es una mezcla de numerosas fracciones proteicas diferentes y de pesos moleculares distintos. Las proteínas se clasifican en dos grandes grupos: caseínas (80%) y proteínas séricas (20%). (Agudelo y col. 2005).

- **La caseína** es la proteína más abundante, además de ser la más característica de la leche por no encontrarse en otros alimentos, existen tres tipos de caseínas (a, b y *Kapa caseína*), en la leche también se encuentra la albúmina y la globulina. El valor biológico de la caseína en la alimentación obedece a su contenido en aminoácidos esenciales que se separan de la parte acuosa por acción de enzimas como la renina o la quimiocina, que son las responsables de la precipitación de la proteína en el elaboración de quesos ( Lerche Martín 1969).

El comportamiento de los diferentes tipos de caseína en la leche al ser tratada con calor, diferente pH (acidez) y diferentes concentraciones de sal, provee las características de los quesos, los productos de leche fermentada y las diferentes formas de leche (Agudelo y col. 2005).

- **La albúmina** es la proteína de la leche, que sigue en cantidad a la caseína, con una cifra aproximada de 0.5%. Mientras que la caseína es relativamente estable a la acción del calor, las albúminas se desnaturalizan con facilidad al calentarlas. Por esta razón durante el proceso de calentamiento a altas temperaturas se destruye gran parte de la proteína sérica (Lerche Martín 1969).

-**Las globulinas** de la leche, son proteínas de alto peso molecular que se encuentran preformadas en la sangre. También es posible que parte se produzca en las células del parénquima mamario.

Son las proteínas que más fluctuaciones experimentan en el transcurso de un período de lactación, desde 9% al 16% del total de la proteína, que es la tasa que puede alcanzar en el calostro, disminuye hasta ser de sólo unas milésimas de dicho porcentaje en las últimas etapas de la lactancia (Lerche Martín 1969).

Los anticuerpos o inmunoglobulinas que se encuentran en el calostro son proteínas que se encuentran en el torrente sanguíneo, y hacen parte del sistema inmunológico cuya función es neutralizar y ayudar a destruir bacterias, así como otras partículas extrañas que hayan invadido el cuerpo; debido a esto se hace necesario el consumo de calostro en las primeras horas de vida del neonato (Abul y col. 1996).

#### *4.3.1.3. Componente graso*

La grasa láctea se sintetiza en su inmensa mayoría en las células secretoras de la glándula mamaria y constituye cerca del 3% de la leche; se encuentra en forma de partículas emulsionadas o suspendidas en pequeños glóbulos microscópicos, cuyos diámetros pueden variar de 0.1 a 0.22 micrones que se encuentran rodeados de una capa de fosfolípidos que evitan que la grasa se aglutine y pueda separarse de la parte acuosa. La grasa de la leche puede sufrir alteraciones causadas por la acción de la luz, del oxígeno y enzimas (lipasas).

Los procesos hidrolíticos oxidativos conducen a la formación de peróxidos, aldehídos, cetonas y ácidos grasos libres, originándose así alteraciones del sabor que se hace sebáceo o rancio.

El contenido de grasa puede variar por factores como la raza y las prácticas de debidas a la alimentación además, se mantiene constante en los diversos períodos de lactación, tan sólo en el calostro parece disminuir su porcentaje. Se ve afectada si por el estado sanitario de la ubre presentando disminuciones significativas cuando se presentan procesos inflamatorios o infecciosos (Lerche Martín 1969).

#### *4.3.1.4 Elementos Minerales*

La leche de vaca contiene sodio, potasio, magnesio, calcio, manganeso, hierro, cobalto, cobre, fósforo, fluoruros, yoduros. Además, se reconoce la presencia de otros en cantidades vestigiales, como el aluminio, molibdeno y plata.

En la membrana de los glóbulos grasos se encuentran en mayor concentración el calcio, cobre, hierro, magnesio, manganeso, fósforo y zinc.

Una parte de los metales, sobre todo los alcalinos y los halógenos, se encuentran libres en forma de iones en solución. El calcio, por el contrario, se halla en su mayor parte ligado a la caseína. Tan sólo un tercio del calcio y del magnesio se encuentra en disociación iónica. Además de los cloruros y fosfatos, deben mencionarse también los citratos, presentes en una cuantía media de 2.3 gr/Lt.

Durante la duración de la lactancia descienden primero los contenidos de calcio y fósforo, para al final volver a aumentar ligeramente. Asimismo disminuye la tasa de potasio, mientras que la de sodio muestra desde el principio tendencia a aumentar.



El contenido de calcio se ve influido por la época del año. La tasa de magnesio permanece prácticamente invariable. Reviste especial interés la cantidad de cobalto ya que este elemento es imprescindible para la síntesis de vitamina B12, tan importante para los animales y el hombre.

El cobre por su parte experimenta notables oscilaciones (entre 0 y 80 mg/L), la concentración de este mineral se halla disminuida en la leche de vacas que pastaron en llanuras ácidas. La leche de épocas secas es más pobre en cobre, que la de la época lluviosa. Las alteraciones secretoras, las enfermedades del metabolismo y otros estados patológicos originan en su mayoría notables cambios en la concentración de los elementos minerales. Como primer signo de un trastorno secretor es particularmente frecuente que descienda la tasa de calcio, haciendo que la leche pierda sus propiedades de coagulación (Lerche Martín 1969).

#### 4.3.1.5. Vitaminas

La leche contiene vitaminas como la A, D, E, K, B1, B2, B6, B12, C, carotenos, nicotinamida, biotina, ácido fólico, su concentración está sujeto a grandes oscilaciones. El calostro posee una extraordinaria riqueza vitamínica, contiene de 5 a 7 veces más vitamina C y de 3 a 5 veces más vitaminas B2, D y E que la leche normal. También influye la época del año, tiempo atmosférico, ambiente y la alimentación; este último factor repercute especialmente en los carotenos y en la vitamina A como consecuencia de la abundante ingestión de carotenos cuando la base de la alimentación son forrajes frescos.

La vitamina E por su parte es 10% más abundante en épocas en que el ganado tiene acceso a forraje más toscos, lo cual posiblemente dependa del mayor contenido graso de la leche en verano.

Por lo general, la concentración de las vitaminas hidrosolubles se conserva constantemente. En la vitamina C se observan fluctuaciones dependiendo de la alimentación. Son variadas las influencias de la manipulación de la leche sobre su contenido vitamínico ya que en el simple almacenamiento se producen pérdidas de vitaminas, dependientes de la temperatura y de las radiaciones lumínicas (Lerche Martín 1969).

#### 4.3.1.6. Enzimas

Las enzimas contenidas en la leche se aprovechan para efectos de inspección y control, ya que muchas de ellas influyen en la calidad de la leche y en el origen de distintas alteraciones. Las enzimas de la leche carecen de valor desde el punto de vista alimenticio, sobre todo para los organismos ya desarrollados.

Las enzimas lácteas tienen dos orígenes: las corporales y las enzimáticas. Las primeras llegan directamente a la leche -en la que se encuentran en forma libre-procedentes de la sangre, o bien de las células corporales. Pero también pueden llegar a la leche con las células. En ambos casos se trata de enzimas originadas en el organismo.

Las segundas se originan en la leche misma, producto de la acción de los gérmenes.

Existen dos grupos de enzimas: las hidrolasas cuyo mecanismo de acción se caracteriza por un desdoblamiento hidrolítico, a este grupo pertenecen entre otras, las estererasas, lipasas, carbohidratasas y proteasas. Entre las estererasas es importante la lipasa que actúa cuando la leche es depositada sin refrigeración, dándole un sabor rancio.

Las lipasas se inactivan a temperaturas superiores a los 60°C, por lo tanto no son evidenciables después de la pasteurización. A las estererasas pertenecen también las fosfatasas que se dividen en ácidas y alcalinas, la fosfatasa alcalina se encuentra preferentemente en la membrana proteica de los glóbulos grasos y es inactivada al someter la leche a procesos de calentamiento (62°C durante 30 minutos o a 72°C 15 segundos).

El otro grupo importante de enzimas son las oxido- reductasas, las más importante son la catalasa y la peroxidasa que sirven como indicadoras de la calidad microbiológica de la leche (Lerche Martín 1969).

#### **4.4. Leche de cabra**

La cabra fue el primer animal domesticado por el hombre capaz de producir alimento, hace cerca de 10 000 años. Desde entonces, siempre acompañó la historia de la humanidad, conforme testifican los diversos relatos históricos, mitológicos y bíblicos, que mencionan a los caprinos. A pesar de eso, pocas veces tuvo su valor debidamente reconocido (Doria, 1997, Bidot y Muñoz, 2016).

La leche de cabra ha sido un componente esencial de la "dieta mediterránea" en sus orígenes, especialmente mediante su transformación en queso, como señalan los autores clásicos Catón, Virgilio, Columela, Plinio, Ateneo, mostrando no sólo las formas de hacer el queso, sino los tipos que existían ("oxigala", "moretum") o incluso algunas especialidades culinarias como un pastel ("sabilium") a base de queso, miel, harina y huevos, espolvoreado con semillas de amapolas y cocido al horno (Otogalli y Testolin, 1991; Capdevila y Martí-Henneber, 1996). También en esa época se conocía la leche fermentada, mostrándose en el Deuteronomio como "uno de los alimentos dado por Jehová a su pueblo". Desde aquellas épocas clásicas a la actualidad, la cabra ha tenido un papel primordial en la producción de alimentos de calidad para el hombre, especialmente en las regiones desfavorecidas del mundo, donde todavía dichos alimentos constituyen la principal fuente de proteína para la población (Bidot, 2006 b). La décima parte aproximadamente de la leche que se consume en el mundo, proviene de la cabra, y para algunos países, es la única fuente láctea (Arbiza, 1987).

La leche de cabra es más blanca que la de vaca, a causa de no contener carotenos, que amarillean a esta última. Los carotenos son cada uno de los hidrocarburos no saturados, de origen vegetal y color rojo, anaranjado o amarillo que se encuentran en el tomate, la zanahoria, la yema de huevo, etc., y en los

animales se transforman en la vitamina A. La leche de cabra posee un olor fuerte, como consecuencia de la absorción de compuestos aromáticos durante su manejo, generalmente inadecuado, con la presencia de machos en los lugares de ordeño, mala higiene de los establos al que queda expuesta la leche, tardanza en el filtrado y enfriamiento tras el ordeño; sabor y olor que, por otro lado, se pueden eliminar en gran parte por un sencillo tratamiento de desodorización al vacío (Borras, 1968). Se diferencia también de la leche de vaca en que ésta es ligeramente ácida, mientras que la de cabra es casi alcalina (pH 6,7), debido a su mayor contenido proteico y a las diferentes combinaciones de sus fosfatos (Saini y Gilí, 1991), por lo que esta leche se utiliza en personas con problemas digestivos (Jandall, 1996). La leche de cabra es una mezcla en equilibrio de proteínas, grasas, carbohidratos, sales y otros componentes. La composición de la leche determina su calidad nutritiva y su valor como materia prima para fabricar productos alimenticios. Tiene una composición cualitativa constante, pero cuantitativamente varía en función de diferentes factores tales como raza del animal, el momento de la lactancia, número de partos, la época del año, el clima de la región. Otros autores describen a la leche como un líquido blanco y opaco de composición compleja, sabor ligeramente dulce y un pH casi neutro. Es una suspensión de materias proteicas en un suero constituido por una solución que contiene principalmente lactosa y sales minerales (Charles Alais, 1985; Ortega 2011).

#### 4.4.1. Composición de la leche de cabra.

La composición de la leche de cabra es diferente a la del ganado ovino, bovino y a la leche humana (tabla 4), pero puede variar por múltiples factores, entre ellos, tipo de alimentación, medioambiente, manejo, sistema productivo, etapa de lactancia e, inclusive, estado sanitario de los animales (Park 2006) . Sin embargo, el estudio de cada componente y el conocimiento de los valores promedio de cada uno de ellos permiten una mejor comprensión alrededor de la producción de leche caprina.

Tabla 4. Composición promedio de los nutrientes básicos de la leche de diversas especies.

Composición	cabra	Vaca	Humana
Grasa %	3.8	3.6	4
Sólidos no Grasos %	8.9	9	8.9
Lactosa %	4.1	4.7	6.9
Proteína %	3.4	3.2	1.2
Caseína %	2.4	2.6	0.4
Albumina, globulina %	0.6	0.6	0.7
N no proteico %	0.4	0.2	0.5
Cenizas %	0.8	0.7	0.3
Calorías/100ml	70	69	68

Fuente: Park 2006

#### 4.4.1.1. Lactosa y oligosacáridos:

Al igual que en la leche de las hembras bovinas y ovinas, la lactosa es el mayor carbohidrato presente en la leche de cabra, y su valor promedio se encuentra en el orden del 4.1%, menor que el valor reportado en bovinos, que puede estar por el 4.7% (Silanikove 2010). La lactosa es sintetizada a partir de glucosa en la glándula mamaria con la participación activa de la proteína  $\alpha$ -lactoalbúmina y favorece la absorción intestinal de calcio, magnesio y fósforo, y la utilización de la vitamina D. Sin embargo, la importancia de este carbohidrato radica en el mantenimiento del equilibrio osmótico entre el torrente sanguíneo y las células alveolares de la glándula mamaria durante la síntesis de la leche, razón por la cual es un componente que varía según el nivel de producción láctea y no por efecto directo del tipo de dieta suministrada. Por otro lado, los oligosacáridos de la leche caprina, al igual que la lactosa, fueron recientemente reportados al encontrar que las cantidades de oligosacáridos que están presentes en la leche de caprinos fluctúan en un rango de 250 a 300 mg/L, lo cual representa 4 ó 5 veces más que los valores encontrados en la leche de vaca, pero menos que los presentes en la leche humana.

#### 4.4.1.2. Proteína de la leche de cabra

La leche contiene cientos de tipos de proteínas, la mayoría de ellas en muy pequeñas cantidades. Estas pueden ser clasificadas de varias formas, de acuerdo con sus propiedades físicas o químicas, así como también con sus funciones

biológicas. Entre las principales proteínas presentes en la leche de los mamíferos se encuentran la  $\alpha$ 1-CN,  $\alpha$ 2-CN, B-CN,  $\beta$ -CN y las k-Caseínas, indispensables para el aprovechamiento industrial de los productos lácteos; se encuentran valores promedio de proteína en la leche de cabra de 4,5%, superiores a los valores para ganado bovino (3,3%), pero inferiores a los del ganado ovino (5,8%) . Por otra parte, las inmunoglobulinas presentes en la leche de cabra son muy similares a las observadas en la leche de vaca, y se encuentran siempre en mayores cantidades durante las fases iniciales de la lactancia, principalmente en el calostro.

#### 4.4.1.3. *Grasa de la leche de cabra*

El componente lipídico es reconocido como el más importante de la leche en términos de costo, de nutrición y de características físicas y sensoriales del producto. Dentro del componente lipídico, los triglicéridos representan cerca del 98%, pero en la leche de cabra también se encuentran algunos lípidos simples como los diacilgliceroles y los ésteres de colesterol, así como fosfolípidos y compuestos liposolubles como los esteroides y el colesterol (Park 2007). Los lípidos en la leche de cabra se encuentran de manera abundante en forma de glóbulos con un tamaño de menos de 3  $\mu$ m, lo cual permite una mayor digestibilidad y una mayor eficiencia en el metabolismo lipídico comparado con la leche de vaca (Haenlein 2004); en este sentido la grasa de la leche caprina no contiene aglutinina, que es una proteína encargada de concentrar los glóbulos grasos para generar estructuras más complejas y de mayores dimensiones, y por esta razón los glóbulos permanecen dispersos y pueden ser atacados más fácilmente por las enzimas digestivas. Adicionalmente se ha reportado que en la leche de cabra los ácidos grasos libres de cadena corta y media como el C6:0 y el C9:0 son responsables en parte del llamado “Sabor Caprino” que suele ser tan particular en la leche de los pequeños rumiantes, y en el mismo sentido algunos autores afirman que cuando la tasa de lipólisis en la leche es muy alta, en ella puede aparecer un sabor desagradable del cual el ácido butírico C4:0 es directamente responsable (Eknaes 2006).

En la actualidad existe un gran interés por aumentar la proporción de ácidos poliinsaturados y el ácido linoleico conjugado (CLA) cuyo principal isómero, el ácido ruménico (C18:2 cis9, trans11) con alrededor del 85% de los isómeros, está relacionado con efectos anti-aterogénico, anticarcinogénico, anti-inflamatorio, inmunoestimulante y de modulación de la resistencia a la insulina. El t10, c12-CLA con alrededor del 2% de los isómeros del CLA, posee propiedades beneficiosas anti-carcinogénicas y anti-obesidad (Köhler 2007). El método más extendido para aumentar el contenido de CLA en la leche consiste en añadir aceites o granos oleaginosos ricos en ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) a la ración. La cantidad y el tipo de complemento de AGPI influye en el metabolismo lipídico ruminal y en

la producción de CLA en la leche. Además, la composición lipídica de la leche de cabra es fundamental para su rendimiento en quesos, para la textura, sabor y olor de los derivados (Chilliard y Ferlay 2004; Chilliard 2003).

#### 4.4.1.4. *Ácido linoleico conjugado*

El nombre genérico CLA es un término colectivo que abarca todos los isómeros del ácido linoleico que contienen un doble enlace conjugado con el sistema (Parodi 1997). El creciente interés por aumentar las concentraciones de CLA en la leche y en otros productos de origen animal se debe principalmente a sus propiedades anti mutagénicas y anti cancerígenas, a su capacidad de generar respuesta inmune a la arteriosclerosis, y a su participación en la prevención de la obesidad y de la diabetes (Khanal y Olson 2004). Estas razones y la percepción que actualmente se tiene de la importancia de una alimentación sana y que ayude a conservar la salud hacen que la presencia de CLA en los productos lácteos genere un valor agregado que los consumidores están dispuestos a asumir (Prandin 2007).

#### 4.4.1.5. *Vitaminas y minerales*

La leche de cabra, comparada con la leche de vaca, contiene mayor cantidad de vitamina A (2.074 unidades internacionales por litro frente a 1.560), lo cual ocurre debido a que los caprinos convierten todo el caroteno en vitamina A, por lo que resulta una ausencia de caroteno en la leche y, por lo tanto, un color más blanco que el de la leche de vaca, y adicionalmente la leche de cabra es una fuente rica de riboflavina, que actúa como factor de crecimiento, y de niacina, que alcanza hasta un 350% más de niacina que la leche de vaca (Park 2006).

Tabla 5. Contenido de Vitaminas en la leche de cabra y vaca (cantidad en 100 g).

Componente	Cabra	Vaca
Vitamina A (IU)	185	126
Vitamina E (IU)	2.3	2.0
Tiamina (mg)	0.068	0.045
Riboflavina (mg)	0.21	0.16
Niacina (mg)	0.27	0.08
Ácido Pantoténico (mg)	0.31	0.32
Vitamina B6 (mg)	0.046	0.042
Ácido Fólico	1.0	5.0
Biotina (g)	1.5	2.0
Vitamina B12 (g)	0.065	0.375
Vitamina C (mg)	1.29	0.94
Park 2006		

El contenido mineral en la leche de cabra es mayor que en la leche humana; la leche de cabra contiene cerca de 134 mg de Ca y 121 mg de P por cada 100 gr de leche, y puede llegar a presentar hasta un 13% más de calcio que la leche bovina pero no es una buena fuente de otros minerales como hierro, cobalto y magnesio.

Tabla 6. Contenido de minerales de la leche de cabra y vaca (cantidad en 100 gr).

Componente	Cabra	Vaca
Ca (mg)	134	122
P (mg)	121	119
Mg (mg)	16	12
K (mg)	181	152
Na (mg)	41	58
Cl (mg)	150	100
S (mg)	28	32
Fe (mg)	0.07	0.08
Cu (mg)	0.05	0.06
Mn (mg)	0.032	0.02
Zn (mg)	0.56	0.53
I (mg)	0.022	0.021
Park 2006		

#### 4.5. Morfología macroscópica de las bacterias.

La siembra sobre medios sólidos, en superficie, da lugar a la formación de colonias, masa construida por muchos millones de bacterias que se aprecia a simple vista. El tamaño, así como el aspecto, es bastante constante para cada género y especie. Se pueden utilizar las siguientes cualidades a la hora del diagnóstico.

Tamaño. Pueden ser << puntiformes >> de alrededor de 1 mm de diámetro o menor; medianas de 1 a 2 mm de diámetro; grandes de 4 a 6 mm, muy extendidas en velo, invadiendo toda la superficie del medio de cultivo.

Forma. Se tendrán en cuenta tanto los bordes (enteros, lobulados, dentados, rizoides, etc.) Como el espesor (planas, elevadas, semiconvexas, convexas, semiesféricas, etc.).

Superficie. Puede ser lisa, rugosa, filamentosa, mucosa, seca, papilada, umbilicada, etc.

Consistencia. Puede ser dura, seca, friable, viscosa, cremosa, o mantecosa.

Transparencia y coloración. Son muy variables. Pueden ser transparentes, semitransparentes, translucidas u opacas, con una coloración blanca amarilla, roja.



Fig. 1 Morfología macroscópica de las bacterias (Pumarola y col. 1987).



#### 4.5.1. Bacterias ácido lácticas

La aplicación científica de los cultivos bacterianos iniciadores tiene aproximadamente un siglo. La industria láctea empezó con el uso de éstos y aún se mantiene a la vanguardia en la tecnología de cultivos iniciadores.

Son ampliamente distribuidas en diferentes ecosistemas, además de generarse a gran escala procesos para la producción comercial de alimentos fermentados, bebidas alcohólicas, ensilados, levaduras para la producción de cerveza, vinos, vegetales, fermentaciones cárnicas (Almanza y Barrera; 1991).

Las bacterias lácticas (BAL) son un grupo de microorganismos representadas por varios géneros con características morfológicas, fisiológicas y metabólicas en común. En general las BAL son cocos o bacilos Gram positivos, no esporulados, no móviles, anaeróbicos, microaerófilicos o aerolerantes; oxidasa catalasa y bencidina negativa, carecen de citocromos, no reducen el nitrato a nitrito y producen ácido láctico como el único o principal producto de la fermentación de carbohidratos (Carr y col., 2002; Vázquez y col., 2009). Además, las BAL son ácido tolerantes pudiendo crecer algunas a valores de pH tan bajos como 3.2, otras a valores tan altos como 9.6, y la mayoría crece a p H altos como 4 y 4.5, permitiéndoles sobrevivir naturalmente en medio donde otras bacterias no aguantaría la aumentada actividad producida por los ácidos orgánicos (carr y col., 2002).

Su nombre se deriva del hecho de que sintetizan ATP a través de fermentaciones de carbohidratos que dan ácido láctico como principal (y a veces único) producto final.

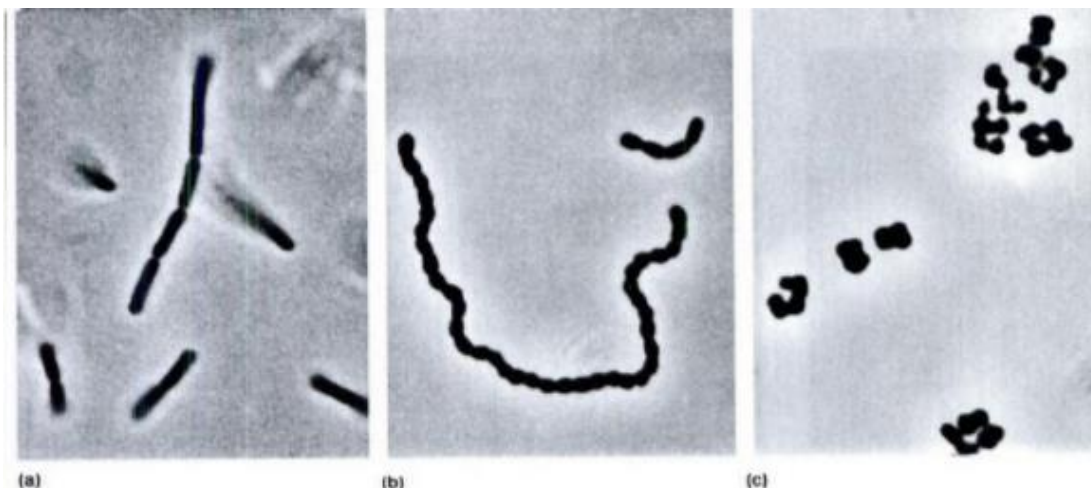


Fig. 2 Forma y disposición de las células en tres géneros de bacterias del ácido láctico: (a) *Lactobacillus*; (b) *Streptococcus*; (c) *Pediococcus*. (Stanier 1992).

#### 4.5.2. Clasificación de las bacterias ácido lácticas.

Desde el punto de vista filogenético se han definido doce géneros de bacterias lácticas y estas son: *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Vagococcus*, *Enterococcus*, *Aerococcus*, *Tetragenococcus*, *Carnobacterium*, *Alloicoccus* y *Weissella*. (Morais; 2004).

Los diversos géneros de las BAL, se han definido sobre la morfología celular, ADN y tipo de fermentación. La relación filogenética se basa en la comparación de secuencias de ARNr 16S, con un % molar guanina-citosina bajo en el ADN, mostrando a *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Vagococcus*, *Aerococcus*, *Tetragenococcus* y el recientemente descrito *Lactosphaera* como los géneros más cercanos, *Lactococcus* y *Streptococcus* relativamente cercanos, mientras que *Lactobacillus* es más diverso y los géneros no relacionados *Propionibacterium* y *Bifidobacterium* (Holzapfel y col. 2001; Giraffa y col. 2010).



Fig. 3 Árbol filogenético de los géneros ácido lácticas, basado en la secuencia del gen del ARNr 16 S. (Hammes y Hertel; 2006).

Hacia 1920, S. Orla Jensen señaló que las bacterias del ácido láctico podían dividirse en dos subgrupos bioquímicos, que se distinguen por los productos formados a partir de glucosa, las *homofermentadores* convierten la glucosa, de modo casi cuantitativo, en ácido láctico; los heterofermentadores la convierten en una mezcla equimolecular de ácido láctico, etanol y CO<sub>2</sub>.



Fig. 4 Ruta de EMP por la que las bacterias homofermentadoras del ácido láctico convierten la glucosa en ácido láctico (Stanier 1992).

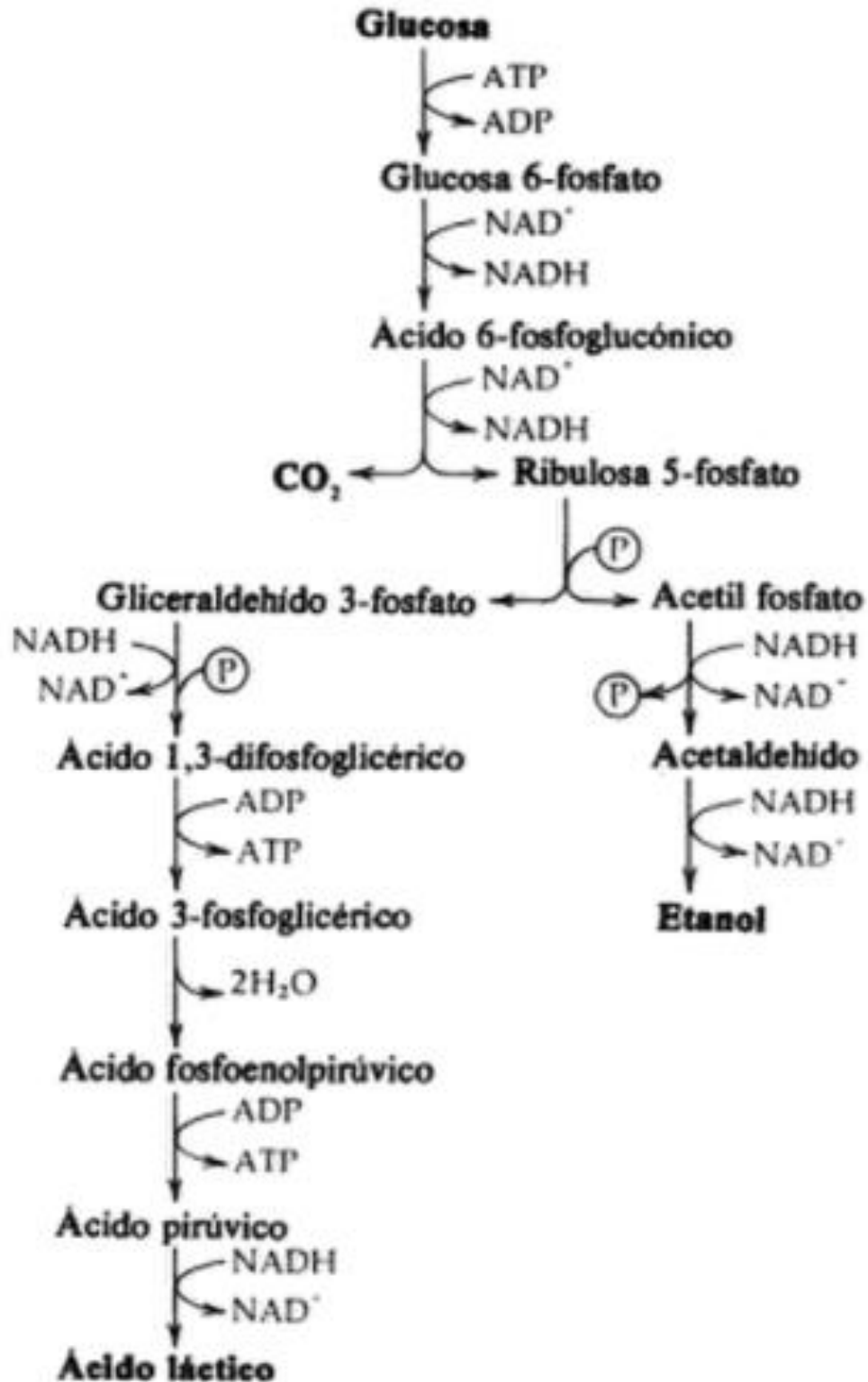


Fig. 5. Ruta del catabolismo de la glucosa por las bacterias heterofermentadoras del ácido láctico, (Stanier 1992).

- Clasificación de las bacterias ácido lácticas según Orla Jensen

#### 4.5.2.1. Grupo homofermentativo

Estas bacterias poseen las enzimas aldolasa y hexosa-isomerasa, pero carecen de la fosfoacetolasa. Usan la ruta de Embden-Meyerhoff-Parnas (EMP) para la producción de dos moléculas de ácido láctico por cada molécula de glucosa consumida. Sólo forman pequeñas cantidades de otros metabolitos diferentes del ácido láctico el cual representa del 90 al 97% de la lactosa fermentada. Dentro de este grupo se tiene:

##### - **Thermobacterium (Lactobacillus)**

Bacillos alargados, aislados o en cadenas cortas.

Termófilos (temperatura óptima entre 40 a 48°C).

Acidificantes muy enérgicos, hasta el 2.7% de ácido inactivo o levógiro.

Actividad caseolítica notable.

##### - **Streptobacterium**

Formas esféricas en cadena.

Acidificación muy lenta, pero marcada (mayor de 1%), ácido inactivo o dextrógiro

Actividad caseolítica.

##### -**Streptococcus**

Forma esférica en cadena

Acidificación rápida (menor de 1%)

Poca actividad caseolítica.

#### 4.5.2.2. Grupo heterofermentativo

Este grupo de bacterias contiene la enzima fosfoacetolasa, pero carece de la aldolasa y hexosa isomerasas; así que, en lugar de seguir la vía EMP para la degradación de la glucosa, utilizan las vías de hexosa monofosfato o la de las pentosa. La producción de ácido es más débil; además del ácido láctico se forman otros ácidos, sustancias diversas y CO<sub>2</sub>.

##### Bifidobacterium

Bastones que se ahorquillan en los cultivos viejos.

Produce ácido acético en proporción elevada y ácido láctico dextrógiro.

Son anaerobios.

##### Betabacterium

Tienen forma de bastón.

Producen poco ácido (0.5% máximo) en forma de una mezcla de ácidos, láctico, acético, succínico, etc.

No actúan sobre la caseína, ácido láctico inactivo.

Betacoccus

Formas esféricas semejantes a los estreptococos, pero el ácido láctico producido es levógiro.

Proceden de los vegetales en descomposición, remolachas, etc.

Fermentan las pentosas y descomponen las pectinas.

Fermentaciones viscosas con la sacarosa y producción de mucílago.

#### 4.5.3. Agar MRS

El Agar M.R.S fue desarrollado por Man, Rogosa y Sharpe, y por su formulación permite el adecuado desarrollo de lactobacilos y otras bacterias ácido lácticas.

La proteasa peptona, el extracto de carne, el extracto de levadura y la glucosa constituyen la fuente nutritiva ya que aportan nitrógeno, carbono, vitaminas y minerales.

El monoleato de sorbitán, las sales de sodio, magnesio y manganeso proveen cofactores para el crecimiento bacteriano y pueden inhibir el desarrollo de algunos microorganismos.

El citrato de amonio actúa como agente inhibitorio del crecimiento de bacterias Gram (-). El agar es el agente solidificante.

#### 4.6. Probióticos

Los probióticos son microorganismos vivos que al ser ingeridos en cantidades adecuadas ejercen una influencia positiva en la salud o en la fisiología del hospedero (Sherezenmeir y Vrese 2001). La forma más frecuente de consumir probióticos es a través de alimentos lácteos que contienen especies intestinales de lactobacilos y bifidobacterias; por los efectos benéficos adicionales a los nutritivos, estos alimentos se consideran en el grupo de los alimentos funcionales (Palou y Serra 2000).

Una vez que los probióticos son ingeridos ocurren cambios en la microflora intestinal que repercuten positivamente en el estado de salud del consumidor. Es importante resaltar que la flora intestinal es una comunidad interactiva de organismos con funciones específicas para mantener el estado de salud. Esta función es la suma resultante de las diferentes actividades combinadas de los organismos que la conforman como lo son la fermentación de sustratos de la dieta no digeribles y del moco producido por el epitelio con la producción de ácidos grasos de cadena corta (acetato, propionato y butirato) favoreciendo la recuperación y la absorción de calcio, hierro y magnesio, en la regulación del metabolismo de la glucosa reduciendo la glicemia postprandial, así como, la síntesis de la vitamina K y de las del grupo B (Guarner 200). Algunos beneficios incluyen mejoría en las enfermedades infecciosas, enfermedades crónicas intestinales como colitis ulcerosa, inmunomodulación, biodisponibilidad de nutrientes, enfermedades cardiovasculares, diabetes mellitus no insulino dependiente, obesidad, osteoporosis y cáncer (Marteau y col. 2001, Sanders 2000; Saavedra 2001).

Entre las bacterias probióticas más utilizadas para el consumo humano se encuentran las llamadas bacterias ácido lácticas (BAL), que incluyen a las siguientes: *Lactobacillus acidophilus*, *L. plantarum*, *L. casei*, *L. casei* spp *rhamnosus*, *L. delbrueckii* spp *bulgaricus*, *L. fermentum*, *L. reuteri*, *Lactococcus lactis* spp *lactis*, *Lactococcus lactis* spp. *cremoris*, *Bifidobacterium bifidum*, *B. infantis*, *B. adolescentis*, *B. longum*, *B. breve*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, entre otros (Farnworth 2001).

#### 4.6.1. Probióticos y sus efectos.

Tabla 7. Algunos probióticos y sus efectos.

Espece	Efectos Reportados	Otra información
<b><i>Lactobacillus</i></b>		
<i>L. acidophilus</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Estimulación del sistema inmonológico.</li> <li>-Balance de la flora intestinal.</li> <li>-Reducción de enzimas fecales</li> <li>-Antitumoral</li> <li>-Prevención de la “diarrea del viajero” (Cuando se mezcla con <i>B. bifidum</i>).</li> <li>-Prevencion de otro tipo de diarrea.</li> <li>-reducción del colesterol serológico.</li> <li>-Coadyuvante de vacunas.</li> <li>-Prevención de constipación.</li> <li>-Prevención de la iniciación del cáncer.</li> <li>-Prevención del cáncel de colon.</li> <li>-Prevención de daño del hígado inducido por alcohol.</li> <li>-Control de la inflamación intestinal y las reacciones de hipersensibilidad de infantes con alergias a alimentos.</li> </ul>	<p>Actualmente usados en productos probióticos (Nestle, Suiza, por ejemplo). Los efectos pueden variar dependiendo en la especie.</p>
<i>L. acidophilus</i> mezclado con <i>Bifidobacterium</i> spp.	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Mejoramiento de la inmunidad contra infecciones intestinales.</li> <li>-Prevención de enfermedades diarreicas.</li> <li>-Prevención de cáncer de colon.</li> <li>-Prevención de hipercolesterolemia.</li> <li>-Mejoramiento de la utilización de la lactosa.</li> <li>-Prevención de enfermedades del tracto gastrointestinal superior.</li> <li>-Estabilización de la mucosa gastrointestinal.</li> </ul>	<p>El potencial terapéutico de estas bacterias en productos lácteos fermentados depende de su capacidad para sobrevivir durante su elaboración y almacenamiento.</p>

<i>L. brevis</i>	Balance de la flora intestinal	Actualmente usados en productos probióticos.
<i>L. casei subespecie rhamnosus</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Estimulación del sistema inmunológico.</li> <li>-Balance de la flora intestinal.</li> <li>-Reducción de enzimas fecales.</li> <li>-Antitumoral.</li> <li>-Prevención de la diarrea del rotavirus.</li> <li>-Prevención y tratamiento de otras diarreas.</li> <li>-Fortalecimiento de las defensas naturales.</li> <li>-Prevención de caries dental.</li> <li>- Prevención de la enfermedad de Crohn.</li> </ul>	Actualmente usado en productos probióticos (Danone, por ejemplo). Algunos autores se refieren a este microorganismo como <i>L. casei</i> o <i>L. rhamnosus</i> .
<i>L. Delbreuckii subespecie bulgaricus</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Estimulación del sistema inmunológico.</li> <li>-Reducción de enzimas fecales.</li> <li>-Antitumoral.</li> <li>-prevención de la “diarrea del viajero”.</li> </ul>	Actualmente usados en productos probióticos (Meiji Milk Products, Japon).
<i>L. fermentum</i>	Balance de la flora intestinal	Actualmente usado en productos probióticos.
<i>L. gasseri</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Reducción de las enzimas fecales.</li> <li>-Antitumoral.</li> <li>-Reducción de colesterol.</li> </ul>	Subespecie ADH
<i>L. helveticus</i>	Balance de la flora intestinal	Actualmente usado en productos probióticos.
<i>L. johnsonii</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Balance de la flora intestinal.</li> <li>-Mejoramiento de sistema inmunológico.</li> <li>-Tratamiento de la gastritis.</li> <li>- Mejora la patogenicidad contra <i>E. Coli</i>.</li> </ul>	Actualmente usado en productos probióticos (Nestle, Suiza, por ejemplo).
<i>L. plantarum</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Estimulación del sistema inmune.</li> <li>Antitumoral.</li> </ul>	Actualmente usado en productos probióticos.



<i>L. reuteri</i>	Reducción de colesterol.	Actualmente usado en productos probióticos (BioGaia, Estados Unidos).
<i>L. Salivarius</i>	-Reducción del colesterol (al mezclarse con <i>E. Faecium</i> o con <i>L. acidophilus</i> ). - Reducción del colesterol (al mezclarse con <i>L. bulggaricus</i> y fructo-oligosacáridos). Balance de la flora intestinal.	Hasta 1998, las solicitudes que clamaban su funcionalidad solamente eran consideradas potenciales.
<b>Bifidobacterium</b>		
<i>B. bifidum</i>	-Balance de la flora intestinal. -Antitumoral. -Prevención de la diarrea del rotavirus. -Prevención de otras diarreas.	Actualmente usado en productos probióticos.
<i>B. longum</i>	-Antitumoral -Mejora la resistencia a las infecciones. Estimula la inmunidad.	Actualmente usado en productos probióticos.
<i>B. infantis</i>	Antitumoral	Actualmente usado en productos probióticos.
<i>B. Breve</i>	-Incremento de los niveles del anticuerpo anti – <i>B. breve</i> . -Incremento de la producción de cytokines IFN- $\gamma$ (inducción viral)	Actualmente usado en productos probióticos.
<i>B. adolescentis</i>	Antitumoral	Actualmente usado en productos probióticos.
<b>Otras Especies</b>		
<i>Streptococcus Salivarius subespecie Thermophilus</i>	Prevención de la “diarrea del viajero”	Algunos autores se refieren a este microorganismo como <i>S. Thermophilus</i> .
<i>Lactococcus lactis subespecie lactis</i>	Balance de la flora intestinal	Actualmente usado en productos probióticos.
<i>Lactococcus lactis subespecie</i>	Balance de la flora intestinal	Actualmente usado en

<i>cremoris.</i>		productos probióticos.
<i>Enterococcus faecium</i>	Balance de la flora intestinal	Actualmente usado en productos probióticos.
<i>Leuconostoc mesenteroides subespecie dextranum</i>	Balance de la flora intestinal	Actualmente usado en productos probióticos.
<i>Propionibacterium freudenreichii</i>	Balance de la flora intestinal	Actualmente usado en productos probióticos.
<i>Pediococcus acidilactici</i>	Balance de la flora intestinal	Actualmente usado en productos probióticos.
<i>Saccharomyces boulardii</i>	Balance de la flora intestinal	Actualmente usado en productos probióticos.
<i>Saccharomyces bulgaricus</i>	-Prevención de la "diarrea del viajero" -Prevención de la diarrea causada por <i>C. difficile</i>	

(Según: Ziemmer y Gibson 1998, Chandan 1999, Gill 1998, Goldin 1998, Kailaspathy y Chin 2000, Sanders 1999; Vaughan 1999).

#### 4.7. Prebióticos y simbióticos.

##### 4.7.1. Prebióticos

Algunos componentes presentes de la fibra son denominados prebióticos, definidos como ingredientes alimenticios no digeribles de los alimentos que afectan de manera positiva al huésped, estimulando de forma selectiva el crecimiento y/o la actividad metabólica de un número limitado de cepas de bacterias colónicas. Estos compuestos se caracterizan por ser moléculas de gran tamaño que no pueden ser digeridas por las enzimas digestivas del tracto gastrointestinal alto, alcanzando el intestino grueso donde son degradados por la microflora bacteriana, principalmente por las *Bifidobacterias* y *Lactobacilos*,

generando de esta forma una biomasa bacteriana saludable y un pH óptimo (Ashwell 2005; Roberfroid 2005).

Para que un ingrediente alimenticio sea considerado prebiótico debe cumplir con los siguientes criterios:

- No debe ser hidrolizado o absorbido en la parte alta del tracto digestivo;
- Debe ser fermentado selectivamente por una o un número limitado de bacterias potencialmente benéficas del colon, por ejemplo bifidobacterias y lactobacilos;
- Debe ser capaz de alterar la microflora colónica tornándola saludable, por ejemplo reduciendo el número de organismos putrefactivos e incrementado las especies sacarolíticas (Koliuda y col. 2002).

En la actualidad los oligosacáridos más estudiados y reconocidos con actividad prebiótica son los fructanos. Este es un término genérico empleado para describir a todos los oligo o polisacáridos de origen vegetal, y se refiere a cualquier carbohidrato el cual una o más uniones fructosil-fructosa predominan dentro de las uniones glucosídicas. La cantidad de fructanos presente en la dieta varía dependiendo de las costumbres alimentarias de la población y de la disponibilidad de alimentos que los contengan. Las fuentes más importantes de fructanos en la dieta son los derivados del trigo, cebollas, ajo, bananas y puerro (Van Loo y Col. 2002).

A continuación se hará una breve mención y descripción de los distintos tipos, funciones, propiedades nutricionales y principales aplicaciones en la industria alimentaria de las fibras prebióticas.

#### 4.7.1.1. *Inulina*

Es un fructano polidisperso que consiste en una mezcla de oligómeros y polímeros mayores formados por uniones  $\beta$ -(2-1) fructosil-fructosa. El grado de polimerización (GP) proveniente de la achicoria oscila entre 3 y 60, con un valor promedio de aproximadamente 10. Esta se encuentra en una gran variedad de plantas, pero principalmente en la raíz de la achicoria, puerro, ajo, banana, cebada, trigo, miel, cebolla, espárrago y alcaucil. También se localiza en las partes aéreas de las gramíneas (cereales, pastos) de las cuales es más difícil extraerla, ya que se encuentra asociada a carbohidratos complejos e insolubles (celulosa, hemicelulosa) y polifenoles (Roberfroid 2005; Van Loo y Col. 1995).

La inulina puede ser sintetizada a partir de la raíz de la achicoria y desde la sacarosa a través de la acción de la  $\beta$ -fructo-furanosidasa (origen: *Aspergillus Níger*) (Roberfroid 2005; Rao 1999).

La inulina posee un sabor neutral suave, es moderadamente soluble en agua y otorga cuerpo y palatividad. Tiene diversas aplicaciones en la industria de alimentos, puede ser utilizada como sustituta del azúcar, reemplazante de las grasas, agente texturizante y/o estabilizador de espuma y emulsiones.

Por este motivo son incorporados a los productos lácteos, fermentados, jaleas, postres aireados, mousses, helados y productos de panadería (Coussement 1995).

La dosis máxima permitida para adicionar un alimento formulado con inulina es para *dosis simple* hasta 10 g/día y en *dosis múltiples* hasta 20 g/día. En dosis mayores a las permitidas puede provocar intolerancias luego de su consumo, como efectos osmóticos (diarrea), ruidos intestinales y flatulencia como consecuencia del proceso de fermentación (Davy y Melby 2003).

#### 4.7.1.2. *Oligofructosa*

Se obtiene mediante la hidrólisis enzimática parcial de la inulina, está compuesta por cadenas lineares de glucosil-fructosil. El GP oscila entre 2 y 8, con un valor promedio de aproximadamente 4. Se encuentra presente en alimentos como cereales, cebolla, ajo, banana y choclo (Van Loo y Col. 1995; Coussement 1995). Esta sustancia es mucho más soluble que la inulina y moderadamente dulce, aproximadamente del dulzor del azúcar. En combinación con edulcorantes intensos genera un paladar más acabado y un gusto frutal más duradero con menor sabor residual.

En la industria se la puede utilizar en yogures con fruta, leches fermentadas, quesos frescos, helados y bebidas lácteas con un posicionamiento de alimentos reducidos en calorías. También mejora la textura y la palatividad del producto final, muestra propiedades humectantes, reduce la actividad acuosa y cambia los puntos de ebullición y congelamiento (Montani 2005).

#### 4.7.1.3. *Polidextrosa*

Posee características de fibra dietaria, es un polímero sintético de glucosa con terminales de sorbitol y ácido cítrico. Es un buen humectante, efectivo para controlar la humedad de los productos.

Puede ser utilizado en grandes cantidades sin influir en el sabor del producto final, dado que posee un sabor neutro. Puede ser utilizada como fuente de fibra o como prebiótico con efectos benéficos para la flora intestinal (Rao 1999; Jie y Col. 2000). La polidextrosa es conocida por ser un excelente agente de cuerpo, siendo un sustituto del azúcar y grasas. Su capacidad de retener agua propicia una textura similar a la de la harina, cuando es comparada con otras fibras. Posee un sabor neutro y una agradable palatividad. En aplicaciones como galletas controla la formación de gluten, por absorber agua preferentemente. Esto reduce la necesidad del agregado de grasas por lo cual es ideal para la elaboración de amasados (Danisco 2006).

#### 4.7.1.4. Galactooligosácaridos

Pertencen a la serie rafinosa y están formados por moléculas de galactosa. Los más frecuentes en el mundo vegetal son la rafinosa, estaquiosa y verbascosa de 3 a 5 galactosas respectivamente. Se encuentran presentes principalmente en las legumbres (Rao 1999).

#### 4.7.1.5. Sustancias pécticas

Engloban un grupo de sustancias asociadas a la hemicelulosa. Son macromoléculas coloidales capaces de absorber gran cantidad de agua y se encuentran formadas esencialmente por ácido D-galacturónico unidos por enlaces a (1-4). La industria alimentaria utiliza estas sustancias como espesantes, ya que incorporan en su estructura agua otorgando a la preparación una consistencia homogénea que posibilita la sustitución de grasas en lácteos, crema de leche, yogures, etc. (Danisco 2006).

#### 4.7.2. Simbióticos

Los simbióticos constituyen un grupo diferente a los probióticos. Los simbióticos se definen como *“una mezcla de probióticos y prebióticos destinada a aumentar la supervivencia de las bacterias que promueven la salud, con el fin de modificar la flora intestinal y su metabolismo”* y el término debe reservarse *exclusivamente para los productos que poseen verificación científica de la simbiosis*, es decir en los cuales los prebióticos favorecen selectivamente a los probióticos adicionados en éste simbiótico en particular. (Ashwell 2005).

### 4.8. Bacteriocinas

Algunas cepas BAL producen compuestos de naturaleza proteica con actividades antimicrobianas denominadas bacteriocinas. Las bacteriocinas son péptidos antimicrobianos heterogéneos, con diferentes niveles y espectros de actividad, mecanismos de acción, peso molecular y propiedades fisicoquímicas (Stoyanova y col. 2012; citado por Beristain y col. 2012).

Las bacteriocinas son péptidos codificados genéticamente y sintetizados a nivel ribosomal, a diferencia de los antibióticos que son sintetizados mediante condensación enzimática. (Cleveland 2001 citado por Alvarado 2007). Éstas pueden ser sintetizadas por bacterias Gram (+) y Gram (-) (Jeevaratnam 2005, citado por Beristain 2012); sin embargo las producidas por las BAL ha sido de gran interés por la industria alimentaria debido a las siguientes razones: se

encuentra fácilmente en BAL comerciales (lactococos, lactobacilos, pediococos), son consideradas seguras para el consumo, no son tóxicas para las células eucariotas y presentan un espectro de inhibición más amplio en comparación con los espectros de las bacteriocinas sintetizadas por bacterias Gram (-) (Nes 2007 citado por Beristain 2012). Normalmente actúan contra microorganismos no deseados, estrechamente relacionados o responsables del deterioro de alimentos y causantes de enfermedades. Por esta razón, se utilizan en varias aplicaciones, como la biopreservación, la extensión de la vida útil, la acción antimicrobiana clínica y para el control de fermentaciones (Marcos y col. 2013).

Las bacteriocinas de bacterias Gram (+) son péptidos catiónicos a pH neutro o ligeramente ácido, son pequeñas (3-7 kDa), de entre 30 a 60 aminoácidos, estables al calor y contiene a lo largo de la cadena de aminoácidos tanto porciones hidrofóbicas como regiones anfipáticas (con una cara hidrofílica y otra hidrofóbica). Sus puntos isoeléctricos son altos (8.3-11) lo que les permite interactuar con la superficie aniónica de las membranas celulares (Cintas 2001, Cleveland 2001; citado pos Alvarado 2007).

#### 4.8.1 Clasificación de Bacteriocinas

Anteriormente las bacteriocinas producto de las BAL fueron clasificadas en cuatro clases principales de acuerdo a su estructura, propiedades fisicoquímicas y propiedades moleculares (Chen y Hoover 2003). Sin embargo, en la actualidad se ha reducido esa clasificación a tres grupos (Savadogo 2006; De Vuyst y Leroy 2007; Beshkova y Frengova 2012), ya que la cuarta clasificación no ha sido totalmente justificada.

##### 4.8.1.1. Clase I.- Lantibióticos:

Son péptido pequeños (<5 kDa), termoestables y con aminoácidos modificados de los que los más comunes son la deshiroalanina (DHA) y la deshidrobutirina (DHB), originados por deshidratación postraduccional de la serina y tronina, respectivamente (Hernández y col 2002). Otros aminoácidos son lantionina, b-metil-lantionina. La formación de aminoácidos no comunes se explica por la deshidratación de los aminoácidos serina y treonina, con la posterior adición de los átomos de azufre de la cisteína a los dobles enlaces de los deshidroaminoácidos. Un ejemplo bien conocido de estas bacteriocinas es la nisina.

Se dividen en:

- Lantibióticos Tipo A: Son péptidos formadores de poros, catiónicos y elongados que en algunos casos, como el de la lacticina 3147, constan de dos componentes.
- Lactibióticos Tipo B: Son péptidos globulares inmunológicamente activos que actúan como inhibidores enzimáticos.

#### 4.8.1.2. Clase II:

Son péptidos (<10 kDa), termoestables y sin aminoácidos modificados en su estructura primaria (Hernández y col. 2002). Incluye a la pediocina PA-1, lactococinas A, B y M leucocina A, sakacinas A y P, entre otras (Carrera 2015). Estas a su vez pueden clasificarse en cuatro subclases:

- Subclase IIa: Péptidos con actividad antilisterial. Muestran una homología en la secuencia de aminoácidos más pronunciada en la parte N- terminal de los péptidos, se caracteriza por ser particularmente activas frente a los microorganismos del género *Listeria*. Esta subclase también se le conoce como “familia Pediocina”, en alusión a la bacteriocina más estudiada de este grupo, la pediocina PA-1, otras de las bacteriocinas más representativas de esta subclase es Sakacinas Ay P, leucocina A y curvacina A. (Hernández y col 2002; Alvarado 2007).

-Subclase IIb: Contiene bacteriocinas cuyas actividades depende de la acción complementaria de dos péptidos, como la lactococina G y M y la lactacina F.

-Subclase IIc: Contiene bacteriocinas de la Clase II que se transportan utilizando un sistema sec-dependientes, a pesar de que algunas, como la enterocina P, muestran ciertas características propias de las bacteriocinas de la subclase IIa. Formado por péptidos con el grupo tiol activado y que requieren para su acción que los residuos de cisteína se encuentran reducidos. La bacteriocina característica de este subgrupo es la lactococina B.

-Subclase IId: engloba a la bacteriocinas de clase II que, como sucede con la lactococina A, no se puede clasificar en ninguno de los grupos anteriores.

#### 4.8.1.3. Clase III:

Proteínas de más de 30 kDa, termolábiles y sin aminoácidos modificados en su estructura primaria. Estas bacteriocinas son las que poseen un menor interés industrial en la actualidad. Incluyen las helveticinas J y V-1829, la acidofilucina A y las lactaninas A y B (Hernández y col 2002; Carrera 2015).

#### 4.8.2. Modo de acción

La mayoría de las bacteriocinas actúan sobre la membrana de células sensibles, desestabilizando y permeabilizando mediante la formación de canales o poros iónicos (Grande 2005), que van a dar salida a compuestos como fosfato, potasio, aminoácidos, ATP, disminuyendo la síntesis de macromoléculas y por consecuencia la muerte celular (González-Martínez 2003).

El modo de acción de las bacteriocinas es complejo. En la clase I, la Nisina, y en la clase II, la Pediocina, son las bacteriocinas más estudiadas y comparten algunas características en común. Básicamente actúan destruyendo la integridad de la membrana citoplasmática a través de la formación de poros, lo que provoca la salida de compuestos pequeños o altera la fuerza motriz de protones necesaria para la producción de energía y síntesis de proteínas o ácido nucleicos (Montville y Chen, 1998; Chikindas, y col., 1993; Sablón y col., 2000). Las bacterias Gram (+) se caracterizan por poseer un alto contenido en lípidos aniónicos en su membrana. El modo de acción propuesto para las bacteriocinas es una unión inicial a la membrana bacteriana por atracción electrostática entre los lípidos cargados negativamente y las bacteriocinas con su carga neta positiva localizada fundamentalmente en uno de sus extremos (extremo C-terminal de la Nisina, extremo N-terminal de la Pediocina). Luego se produce la inserción de las bacteriocinas en la bicapa lipídica, en el caso de la Nisina esta inserción se realiza por su extremo N-terminal (Moll y col., 1999) y en el caso de la Pediocina, a través de su  $\alpha$ -hélice transmembranal del extremo C-terminal (Ennahar y col., 2000). Así se forman poros en la membrana bacteriana quedando permeabilizada y la célula empieza a perder iones y metabolitos fundamentales para su supervivencia y eventualmente se produce la muerte bacteriana (Figura 6)

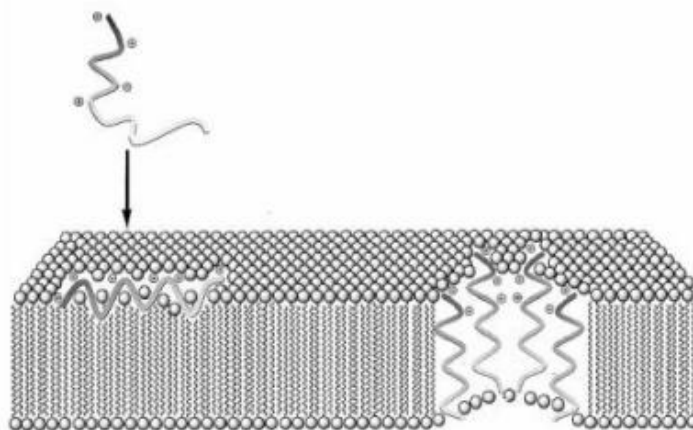


Fig.6 Mecanismo de acción de las bacteriocinas por formación de poros en la membrana bacteriana (Moll y col., 1999).



Con lo anterior se observa que las bacteriocinas comparten mecanismos de acción semejantes (Montville y col., 2001) caracterizados por la formación de poros y la disipación de la fuerza motriz de protones esencial para la síntesis de ATP, sin embargo existen algunas particularidades en el modo de acción de cada clase (Figura 7)

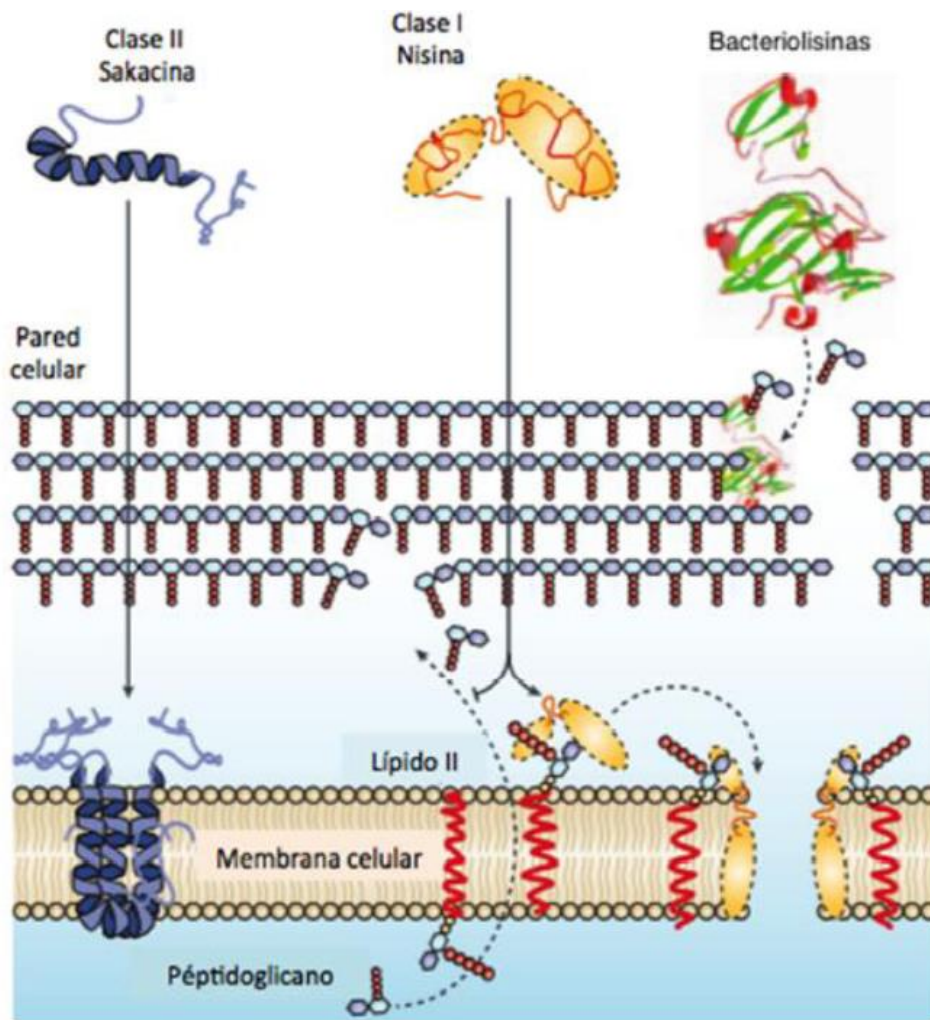


Fig. 7 Modo de acción de diversas bacteriocinas (Cotter y col., 2005).

De la clase I, la Nisina no requiere de un receptor unido a la membrana de la célula blanco ya que reconoce la composición fosfolipídica de la célula (Abee y col., 1995), caso contrario a la acción de la Lactococina A y la Lactoestrepcina donde se requiere de la unión a receptores membranales (Kok y col., 1993). La mayoría de las bacteriocinas de la clase II afectan la fuerza motriz de protones (FMP) de las células blanco (suseptibles) a través de la formación de poros. La actividad de las bacteriocinas de la clase IIa probablemente depende de una manosa permeasa del sistema fosfotransferasa como blanco específico. Para las

bacteriocinas de la clase IIa se ha sugerido que la región consenso amino-terminal tiene un papel importante en la capacidad de reconocimiento de la membrana de la célula blanco (Bruno y Montville 1993; Eijsink y col., 1998). Un ejemplo es la formación de poros por la Piscicocina CS526 causando una rápida liberación de moléculas pequeñas como  $K^+$  de la célula indicadora y la disipación de la fuerza motriz de protones (FMP), provocando la muerte celular (Suzuki y col., 2005). La subclase IIb de las bacteriocinas de dos componentes también inducen la disipación de la FMP pero por la formación de poros xlv específicos catiónicos o aniónicos, sin embargo los blancos específicos no están bien identificados. Ejemplo de esta clase IIb, las Plantaricinas EF y JK dependen de la acción de dos péptidos a y b para la formación de poros y la consecutiva disipación del potencial de membrana (Moll y col., 1999). La subclase IIc que comprende péptidos diversos como la Acidocina B (Leer y col., 1995) y la Carnobacteriocina (Worobo y col., 1994) presentan varios modos de acción como la permeabilización de la membrana, inhibición específica de la formación del septo y actividad de feromona. En la clase III, que son bacteriocinas de alto peso molecular, el mecanismo de acción se desconoce y requiere ser más ampliamente estudiado. En años recientes se han descubierto un cierto número de bacteriocinas que tienen una estructura cíclica cabeza-cola, como la Enterocina AS-48 producida por *Enterococcus faecalis*, la Gassericina A de *Lactobacillus gasseri* LA39, la Circularina A de *Clostridium beijerinckii* (Mulvenna y col., 2006). Estas bacteriocinas tienen una longitud de 50 a 70 aminoácidos y se encuentran entre las proteínas más grandes con estructura cíclicas sintetizadas ribosomalmente descubiertas hasta ahora. El blanco celular de la AS-48 es la membrana citoplasmática donde forma canales, causando la interrupción gradual de todas las rutas biosintéticas (proteínas, ADN, ARN), así como la captación de precursores, el consumo de oxígeno y el crecimiento celular. Igualmente altera los niveles intracelulares de  $Na^+$  y  $K^+$  y genera el colapso del potencial de membrana (Gálvez y col., 1990; Gálvez y col., 1991).

#### 4.8.3. Bacteriocinas representativas

##### 4.8.3.1. Nisina

La Nisina, descrita en 1928, fue la primer bacteriocina aislada a partir de la bacteria ácido láctica *Lactococcus lactis* subsp *lactis*. Es la bacteriocina mejor caracterizada y es utilizada como conservador de alimentos (Delves-Broughton 1990; Delves 1996); es la única reconocida por la FDA con la categoría GRAS (Generally Recognized As Safe). Se produce de forma natural en algunos productos lácteos y se utiliza en la producción de alimentos como un aditivo en productos lácteos para prevenir la descomposición ocasionada por bacterias Gram

positivas, especialmente de los géneros *Clostridium*, *Staphylococcus*, *Bacillus* y *Listeria*.

Es un péptido de 34 aminoácidos, de bajo peso molecular menor a 5 kDa. La síntesis de la nisina es compleja, requiere de procesos de transcripción, traducción, modificaciones post-traduccionales, secreción, procesamiento, y señales de transducción (Motville y Chen 1998; Engelke y col. 1992). Existen dos variantes de esta bacteriocina, la nisina A y la nisina Z, que difieren solamente en el aminoácido de la posición 27, la histidina en la nisina A cambia por asparagina en la nisina Z.

En la síntesis de la nisina participan un grupo de genes ordenados como *nisABTCIP*, *nisRK*, y *nisFEG* que regulan la expresión del gen estructural *nisA*. El precursor inactivo NisA es modificado químicamente por los productos de *nisB* y *nisC* que deshidratan a los residuos de treonina y serina y originan la formación de los enlaces tioeter característicos de los lantibióticos. Una vez modificado el precursor, este es transportado, procesado y secretado; Para proteger a la célula productora, existen las proteínas NisI y NisFEG que le confieren inmunidad (Li y Sullivan 2002; Abee y col. 1994).

#### 4.8.3.2. *Pediocina*

Es una bacteriocina producida por *Pediococcus acidilactici* y es utilizada como conservador en productos vegetales y cárnicos y se ha observado una elevada actividad contra especies de *Listeria* (Yousef y col. 1991).

La pediocina es sintetizada como un pre-péptido de 62 aminoácidos que al ser procesado resulta en un péptido maduro de 44 residuos, anfifílico, con carga positiva y regiones altamente hidrofóbicas y con 2 enlaces disulfuro (Motville y Chen 1998). La estructura terciaria de la pediocina PA-1 ya ha sido determinada, en el extremo N-terminal contiene 3 láminas  $\beta$  que originan una conformación de horquilla, en cambio en el extremo C-terminal se presenta un alto grado de libertad conformacional a excepción de un enlace disulfuro entre los aminoácidos 24 y 44, que es esencial para su actividad. Para la síntesis de la pediocina se ha descrito la participación de un grupo de genes. El gen *pedA* es el gen estructural, el gen *pedB* se requiere para la inmunidad y los genes *pedC* y *pedD* participan en la secreción del péptido maduro (Venema y col. 1995). Dada su alta actividad contra especies de *Listeria* esta bacteriocina tiene un alto potencial para ser utilizado como conservador en alimentos lácteos.

#### 4.8.3.3. *Plantaricinas E/F y J/K*

Son bacteriocinas del grupo IIb producidas por *Lactobacillus plantarum* que tienen actividad antimicrobiana cuando interactúan como un sistema de 2 péptidos (Anderssen y col. 1995). La síntesis de la plantaricina es sumamente compleja, está regulada por la acción de 5 operones con 21 genes diferentes. Los péptidos activos para la formación de poros en la membrana citoplasmática de las células blanco son PlnE y PlnF que conforman la plantaricina E/F y los péptidos PlnJ y PlnK constituyen la plantaricina J/K. Se ha encontrado que esos 4 péptidos

cationicos poseen de 25 a 34 aminoácidos y tienen actividad bactericida de manera independiente, la cual se potencia cuando se interactúan en pares formando los complejos de poración E/F y J/K. Los poros formados presentan diferente selectividad iónica, ya que la plantaricina E/F permite el paso de cationes monovalentes en contraste con la plantaricina J/K que es selectiva para compuestos aniónicos (Moll y col. 1999). Esta actividad complementaria combinada de E/F y J/K garantizan una eficiente actividad bactericida.

#### 4.8.3.4. *Divergicina A*.

Es una bacteriocina producida por *Caernobacterium divergens* LV13 que se caracteriza por poseer un sistema de secreción que involucra la presencia de un péptido señal (Worobo y col. 1995). El gen estructural *dvnA* codifica para un prepéptido de 75 aminoácidos que tiene una región N-terminal de 29 aminoácidos y un péptido maduro de 46 aminoácidos. Con un peso molecular de 4.6 kDa, la divergicina A es un péptido pequeño, de naturaleza hidrofóbica y termoestable. A diferencia de las bacteriocinas de la clase II que tienen un sitio de rompimiento característico Gli-Gli, esta bacteriocina posee en su extremo N-terminal un sitio de rompimiento Ala-Ser-Ala y actúa como péptido señal para el uso del sistema de secreción de la célula. Cabe destacar que al generarse el péptido señal a partir del mismo gen estructural, resulta innecesaria la presencia de genes que produzcan proteínas necesarias para el procesamiento y secreción de la bacteriocina madura.

#### 4.8.3.5. *Helveticina J*

Esta bacteriocina es producida por *Lactobacillus helveticus*, microorganismo que se encuentra de manera natural en quesos madurados. La bacteriocina presenta actividad antibacteriana contra especies relacionadas. Es una proteína de 37 kDa termolábil (30 min a 100°C) y el gen que la produce se localiza en el DNA cromosomal (Joerger y Klaenhemmer 1986; Joerger y Klaenhemmer 1990). Poco se conoce de las características bioquímicas de la bacteriocina y de su modo de acción.

#### 4.8.4. Aplicaciones de las bacteriocinas

La actividad antimicrobiana de las bacteriocinas representa un gran potencial para la industria alimenticia pues se pueden utilizar como conservadores biológicos puros que en un momento dado podrían reemplazar a los conservadores químicos porque tienen la ventaja de ser proteínas que al biodegradarse no forman compuestos secundarios.

Las aplicaciones de las bacteriocinas como bioconservadores de alimentos se ven influenciadas por sus propiedades particulares como su espectro de inhibición, estabilidad de acuerdo a su rango de pH y temperatura, sensibilidad a enzimas y solubilidad. De acuerdo con Holzalpfelp y col., (1995), para que una bacteriocina sea aplicada en alimentos debe cumplir varios requisitos:

- 1) ser reconocida como GRAS,
- 2) la bacteriocina debe tener un amplio rango de inhibición contra los principales patógenos transmitidos por alimentos o ser altamente específica contra alguno en particular,
- 3) la bacteriocina debe ser termoestable,
- 4) no debe presentar riesgo alguno contra la salud,
- 5) debe tener efecto benéfico sobre el producto alimenticio, mejorando su inocuidad sin alterar sus propiedades organolépticas y su calidad nutricional.

Para que una bacteriocina pueda ser considerada y aplicada como un aditivo alimentario, deben haberse realizado ciertas investigaciones para establecer su rango de actividad, conocer las características bioquímicas y genéticas tanto de la cepa productora como de la bacteriocina, conocer la sensibilidad de la bacteriocina frente a los cambios de pH y temperatura, los factores que afectan su producción, técnicas que se involucran en el proceso de su purificación y el costo de su aplicación en el alimento (Yang y Ray, 1994). Además de lo anterior, para que la aplicación de las bacteriocinas sea efectiva y segura, estas deben de conservar sus propiedades aún después de recibir el procesado que requieren los alimentos, y para saber si esto se cumple se debe establecer el comportamiento de las bacteriocinas de acuerdo a los siguientes parámetros: a) Sensibilidad a pH: La industria alimentaria demanda bacteriocinas que sean estables a pHs neutros porque una gran variedad de bacterias patógenas se desarrollan bajo esas condiciones, y la mayoría de los alimentos que requieren de conservadores tienen un pH cercano a la neutralidad. b) Sensibilidad a proteasas: Por su naturaleza proteica, las bacteriocinas son susceptibles a estas enzimas, facilitando su degradación después de ser ingeridas y evitando trastornos intestinales. c) Tolerancia al calor: Una característica de las bacteriocinas producidas por BAL es su termotolerancia, por lo que no sufren alteraciones con los tratamientos térmicos que deben aplicarse a ciertos alimentos.

El empleo de las bacteriocinas encierra una serie de beneficios en comparación con el uso de los conservadores químicos tradicionales (Ruiz-Larrea, F., y col., 2007) ya que:

- a) Demostraron un uso seguro en la cadena alimentaria humana y con menos limitaciones que los conservadores químicos, ya que son moléculas producidas de forma natural por microorganismos fermentativos endógenos de alimentos tradicionales.
- b) No existen resistencias conocidas, ni impacto medioambiental puesto que son rápidamente degradadas en la cadena alimentaria humana.
- c) Poseen un espectro de acción muy definido.
- d) Las bacteriocinas en sí, presentan un impacto sensorial nulo en el producto final.
- e) Su actividad se ve potenciada con el pH y poseen efecto complementario al de otros agentes antimicrobianos.
- f) Su aplicación es compatible con el etiquetado de producto ecológico sin conservantes químicos ni de síntesis.

Sin embargo, el empleo de bacteriocinas también tiene inconvenientes, tales como: a) Son menos conocidas que los conservantes químicos, puesto que la nisina fue la primera bacteriocina conocida, y se descubrió en 1933.

- b) No son indestructibles y se degradan rápidamente por las enzimas proteolíticas.
- c) Se necesitan conocimientos técnicos especializados para prepararlas y utilizarlas correctamente, lo cual encarece su empleo.
- d) Son eficaces sólo frente a un tipo determinado de bacterias.
- e) Existen limitaciones legales en su empleo como aditivos alimentarios que exigen validaciones específicas y su aprobación antes de ser empleadas de forma purificada o semipurificada.

Existen tres formas comúnmente utilizadas para aplicar las bacteriocinas en la bioconservación de alimentos (Schillinger y col., 1996):

- 1) Inoculación del alimento con BAL productoras de bacteriocinas en el alimento. La capacidad de las BAL para producir bacteriocinas es crucial para una aplicación exitosa.
- 2) Adición de bacteriocinas purificadas o semi-purificadas como conservadores del alimento.
- 3) Uso de un producto previamente fermentado con una cepa bacteriocinogénica como un ingrediente más del alimento procesado. Es conveniente mencionar que la nisina y su aplicación tiene una larga historia y actualmente es utilizada como conservador seguro de alimentos en alrededor de 48 países diferentes siendo la única aprobada por la FDA (Food and Drug Administration) desde 1988 (Ross y col., 1999).

#### 4.8.5 Fundamento del método Kirby Bauer

En el método de Kirby Bauer, el microorganismo es inoculado en la superficie de una placa de agar, sobre el cual se colocan discos impregnados con una concentración conocida del antibiótico. Las placas se incuban por 16-18 horas a 35- 37°C. Durante la incubación, el antibiótico difunde radialmente desde el disco a través del agar, por lo que su concentración va disminuyendo a medida que se aleja del disco. En un punto determinado, la concentración del antibiótico en el medio es incapaz de inhibir al germen en estudio. El diámetro del área de inhibición alrededor del disco puede ser convertido a las categorías de sensible, intermedio o resistente (S, I, o R) de acuerdo a tablas publicadas por los organismos encargados del control de tales métodos, por ejemplo el Comité Nacional de Estandar de Laboratorios Clínicos de los Estados Unidos de Norteamérica (National Committee for Clinical Laboratories Standards), (Pedrique 1992).

#### 4.9. Patógenos en Alimentos

Los alimentos son alterados por diferentes géneros bacterianos y a su vez, pueden servir como vehículo de patógenos o sus toxinas. Se conoce como microbiota dominante a los microorganismos que causan la descomposición bajo las condiciones normales de almacenamiento.

Dichos patógenos se pueden evitarse teniendo un minucioso manejo higiénico del alimento, aplicando químicos o bacterias benéficas productoras de bacteriocinas.

Entre los microorganismos patógenos más importantes para industria alimentaria se encuentran: *Salmonella sp.*, *Escherichia Coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*.

##### 4.9.1 *Salmonella*

La *Salmonella* es un bacilo Gram (-) que se comporta como patógeno intracelular facultativo y su hábitad es en el aparato gastrointestinal de los animales y el hombre.

El género *Salmonella* forma parte de la división Bacteria, phylum Proteobacteria, clase Gamma-proteobacteria, orden Enterobacteriales, familia Enterobacteriaceae.

Diferentes serotipos de Salmonella pueden producir distintos cuadros de infección aguda en el hombre, que clásicamente pueden clasificarse en cuatro grupos: fiebre entérica, gastroenteritis, bacteriemia o infección focal extraintestinal, denominándose invasivas aquellas infecciones que traspasan la barrera intestinal. Como ocurre con otras enfermedades infecciosas, el curso de la enfermedad y la evolución clínica depende de una gran variedad de factores, entre los que se incluyen la dosis recibida, el estado inmune del hospedador, la composición de su microbiota intestinal y el linaje genético tanto del hospedador como del organismo infeccioso. También es posible que la infección curse asintomática (Betancor, Yim 2012).

#### 4.9.2. *Escherichia Coli*

Es un bacilo corto Gram (-), catalasa positivo, oxidasa-negativo y anaerobio facultativo. Es un microorganismo habitual en el intestino del hombre y de los animales de sangre caliente. Su alta concentración en heces, su facilidad de cultivo, así como su relativa presencia en el agua, contribuyo a que se le eligiera como indicador de contaminación fecal en las aguas de consumo y en los alimentos.

Las manifestaciones clínicas de esta varían desde una infección asintomática a diarrea acuosa sin sangre, colitis hemorrágica, síndrome hemolítico-urémico (SHU) y púrpura trombocitopènica trombòtica (PTT) (Sánchez y col. 2009).

#### 4.9.3. *Staphylococcus aureus*

Está ubicado en la familia Micrococaceos, que son cocos Gram (+), que se disponen en grupos a modo de racimos irregulares, de donde procede su nombre.

Las enterotoxinas estafilocócicas son causa frecuente de un número elevado de brotes de toxiinfección alimentaria. Los síntomas características de la intoxicación estafilocócica son náuseas, vómitos, dolores estomacales y abdominales y ocurren rápidamente (1-6h) tras la ingesta del alimento contaminado.

#### 4.9.4. *Klebsiella pneumoniae*

Los microorganismos del género Klebsiella son bacilos gram (-) inmóviles que pertenecen a la familia Enterobacteriaceae. Pueden causar infecciones graves, como neumonía destructiva.



Estos microorganismos pueden proliferar en sistemas de distribución de agua, y se sabe que colonizan las arandelas de los grifos. También son excretados en las heces de muchas personas y animales sanos, y se detectan con facilidad en aguas contaminadas por aguas residuales

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

El experimento se llevó a cabo en el laboratorio de fermentaciones del departamento de ciencia y tecnología de alimentos de la universidad autónoma agraria Antonio Narro.

Se utilizaron diferentes tipos de leche de las cuales se aislaron 6 cepas de bacterias ácido láctico que se denominaron con ciertas nomenclaturas, con la finalidad de diferenciar el tipo de fuente de obtención.

### 5.1. Aislamiento

Se preparó medio sólido MRS (Man, Rogosa y Sharpe), con un pH de 6.5, el cual se esterilizó en una autoclave vertical, a 121° C por un tiempo de 15 minutos, se agregó 15 ml de dicho medio en cajas Petri esterilizadas, para el procedimiento anterior se utilizó una campana de flujo laminar vertical (Scorpion Scientific, Modelo: A 80000), asegurando así contaminaciones de otros microorganismos.

Se sembró las BAL en las cajas Petri con el medio anteriormente preparado, para este proceso se utilizó una campana de flujo laminar en condiciones asépticas. La siembra se realizó con el método de estriado por agotamiento, para facilitar el aislamiento ya que conforme se va haciendo la técnica se va disminuyendo la carga microbiana.

Las cajas se etiquetaron con una nomenclatura en la cual nos permitiera diferenciar el tipo de fuente de obtención, se sellaron con parafilm, se introdujeron en un recipiente plástico al se le inyectó nitrógeno para crear condiciones de anaerobiosis y se incubación en una incubadora arsa mod. AR-130D) a 37° C por 72 horas.

## 5.2. Purificación

Transcurridas las 72 horas de las cepas crecidas se tomó una muestra en las colonias aisladas para realizar una tinción de Gram y se examinó las cepas en el microscopio para determinar que no fueran Gram negativo, ya que una de las características de las BAL es que son Gram positivos, las colonias que tuvieron coloración morado se sembraron en medio sólido MRS repitiendo el procedimiento anterior incluyendo la tinción hasta obtener un cultivo puro.

### 5.2.1. Tinción de Gram

Esta técnica se realizó con el propósito de utilizar las cepas correctas ya que las bacterias ácido lácticas tienen la característica de ser Gram positivo, para este procedimiento se utilizaron un aza, agua destilada, portaobjetos, cristal violeta, yodo lugol, safranina, alcohol acetona.

La toma de muestras se realizó de manera aséptica en una campana de flujo laminar con aire estéril. Dichas muestras se tomaron de las cajas Petri con crecimiento. Se puso 1 gota de agua destilada en el portaobjetos luego se le agregó la muestra de la cepa con ayuda del aza y se dejaron secar con el aire de la campana.

A las muestras secas se le aplicó 1 gota de cristal violeta por 1 minuto, y se enjuagó con agua destilada hasta quitar el reactivo, luego se le aplicó 1 gota de yodo lugol por 1 min, se enjuagó hasta quitar la solución, después se puso una gota de alcohol acetona hasta descolorar obteniendo una coloración azul tenue. Se aplicó una gota de safranina, por último se lavó con agua destilada y se dejó secar al medio ambiente.

Se observaron las muestras en un microscopio (LABOMED MOD. CxL) con el objetivo 100X para asegurar su purificación y su morfología.

### 5.2.2. Conservación de bacterias

Para la conservación de las cepas purificadas se realizó inóculos en medio líquidos de MRS, los cuales se prepararon en frascos con capacidad de 50 ml, añadiendo 20 ml de medio a cada uno, esterilizándolos en un autoclave a 121 °C por 15 minutos, dejándolo enfriar y posteriormente inoculando, dejando incubar por 72 horas.

Para mantener las cepas en conservación se hizo una mezcla de glicerol al 10% y leche descremada al 10% en 100 ml de agua destilada. Se agregó 10ml de la

mezcla a cada frasco que contenía el medio de cultivo y se homogenizó suavemente. Después, con una micropipeta se tomó un mililitro de la mezcla homogenizada y se vació en un tubo eppendorf, estos tubos se mantienen en congelación a una temperatura de -22°C para conservar las cepas.

### **5.3. Caracterización de las bacterias**

Se llevó a cabo una fermentación de 20 ml caldo MRS inoculadas por cepas de bacterias ácido lácticas purificadas, las cuales se incubaron en condiciones anaeróbicas durante 72 horas, teniendo una producción de 5 milímetros de biomasa.

En la una campana laminar de flujo laminar (Scorpio Scientific, Modelo: 80000), se agregó el caldo con la biomasa a tubos esterilizados, a los cuales se le añadió 5 ml de líquido y fueron sellados con parafilm, para evitar una contaminación al sacarlos de medio estéril de la campana.

Los tubos fueron centrifugados a 3400 rpm durante 15 min. Ya sedimentada la biomasa se retiró con una micropipeta de 1 ml el sobrenadante, pasándolo en tubos con capacidad de 50 ml.

El sobrenadante que se encontraba en un tubo Falcón de 50 ml se sometió a una ultrafiltración con un dispositivo Pellicon XL, del cual se obtuvieron 2 extractos uno permeado y otro retenido, los cuales se sometieron a calentamiento en baño María por 10 min a temperaturas de 70 y 80°C. Para posteriormente verificar su efecto inhibitorio.

### **5.4. Evaluación del efecto microbiano de las bacteriocinas**

En este fase se preparó medio solido agar nutritivo, el cual se esterilizó en una autoclave vertical, a 121°C por un tiempo de 15 minutos, se agregó 15 ml de dicho medio en cajas Petri esterilizadas, para el procedimiento anterior se utilizó una campana de flujo laminar vertical (Scorpion Scientific, Modelo: A 80000), asegurando así contaminaciones de otros microorganismos.

Se sembró los patógenos en las cajas Petri con el medio anteriormente preparado, para este proceso se utilizó una campana de flujo laminar en condiciones asépticas. La siembra se realizó con el método de estriado por agotamiento, para facilitar el aislamiento ya que conforme se va haciendo la técnica se va disminuyendo la carga microbiana.

Las cajas se etiquetaron se etiquetaron el nombre del patógeno, se sellaron con parafilm, se incubación en una incubadora arsa mod. AR-130D) a 37° C por 48 horas.

Se realizó tinción de Gram para verificar que las cepas estuvieran puras y fueran Gram (-), una vez purificadas las bacterias estaban preparadas para la prueba.

Se utilizó el método de difusión en disco para determinar el efecto inhibitorio (Kirby y Bauer), es decir, sobre placas de agar nutritivo se sembraron cepas de bacterias patógenas y se colocaron sobre ellas discos de papel (tres repeticiones), a cada disco se le agregó 20 µl de los extractos (permeado y retenido) que contenía a las bacteriocinas y se incubaron a 37°C durante 48 hrs. Trascurrido el tiempo, se midió el halo de inhibición.

Dichas pruebas de efectuaron con los extractos a temperatura ambiente, calentados a 70 y 80°C por 10 min como se mencionó en el punto 5.3.

## **5.5. Etapa 4. Identificación molecular de las cepas de BAL.**

### **5.5.1. Extracción de ADN de Bacterias Acido lácticas**

1. Obtener un cultivo puro en agar MRS y resuspender las células en 500 µl de urea 6M y 100 µl de SDS 10%.
2. Incubar a 37°C durante 20 minutos.
3. Incubar las muestras a ebullición durante 5 minutos (baño maría).
4. Centrifugar las muestras a 8000 rpm durante 10 minutos a 25°C.
5. Descartar el sobrenadante.
6. Incubar las células en 100 µl de NaOH 0.2N a 37°C durante 10 minutos.
7. Separar algún desecho por centrifugación a 3000 rpm durante 3 minutos a 25°C.
8. Desechar el precipitado y resuspender el sobrenadante (ahí se encuentra el ADN) con 2.5 volumen de etanol absoluto e incubar a -20°C durante 2 horas.

9. Centrifugar a 13000 rpm durante 15 minutos a 4°C.
10. Lavar las pastillas con etanol al 70% y dejarlas secar.
11. Resuspender el ADN en 50 µl de Buffer TE (10 mM Trizma base, 1mM EDTA).
12. Conservar ADN a 4°C.



Figura 8. Precipitado de las células en un tubo eppendorf para la obtención de ADN.

#### 5.5.1.1. Cuantificación de ADN

Para la cuantificación del ADN se utilizó un espectrofotómetro (Thermo Scientific; Modelo G10S UV-Vis). Primeramente se midió el blanco con 200 µl de agua Milli Q y posteriormente las muestras, en este proceso se agregaron 198 µl de agua Milli Q y 2 µl de muestra. Posteriormente se tomaron los datos de Absorbancia a 260.0 nm, Absorbancia 280.0 nm, y el valor R. Los datos obtenidos se acomodaron en una tabla y se sustituyeron en otras fórmulas.

Tabla 8. Fórmulas para la sustitución de los datos obtenidos en la cuantificación del ADN.

Muestra	260.0 nm	280.0 nm	R	µg/ml	µg Totales
<b>(Código)</b>	Abs1	Abs 2	(Abs1)/(Abs2)	(Abs1)(100)(50)	( µg/ml)(0.05)

Nota: las muestras de ADN se mantienen en refrigeración a 4°C para su posterior análisis.



Figura 9. Espectrofotómetro en proceso de calibración para cuantificar ADN.

#### *5.5.1.2. Electroforesis horizontal de agarosa al 1% para medir la calidad del ADN*

En un matraz Erlenmeyer de 250 ml se disolvió 1.5 gramos de agarosa en 150 ml de Buffer TBE 0.5X (40 mM Trizma base, 45 mM Ácido Bórico y 1 mM EDTA) con pH de 8.0 - 8.3. Posteriormente la mezcla se calentó con agitación en una parrilla eléctrica hasta quedar transparente y en ebullición, cuidando que no se derramara el contenido. Se dejó enfriar la agarosa hasta una temperatura de 45°C y con una micropipeta se le agregó 15 µl de bromuro de etidio (la puntilla se colocó en la caja de material peligroso). Después, la mezcla se vació en el portagel previamente limpio y con el peine dentro para formar los pocitos donde serían depositadas las muestras. Durante el vaciado se evitó la formación de burbujas y el gel se dejó solidificar durante 20-30 minutos, transcurrido el tiempo se retiró el peine del portagel evitando cualquier ruptura. El portagel se acomodó en la cámara de electroforesis (Labnet; Modelo E1015-15) y se llenó de Buffer TBE hasta la marca señalada en la misma. Para adicionar la muestra, sobre una tira de parafilm se colocó 5 µl de azul de bromofenol y 10 µl de muestra de ADN, se mezcló suavemente haciendo 5 pipeteos constantes y después se vertió en un pozo del gel dentro de la cámara de electroforesis. Una vez agregadas las muestras, la cámara se conectó a una fuente de poder (Labnet; Modelo E0303) uniendo los

polos (Rojo y negro) adecuadamente y se dejó correr el gel a 90 Voltios durante 30 o 45 minutos (Figura 9). El gel se puso sobre un Transiluminador (UVP; M-20V) se conectó a la corriente y se encendió la luz UV para observar las bandas de las muestras y capturar una foto con el Software UVP para asegurar la calidad del ADN. Se utilizan lentes especiales para evitar el contacto directo con los rayos UV.

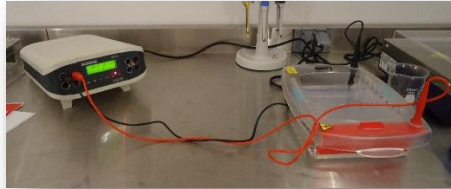


Figura 10. Cámara de electroforesis horizontal corriendo muestras de ADN en gel de agarosa.

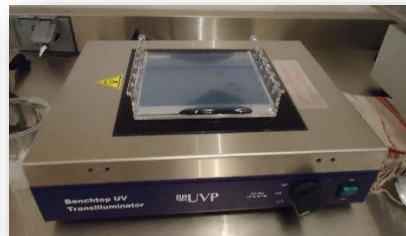


Figura 11. Gel de electroforesis sobre el transiluminador de luz UV para observar la calidad de las bandas.

#### 5.5.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para identificar el Gen 16S del ADN ribosomal se utilizaron los siguientes primers:

27 F → 5-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3' (100 pmol/μl)

1492 R → 5-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3' (100 pmol/μl)

Primeramente se realizó la preparación de los primers de trabajo a una concentración de 15 pmol, y por consiguiente el coctel de reactivos, los cuales se mantenían en congelación. Estos reactivos se adicionaron en las siguientes cantidades:

Tabla 9. Cantidades de los reactivos utilizados para PCR.

Reactivos	Concentración	Cantidad (1 muestra)
Buffer de reacción 10X	10 X	2.5 µl
Mg Cl <sub>2</sub>	25 mM	1.5 µl
Primer 27 F	15 pmol	0.83 µl
Primer 1492 R	15 pmol	0.83 µl
DNTP'S	25 mM	0.2 µl
Enzima Taq-Plimeraza	5 unidades/µl	0.2 µl
Agua desionizada	—	18 µl
TOTAL		24 µl

El coctel de reactivos se me mezcló suavemente para evitar la formación de burbujas y se introdujo en microtubos de 0.5 µl previamente etiquetados, después, se adicionó 1 µl de muestra de ADN que se mantenía en refrigeración, quedando así un volumen total de 25 µl por cada tubo. Todo el proceso se realizó bajo condiciones de limpieza y materiales previamente esterilizados.

Posteriormente las muestras se metieron a un Termociclador (Labnet; Multigene OPTIMAX) donde se llevó a cabo un barrido para determinar la temperatura de anillamiento (TM) tomando en cuenta las siguientes condiciones de PCR (Tabla 10) con 35 ciclos.



Tabla 10. Tiempos y temperaturas para PCR.

TIEMPO	TEMPERATURA	CICLO
2 minutos	94° C	—
1 minuto	94° C	✓
1 minuto	TM	✓
1 minuto	72° C	✓
10 minutos	72° C	—
Infinito ( $\infty$ )	4° C	—

Finalizado el proceso, se realizó una electroforesis del producto obtenido con gel de agarosa al 3% para identificar las muestras amplificadas. El producto de PCR se mantienen en congelación a -20° C.



Figura 12. Termociclador con muestras de ADN, preparadas para realizar la PCR.

### 5.3.2. Electroforesis de PCR con gel de agarosa al 3%

En un matraz Erlenmeyer de 250 ml se disolvió 4.5 gramos de agarosa en 150 ml de Buffer TBE 0.5X (40 mM Trizma base, 45 mM Ácido Bórico y 1 mM EDTA) con pH de 8.0 - 8.3. Posteriormente la mezcla se calentó con agitación en una parrilla eléctrica hasta quedar transparente y en ebullición. Se dejó enfriar la agarosa hasta una temperatura de 45°C y con una micropipeta se le agregó 15  $\mu$ l de bromuro de etidio (la puntilla se colocó en la caja de material peligroso). Después,

la mezcla se vació en el portagel previamente limpio y con el peine dentro para formar los pocitos donde se depositaron las muestras. Durante el vaciado se evita la formación de burbujas y el gel se deja solidificar durante 30-40 minutos, trascurrido el tiempo se retiró el peine del portagel evitando cualquier ruptura. El portagel se acomodó en la cámara de electroforesis (Labnet; Modelo E1015-15) y se llenó de Buffer TBE hasta la marca señalada en la misma. Después, sobre una tira de parafilm se colocó 2  $\mu$ l de azul de bromofenol y 5  $\mu$ l de muestra de ADN obtenido de la PCR. Para los marcadores moleculares se agregó 2  $\mu$ l de azul de bromofenol y 3  $\mu$ l de marcador molecular (600 pb), estos se ponen al principio y al final de las muestras. Una vez agregadas las muestras, la cámara se conecta a una fuente de poder (Labnet; Modelo E0303) uniendo los polos (Rojo y negro) adecuadamente y se deja correr el gel a 90 Voltios durante 30 o 45 minutos. Trascurrido el tiempo, el gel se pone sobre un Transiluminador (UVP; M-20V) se conecta a la corriente y se enciende la luz UV para observar las bandas y observar si amplificó el gen 16S del ADN ribosomal en las muestras analizadas.

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

### 6.1. ETAPA 1: Aislamiento de la Bacterias.

Se Aislaron 6 cepas de bacterias ácido lácticas de las diversas fuentes de leche y de denominaron con los siguientes nombres:

Tabla 11. Nomenclatura de las cepas aisladas y fuente de obtención.

NOMBRE	FUENTE DE OBTENCIÓN
BS1	Leche materna
BAA	Leche materna
BD	Leche materna
LC2	Leche de cabra
LC1	Leche de cabra
XE	Leche de vaca

### 6.2. ETAPA 2: Purificación e identificación de las bacterias ácido lácticas

#### 6.2.1. Características macroscópicas de las BAL aisladas.

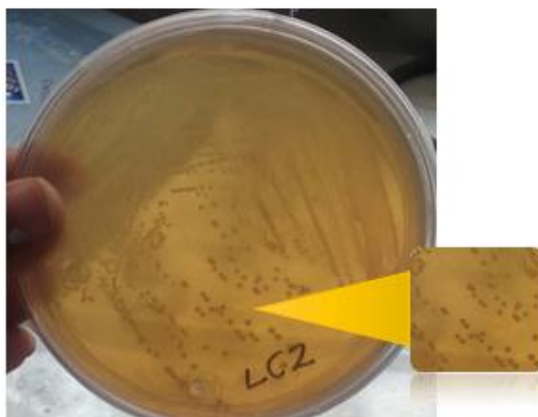


Fig. 13. Bacteria denominada como **LC2**, aislada de leche de cabra.

En la figura anterior se puede observar colonias pequeñas, de forma circular, superficie convexa, muy separadas, de color blanco, consistencia cremosa. De acuerdo a la literatura estas son características que describen a bacterias lácticas

ya que el tamaño varía de 2 a 5 mm, su forma es convexa, tiene coloración blanca y puede llegar a ser hasta un tono amarillento.

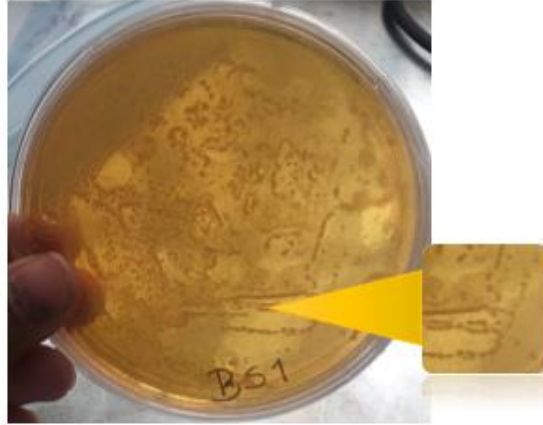


Fig. 14. Bacteria denominada como **BS1**, aislada de leche materna.

En esta figura 14 se puede observar Colonias muy pequeñas de forma circular y elevación convexa, muy juntas, de color blanco y consistencia cremosa. De acuerdo a la literatura esta colonia a simple vista se puede tratar de una colonia de bacterias ácido lácticas de acuerdo a su tamaño, forma y coloración.

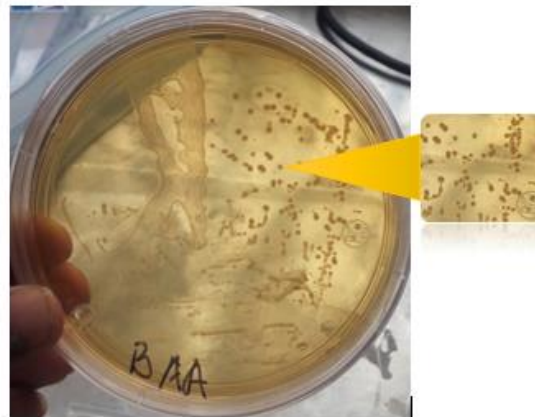


Fig. 15. Bacteria denominada como **BAA**, aislada de leche materna.

En la figura 15 se observa Colonias grandes de forma circular, elevación convexa, borde entero y redondeado, separadas, color blanco, de consistencia cremosa. Se hace una comparación a lo establecido en libros y se puede concluir que se trata de colonias de bacterias ácido lácticas ya que coinciden con coloraciones, consistencia, forma y tamaño.

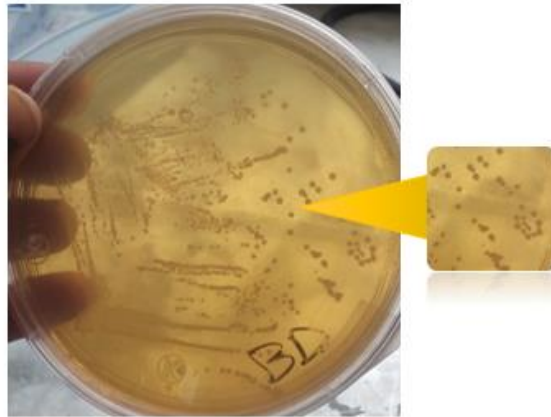


Fig. 16. Bacteria denominada como **BD**, aislada de leche materna.

En la figura anterior se puede observar Colonias medianas de forma circular, elevación convexa, separadas, de color blanco y consistencia cremosa. Al hacer una comparación con lo establecido en libros se llega a la conclusión de que acuerdo a las características de estas, se trata de colonias de bacterias ácido láctico.

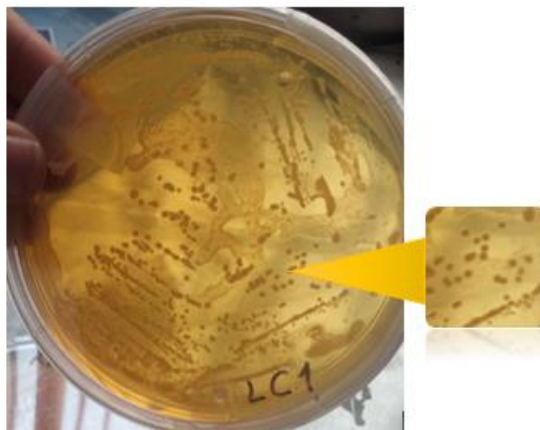


Fig.17. Bacteria denominada como **LC1**, aislada de leche de cabra.

Colonias medianas de forma circular, elevación convexa, separadas, color blanco y consistencia cremosa, estas características son algunas de las que presentan la bacterias ácido lácticas, sin embargo posteriormente se hará verificación por medio de una tinción de Gram para tener la certeza de que sean BAL, ya que se proviene de fuentes como la leche y se desarrollaron en un medio óptimo como es el caso del agra MRS, en un ambiente de anaerobiosis, se tiene la certeza de que estas son Bacterias ácido lácticas.

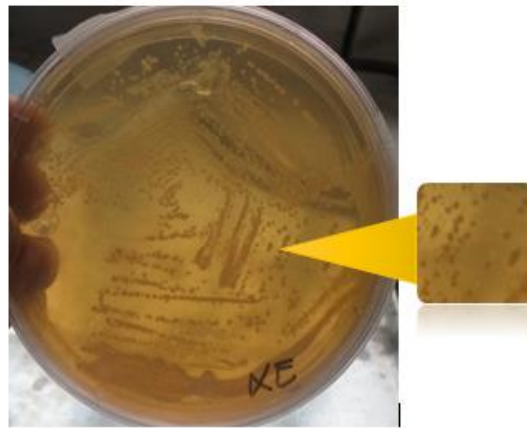


Fig. 18. Bacteria denominada como **XE**, aislada de leche de vaca.

Colonias medianas de forma circular, elevación convexa, poco separadas, color blanco y consistencia cremosa. De acuerdo a la revisión literaria las bacterias ácido lácticas pueden tener un tamaño de 2 a 5 mm, su forma es convexa, tiene coloración blancosa y puede llegar a ser hasta un tono amarillento, por lo que al compararlo con lo establecido en libros se llegó a la conclusión de que se trata de estas, además de las características visuales, se dieron las condiciones necesarias para su óptimo desarrollo.

## 6.2.2 Características microscópicas de las bacterias

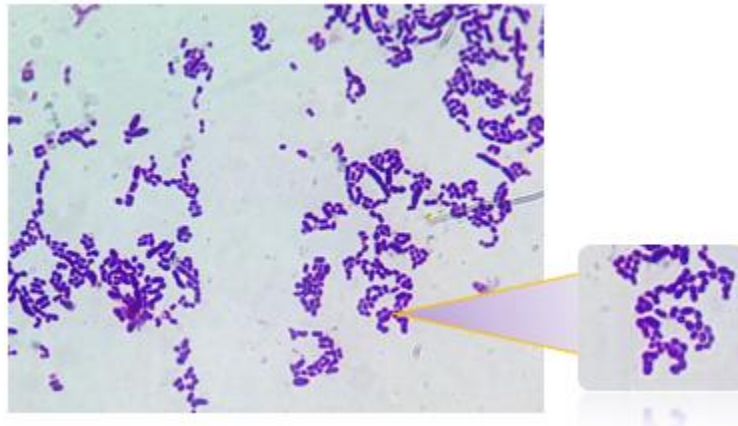


Fig. 19. Bacterias denominadas **BAA**, vistas a 100 x.

Se aprecian cocos Gram positivos (color morado) unidos en forma de racimos, sin flagelos, de acuerdo con la literatura, estas son características de bacterias lácticas, cabe mencionar tomando en cuenta la forma de agrupación se puede referir a un enterococcus o streptococcus ya que es muy similar.

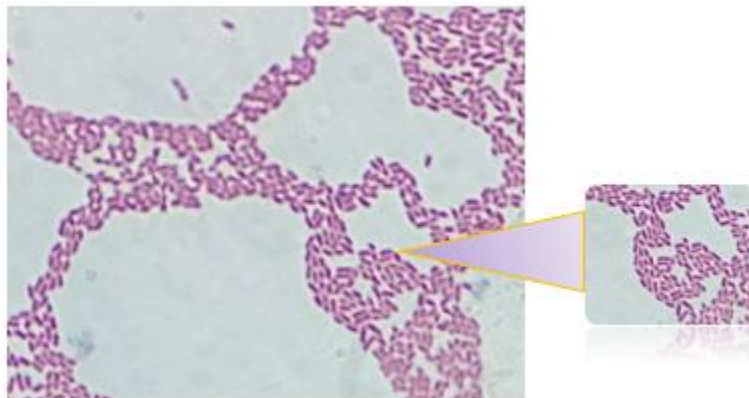


Fig. 20 Bacterias denominadas **LC1**, vistas a 100 x.

Se aprecian bacilos positivos, unidos en forma de cadena, sin flagelos, comparando lo establecido en libros se refiere a colonias de bacterias lácticas, ya

que además de tener las características son cepas que crecieron en anaerobiosis y en situaciones óptimas para que estas se desarrollaran.

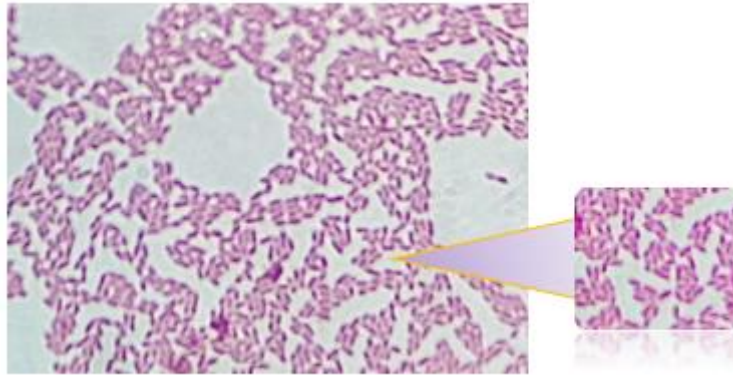


Fig. 21. Bacterias denominadas **XE**, vistas a 100 x.

Se aprecian bacilos positivos, unidos en forma de racimos, sin flagelos. De acuerdo con lo establecido en la literatura se trata de bacterias ácido lácticas, debido a que se crecieron en un ambiente anaeróbico, son Gram positivos, bacilos, no esporulados.

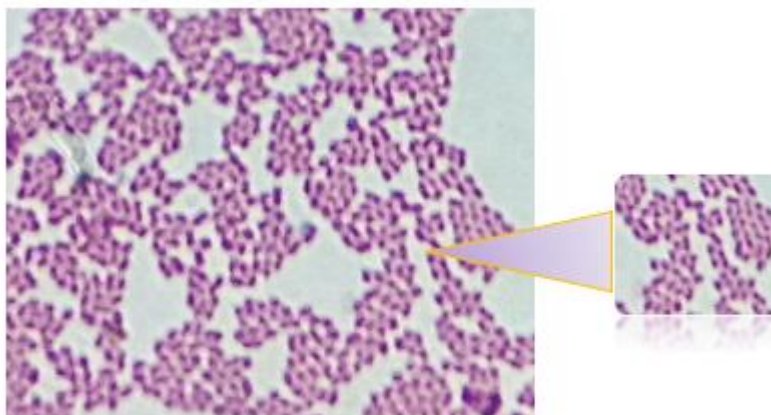


Fig. 22. Bacterias denominadas **BD**, vistas a 100 x.



Se aprecian cocos Gram positivos (color morado) unidos en forma de racimos, sin flagelos, estas son características de bacterias lácticas, cabe mencionar tomando en cuenta la forma de agrupación se puede referir a un enterococcus o streptococcus ya que su tipo de agrupación son muy similares.

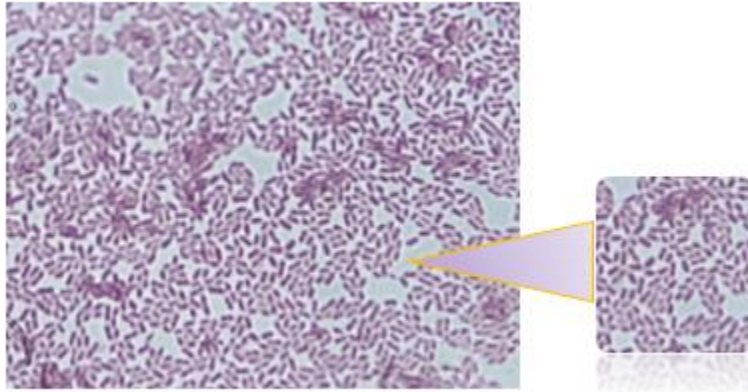


Fig. 23. Bacterias denominadas **BS1**, vistas a 100 x.

Se aprecian bacilos positivos, unidos en forma de racimos, sin flagelos, dichas características descritas anteriormente coinciden con las descritas en libros para bacterias ácido lácticas, añadiendo a esto que se desarrollaron en un ambiente anaeróbico y el agar MRS que es el óptimo para el crecimiento de este tipo de microorganismos.

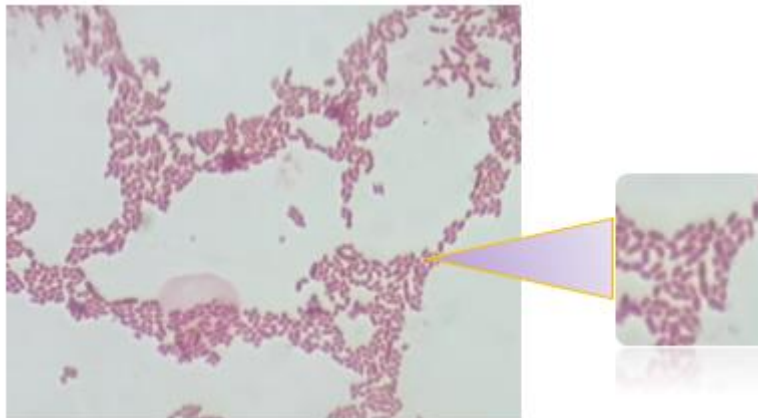


Fig. 24. Bacteria denominada **LC2**, vista a 100 x.

Se aprecian cocos positivos, unidos en forma de racimos, sin flagelos. Características descritas para una bacteria láctica ya que además de sus morfología se sometieron a ambiente anaeróbico para asegurar el crecimiento de estas.

### 6.2.3. Conservación de cepas.

Se logró conservar 6 cepas en un medio de leche semidescremada con glicerol se utilizó este método de liofilización, ya que la leche durante el tiempo evaluado conservó la viabilidad en niveles adecuados. El glicerol resultó una buena sustancia lioprotectora para las cepas al mantener la estabilidad de la viabilidad. La conservación por liofilización es un método de gran utilidad en el trabajo de las colecciones de cultivos que se emplean para el control microbiológico, debido a sus numerosas ventajas, entre la que resalta tiempo de supervivencia prolongado.



Fig. 25. Cepas conservadas en leche descremada con glicerol.

### 6.3. ETAPA 3: Caracterización de las bacterias ácido lácticas

Se lograron caracterizar 6 cepas de bacterias ácido láctico los cuales se sometieron a una ultrafiltración para eliminar cualquier presencia de células de las bacterias probióticas, obteniendo dos extractos uno permeado y otro retenido con presencia de bacteriocinas producto de las mismas, los cuales se sometieron a calentamiento para ver su efecto inhibidor.

Tabla 12. Extractos obtenidos después de la ultrafiltración.

<b>BACTERIA</b>	<b>EXTRACTO PERMIADO (ml)</b>	<b>EXTRACTO RETENIDO (ml)</b>
<b>LC1</b>	3	40
<b>LC2</b>	5	45
<b>XE</b>	5	45
<b>BAA</b>	5	40
<b>BD</b>	3	45
<b>BS1</b>	4	40

Luego de obtener los extractos, estos se calentaron 70 y 80 °C por 10 min, en este momento, los extractos tomaron un color más oscuro, esto se debe a los componentes que contienen los mismos, como son los agares, ya que estos al momento de ser recalentados, tienen a tomar coloraciones oscuras e incluso tener precipitaciones, debido a la oxidaciones de algunos de sus componentes.

## 6.4 Pruebas contra patógenos

### 6.4.1 Cepas Patógenas Purificadas

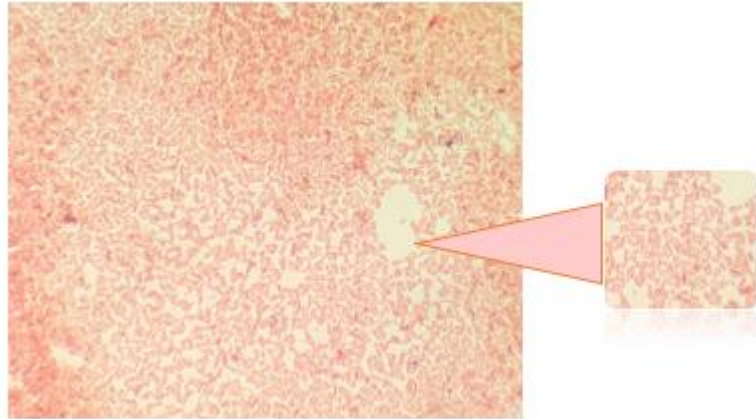


Fig. 26. *E. coli* purificada vista con microscopio a 100 X.

En la figura anterior se observa bacilos cortos Gram (-), que al hacer la comparación con lo establecido en libros se puede constatar que es el microorganismos ya que creció con el ambiente requerido para dicha bacteria.

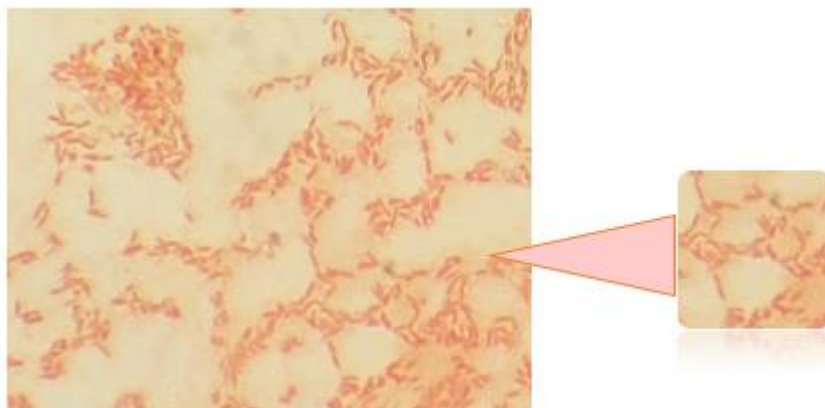


Fig. 27. *K. Pneumoniae* vista con microscopio a 100 X.

En la imagen anterior se pueden observar bacilos Gram (-), inmóviles. De acuerdo con lo establecido con la teoría se asegura que la bacteria purificada en el laboratorio de fermentaciones de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro si corresponde a la bacteria deseada ya que presenta la morfología, se sometió a condiciones aptas para su óptimo desarrollo.

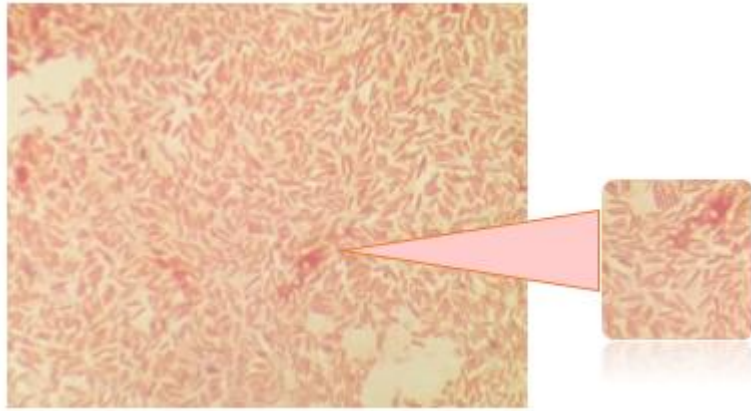


Fig. 28. *Salmonella* purificada vista con microscopio a 100 X.

De acuerdo a lo que establece la teoría la cepa purificada en el laboratorio si corresponde a *Samonella*, ya que como se observan son bacilos Gram (-), los cuales se hicieron crecer en condiciones óptimas para que esta crezca.

#### 6.4.2. Cuantificación de inhibición

En esta etapa se obtuvieron diversos resultados debido a que las bacteriocinas producidas por las cepas asiladas, presentan diferentes modos de acción. Por lo tanto de los tratamientos que tuvieron mejores resultado fueron los de temperatura ambiente y 70°C calentado por 10 min, Ya que estos mostraron más efecto inhibitorio. Sin embargo con los extractos sometidos a calentamiento por 10 min a 80°C tuvieron presencia de células probióticas sobre las bacterias patógenas, las cuales no dejaron observar la efectividad de la inhibición.

Para el mejor entendimiento de estos resultados se hace mención que los extractos sin biomasa de la bacteria probiótica, se sometieron a una ultrafiltración para asegurar que no hubiese presencia de células de las mismas, obteniendo así dos extractos en los cuales se asegura solo la presencia de sus bacteriocinas y no de la bacteria.

Los extractos obtenidos se denominan retenido y permeado, en el caso del primero mencionado tiene una mayor concentración, ya que pasa por menor números de membranas a diferencia del permeado.

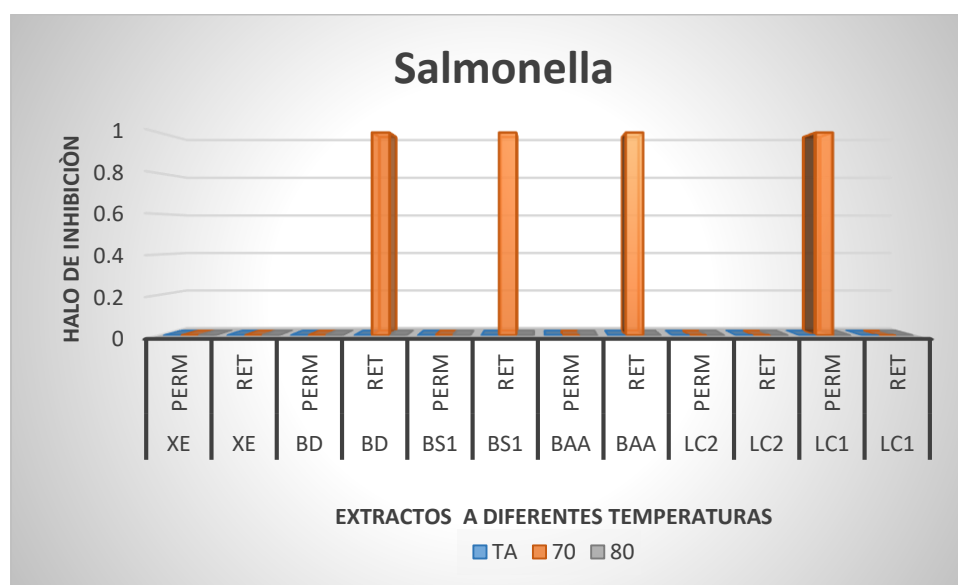


Fig. 29. Halos de inhibición de *Salmonella* a las 48 horas

En la Figura anterior se observa que los extractos retenidos calentados a 70°C por 10 min de las cepas denominadas BD, BS1, y BAA al igual que el permeado de la bacteria LC1 tuvieron un halo de inhibición de 1 mm, demostrando que es el mayor halo de inhibición en un lapso de 48 horas para Salmonella.

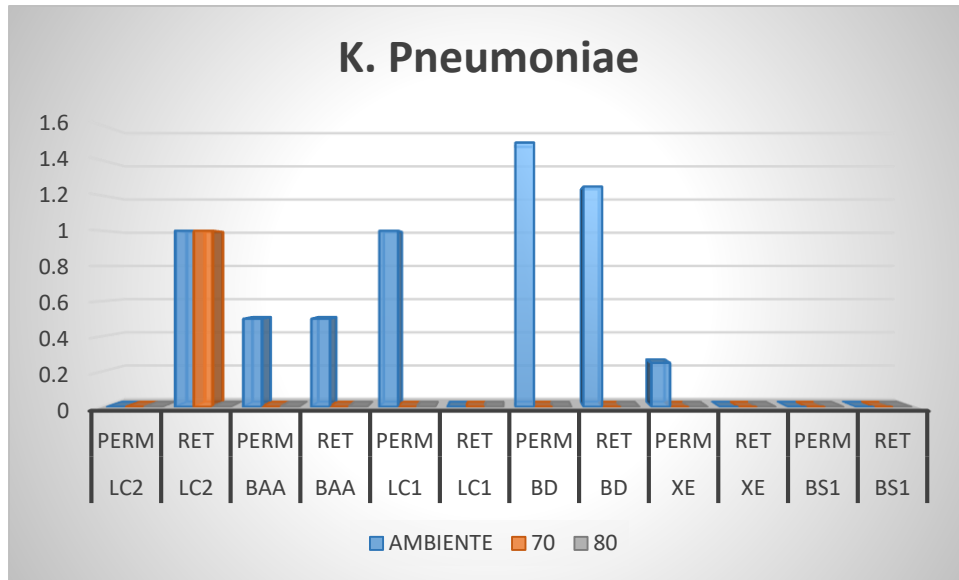


Fig. 30. Halos de inhibición de *K. Pneumoniae* a las 48 horas

En la figura 30 se observa que 7 de los 12 extractos tuvieron inhibición a temperatura ambiente y solo 1, el retenido de LC2 calentado a 70°C por 10 min, tuvo inhibición sin embargo todos los extractos calentados a 80°C por 10 min no tuvieron efecto inhibitorio.

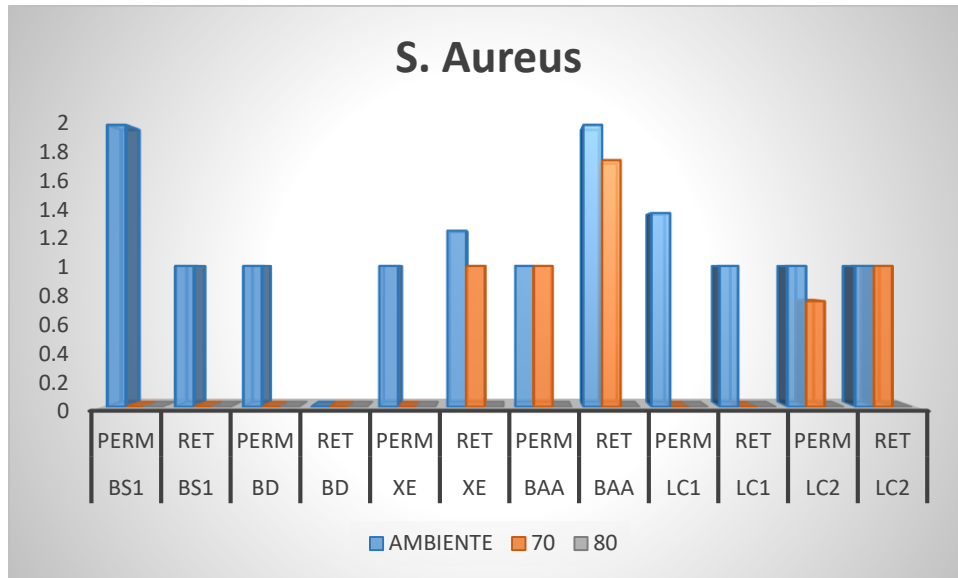


Fig. 31 Halos de inhibición de *S. Aureus* a las 48 horas.

En la figura anterior se observa que 11 de los 12 extractos a temperatura ambiente tuvieron un halo de inhibición, destacando los extracto retenido de la bacteria BAA y permeado de la cepa BS1 teniendo un halo de 2 mm cada uno, en el caso los extractos sometidos a 70° C por 10 min., solo se observó inhibición en 5 de 12 destacando el extracto retenido de BAA. Sin embargo para el caso de los extractos calentados a 80°C por 10 min no presentaron ningún halo de inhibición.

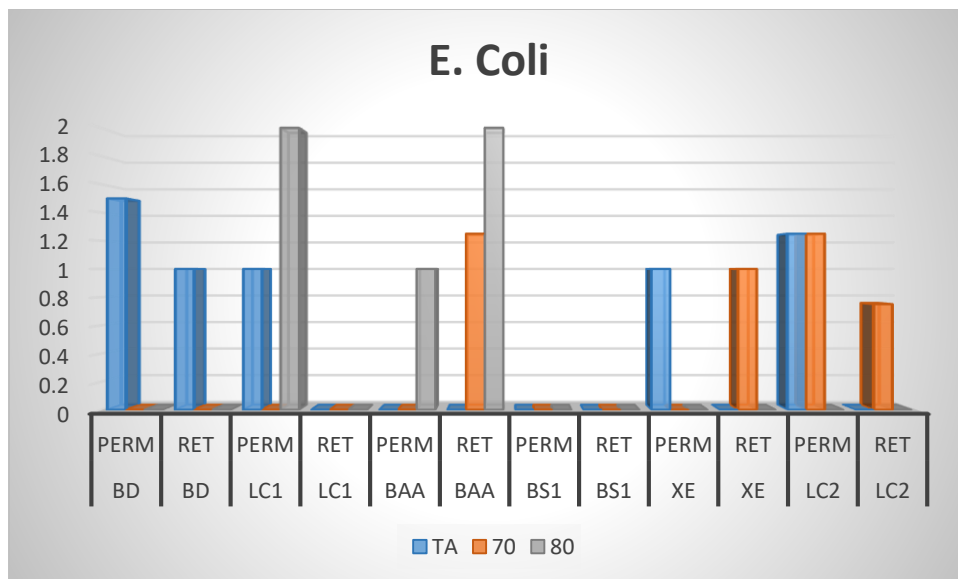


Fig. 32. Halos de inhibición de *E. Coli* a las 48 horas.



En la figura anterior se observan diversos comportamientos de los extractos, para el caso de los de temperatura ambiente solo tenemos inhibición en 5 de 12, destacando el extracto permeado de la bacteria BD, a 70°C por 10 min., se tuvo inhibición en 4 de 12 destacando el retenido de BAA y el permeado de LC2, y para los sometidos a temperatura 80°C por 10 min hubo inhibición en 3 de 12 destacando por su efecto inhibitorio el Permeado de la cepa LC1 y el retenido de BAA.

### 6.5. Identificación molecular

Tabla 13. Identificación de bacterias Probióticas.

No	NOMENCLATURA	BACTERIA IDENTIFICADA	%
1	LC2	<i>Enterococcus hirae</i>	97
2	BD	<i>Enterococcus faecium</i>	97
3	XE	<i>Enterococcus hirae</i>	94
4	BAA	<i>Enterococcus faecium</i>	94
5	LC1	<i>Enterococcus hirae</i>	96
6	BS1	<i>Bacillus toyonensis/cereus</i>	98

## 7. CONCLUSIONES

De acuerdo con los objetivos planeados y los resultados obtenidos en la presente investigación:

- Se Aislaron 6 cepas de Bacterias ácido lácticas, que se denominaron LC1, LC2, BD, BAA, BS1 y XE, las cuales contaban con características macroscópicas similares en cuanto a color, forma, consistencia y elevación, pero con distintos tamaños de colonias.
- Se purificaron dichas BAL sometiéndolas a tinción de Gram para asegurar la pureza de los cultivos, todas las bacterias presentaron características microscópicas similares ya que corresponden a Gram (+).
- Se caracterizaron las cepas mediante fermentación de Caldo MRS, posteriormente filtrando y calentando a diferentes temperaturas.
- Se sometieron a pruebas contra patógenos obteniendo un mayor porcentaje de inhibición en los extractos a temperatura ambiente, seguidos de los calentados a 70° C por 10 min. Los tratados a 80° C no obtuvieron efecto inhibitorio visible. El método de difusión en disco, resultó una técnica apropiada para determinar este factor.
- Se identificaron 6 cepas de bacteria ácido lácticas sometiéndolas a pruebas moleculares de secuenciación de ADN.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

- Abee T, FM Rombouts, J Hugenholtz, G Guihard and L Letellier Mode of Action of Nisin Z Against *Listeria monocytogenes* Scott A Grown at High and Low Temperatures. *Appl. Environ. Microbiol.* 1994; (60) 1962-1968.
- Abee, T., Krockel, L., Hill, C. Bacteriocins: mode of action and potentials in food preservation and control of food poisoning. *Int. J. Food Microbiol.* 1995; (28) 169-185.
- Abrams S.A. Building bones in babies: can and should we exceed the human milk-fed infant's rate of bone calcium accretion? *Nutr Rev* 2006; (64) 94- 487.
- Abul K.A, Lichtman HA, Pober, SJ. *Inmunología celular y molecular*. 3d ed, México DF: Interamericana; 1996.
- Acosta A.G, Ortiz J, Barragán L., Torres S., Santos J.L. Linfocitos T CD4+ y CD8+ en calostro y sangre autóloga de mujeres mexicanas. *Inmunología* 1994; (13) 21-118.
- Agudelo Gómez D. A., Bedoya Mejía O. Composición nutricional de la leche de ganado vacuno. *Revista Lasallista de Investigación*. 2005; (2) 38-42.
- Aguilar Cordero M.J. Componentes bioquímicos de la leche humana. Vitaminas, minerales y otros compuestos. En: Aguilar Cordero MJ. *Lactancia Materna*. 1ª ed. Madrid, España: Elsevier Science; 2005; 65-76.
- Aguilar Cordero MJ. *Lactancia materna*. 1º Edición. Madrid, España: Elsevier Science; 2005; 54.
- Ainsworth R. *Safe piped water: Managing microbial water quality in piped distribution systems*. IWA Publishing, Londres (Reino Unido), para la Organización Mundial de la Salud, Ginebra (Suiza). 2004.
- Allen L.H. Multiple micronutrients in pregnancy and lactation: an overview. *Am J Clin Nutr* 2005 ;( 5) 12-1206.
- Almanza F y Barrera E. *Tecnología de leche y derivados*. Bogota Uniser 1991; 61-66.
- Alvarado C., Identificación y cuantificación de compuestos antimicrobianos producidos por bacterias ácido lácticas aisladas de alimentos artesanales mexicanos. Facultad Autónoma de Querétaro. 2007.
- Anderssen EL, DB Diep, IF Ness IF, VGH Eijsink and J Nissen-Meyer. Antagonistic activity of *Lactobacillus plantarum* C11: two new two-peptide bacteriocins, plantaricin EF and JK, and the induction factor plantaricin A. *Appl. Environ. Microbiol.* 1998; (64) 2269-2272.
- Arai S. Studies on functional foods in Japan. State of the art. *Biosci. Biotech. Biochem.* 1996; (60) 9-15.
- Arbiza, S. I. *Producción de caprinos*. México: AGT Editor, S.A. México, D.F.1987; 47-75.
- Ashwell M. *Conceptos sobre Alimentos Funcionales*. ILSI Europe Concise Monograph Series, ILSI Press 2005.
- Bartram J et al. (eds.): *Heterotrophic plate counts and drinking-water safety: the significance of HPCs for water quality and human health*. Serie de la OMS Emerging Issues in Water and Infectious Disease. Londres (Reino Unido), IWA Publishing 2003.

- Batista SM, Moretto E. Efeito da fibra da farinha da casca de banana nanica (*Musa cavendishii*) na glicemia de ratos normais e diabéticos. Dissertação submetida à aprovação pelo curso de Pós-graduação em Ciências dos Alimentos. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 1995; 15-35.
- Bedolla S., Dueñas C., Esquivel I., Favela T., Guerrero R., Mendoza E., Navarrete A., Olguín A., Ortiz J., Pacheco O., Quiroz M., Ramirez A., Trujillo M. Introducción a la Tecnología de Alimentos. 2da. Edición. 2004; 16-18.
- Beristain S.C., Palou E., Lopez A. Bacteriocinas: antimicrobianos naturales y su aplicación en los alimentos. *Temas selectos de Ingeniería de alimentos* 2012 (2) 64-78.
- Betancor L., Yim L. Salmonella y salmonelosis. Departamento de Bacteriología y Virología, Departamento de Desarrollo Biotecnológico, Facultad de Medicina, U de la R. 2012.
- Bidot A. y Muñoz R. Antecedentes históricos y el origen de las cabras. *Ciencia y Tecnología Ganadera*, 2016; (10) 25-30.
- Bidot, A. La cabra como productora de leche. *Memorias III Congreso Internacional sobre Mejoramiento Animal*, La Habana, Cuba. 2006 (b).
- Borrás, A. Cómo comer y beber leche. La Habana, Cuba: Comité Nacional Lechero. 1968.
- Bruno, M.E.C., Montville, T. Common mechanistic action of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 1993; (59) 3003-3010.
- Calder PC. N-3 polyunsaturated fatty acids and inflammation. From molecular biology to the clinics. *Lipids* 2003; (38) 52-342.
- Calixto-González R., González-Jiménez M.A., Bouchan-Valencia P., Paredes-Vivas L.Y., Vázquez-Rodríguez S. Cérbulo-Vázquez A. Importancia clínica de la leche materna y transferencia de células inmunológicas al neonato. *Medigrafic.* 2011; (25) 109-114.
- Calvo M.A., Arosemena E.L., Adelantado C., Masdeu L., Martín M.A., Ordóñez G., Ponsa F., Pontes M., Rodríguez E. Salmonella de actualidad desde siempre. 2005.
- Capdevila, F. y Martí-Henneberg, C. Trascendencia nutricional del consumo de lácteos en la dieta mediterránea actual en España. *Alim. Nutri. Salud.* 1996; (3) 9-17.
- Carr, F. J., Chill, D. y Maida, N. The lactic acid bacteria: A literatura survey. *Critical Reviews in Microbiology* 2002; (4): 281-37.
- Carrera M. Evaluación del potencial antimicrobiano de cepas ácido lácticas aisladas de diferentes muestras de leche. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, 2015.
- Chandan R.C. Enhancing market value de milk by adding cultures. *J Dairy Sci* 1999; (82) 2245-2256.
- Charles Alais. Ciencia de la leche. Ed. Reverte S.A 1985; 3-75.
- Chikindas, M.L., MJ García –Garcera, A.J.M., Driesessen, A.M., Ledebor, Nissen-Mejer, J., Nes, I.F., Abee, T., Konings, W.N., Venema, G. Pediocin PA-1, a Bacteriocin from *Pediococcus acidilactici* PAC1.0 Forms Hydrophilic Pores in the Cytoplasmic Membrane of Target Cells. *Appl.*

Environ. Microbiol. 1993. (59)3577-3584.

- Chilliard, Y. y Ferlay, A. Dietary lipids and forages interactions on cow and goat milk fatty acid composition and sensory properties. En: *Reproduction Nutrition and Development*. 2004; (44) 467-492.
- CHILLIARD, Y.A review of nutritional and physiological factors affecting goat milk lipid synthesis and lipolysis. En: *Journal of Dairy Science*. 2003; (86) 1751-1770.
- Cleveland J., Montville, T.J., Nes I.F. and Chikindas M.L. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *Int J. Food Microbiol*. 2001; (71)1-20.
- Colli C, Sardinha F, Filisetti TM. Capítulo 4: Alimentos Funcionais. En: CUPPARI, Lian. *Guias de Medicina Ambulatorial e Hospitalar. UNIFESP/Escola Paulista de Medicina. Nutrição Clínica no Adulto*. Brasil. Editora Manole Ltda, 2003.
- Coppa GV, Gabrielli O, Pierani P, Catassi C, Carlucci A, Giorgi PL. Changes in carbohydrate composition in human milk over 4 months of lactation. *Pediatrics* 1993; (3) 41- 637.
- Cotter P. D., Hill and R.P. Ross. Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nat. Rev.* 2005; (3) 777-788.
- Coussement P. A new generation of dietary fibres. *European. Dairy Magazine* 1995; (3) 22-24.
- Crago S.S, Mestecky J. Human colostral cell. *Immunol* 1984; (86) 9-222.
- Danisco Sweeteners. Ingredientes con beneficios funcionales. *Revista Enfasis Alimentación* 2006;(5).
- Davy B, Melby C. The effect of fiber-rich carbohydrates on features of Syndrome X. *J Am Diet Assoc* 2003; (1):86-96.
- De Man, J.C., Rogosa, M. and Sharpe, M.E. A Medium for the Cultivation of Lactobacilli. *J. Appl. Bacteriol.*, 1960; 23 (1): 130.
- Delves-Broughton J, P Blackburn, RJ Evans and Hugenholtz. Application of the bacteriocin nisin. *Antonie Leeuwenhoek* 1996; (69)193-202.
- Delves-Broughton J. Nisin and its use as a food preservative. *Food Technol*. 1990; (44) 100-112.
- Demmers T.A, Jones PJH, Wang Y, Krug S, Creutzinger V, Heubi J. Effects of early cholesterol intake on cholesterol biosynthesis and plasma lipids among infants until 18 months of age. *Pediatrics* 2005; (6) 601-1594.
- Dietary Reference Intakes. Proposed definition of dietary fibre. Washington, DC: National Academy Press; 2001.
- Doria, S. *Caprinocultura, cría racional de caprinos*. San Pablo, Brasil: Livraria Nobel. 1997.
- Eijsink, V.G.H., Skeie, M., Middelhoven, P.H., Brurberg, M.B., Nes, I.F. Comparative studies of class IIa bacteriocins of lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol* 1998; (6):3275-3281.
- Eknaes, Margrate. Changes in body reserves and milk quality throughout lactation in dairy goats. En: *Small Ruminant Research*. May 2006; (63) 1-11.

- Engelke G, Z Gutochowski-Eckel, M Hammelman, and KD Entian. Biosynthesis of the lantibiotic nisin: genomic organization and membrane localization of the NisB protein. *Appl. Environ. Microbiol.* 1992; (58) 3730-3743.
- Ennahar, S., Sashihara, T., Sonomoto, K., Ishizaki, A. Class IIa bacteriocins: biosynthesis, structure and activity. *FEMS Microbiol. Rev.* 2000; (24) 85–106.
- Feng P, Gao M, Holley T, Zhou T, Burgher A, Trabulsi J, y col. Aminoacid composition and protein content of mature human milk from nine countries. *FASEB J* 2009; (23) 448.
- Fundación Vasca para la seguridad Agroalimentaria. Ficha de *Staphylococcus Aureus*. 2013.
- Gálvez, A., Maqueda, M., Martínez-Bueno, M., Valdívía, E. Permeation of bacterial cells, permeation of cytoplasmic and artificial membrane vesicles, and channel formation on lipid bilayers by peptide antibiotic AS-48. *J. Bacteriol.* 1991; (173) 886-892.
- Galvez, A., Valdivia, E., Martínez-Bueno, M., Maqueda, M. Induction of autolysis in *Enterococcus faecalis* S-47 by peptide AS-48. *J Appl Bacteriol.* 1990; (69) 406–413.
- García-López R. Composición e inmunología de la leche humana. *Acta Pediatr Mex* 2011; (4):223-230
- Gill H.S. Stimulation de the Immune System by Lactic Cultures. *Int Dairy J* 1998; (5) 535-544.
- Giraffa, G; Chanishvili, N; Widyastuti, Y. Importance of Lactobacilli in food and feed biotechnology. *Research in microbiology* 2010; (6):480-487
- Goldin B.R. Health benefits de probiotics. *Br J Nutr* 1998; (80) 203–207.
- González-Martínez, B.E.; Gómez-Treviño, M.; Jiménez-Salas, Z., Bacteriocinas de probióticos. *Revista Salud Pública y Nutrición*, 2003; 4(2).
- Grande, M.; Lucas, R.; Abriouel, H.; Ben-Omar, N.; Maqueda, M.; Martínez-Bueno, M.; MartínezCañamero, M.; Valdivia, E.; Galvez, A., Control of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in fruit juices by enterocin AS-48. *International Journal of Food Microbiology*, 2005; (104) 289-297.
- Greer F.R. Vitamin K status of lactating mothers and their infants. *Acta Paediatr Suppl* 1999; 88(430):95-103.
- Guarner F. El colon como órgano: habitat de la flora bacteriana *Alimentación Nutrición y Salud* 2000; (7) 99-106.
- Haenlein, G. Goat milk in human nutrition. En: *Small Ruminant Research*. 2004; (51) 154–163.
- Hammes, W.P. and Hertel C. The genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium* prokaryotes, 3er ed. 2006; (4) 320-430.
- Hasler C.M. The changing face of functional foods. *J. Am. Coll. Nutr.* 2000; (19)499-506.
- Heine WE, Klein PD, Reeds PJ. The Importance of alpha- Lactalbumin in infant nutrition. *J Nutr* 1991; (121) 83-277.
- Hernandez C.G., Pantoja L.K., Turriago M. Evaluación de la presencia de bacteriocinas en cultivo de bacterias ácido lácticas. Universidad de la Sabana. Programa de producción agroindustrial 2002.

- Ho FCS, Wong RLC, Lawton JWM. Human colostrum and breast milk cells, a light and electron microscopic study. *Acta Paediatr* 1979; (68) 96-389.
- Holzapfel, W; Haberer, P; Geisen, R; Björkroth, J; Schillinger, U. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *American Journal of Clinical Nutrition*. 2001; 73(2):365-373.
- Jandal, J. M. Comparative Aspects of Goat and Sheep Milk. *Small Rumin Res.*, 1996; (22) 177-185.
- Jeevaratnam, K., Jamuna, M. y Bawa A.S. Biological preservation of food-bacteriocins of lactic acid bacteria. *Indian Journal of Biotechnology*. 2005; (4) 446-454.
- Jie Z, Bang-Yao L, Ming-Jie X, Hai-Wei L, Zu-Kang Z, Ting-Song W, Craig SA.. Studies on the effects of polydextrose intake on physiologic functions in Chinese people. *Am J Clin Nutr*. 2000; 72(6):9-1503.
- Joerger MC and TR Klaenhemmer TR. Cloning, expression, and nucleotide sequence of the *Lactobacillus helveticus* 481 gene encoding the bacteriocin helveticin J. *J. Bacteriol.*1990; (11) 47- 6339.
- Joerger MC and TR Klaenhemmer. Characterization and purification of helveticin J and evidence for a chromosomally determined bacteriocin produced by *Lactobacillus helveticus* 481. *J. Bacteriol*. 1986; (2) 439-446.
- Kailasapathy K., Chin J. Survival and therapeutic potential de probiotic organisms with reference to *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. *Immunol Cell Biol*. 2000; (78) 80-88.
- Khanal R. C. y Olson K. C. Factors Affecting Conjugated Linoleic Acid (CLA) Content in Milk, Meat, and Egg: A Review. En: *Journal of Nutrition*. 2004; (3) 82-98.
- Köhler Osmari, E. Produção e Qualidade do Leite em Cabras boerSaanen, em Lactação, Suplementadas com Diferentes Volumosos. Dissertação apresentada, como parte das exigências para obtenção do título de mestre em Zootecnia. Universidade Estadual de Maringá. Centro de ciências agrárias. 2007.
- Kok, J., Holo, H., Van Belkum, M.J., Haandrikman, A.J., Nes, I.F. Non-nisin bacteriocins in lactococci: biochemistry, genetics and mode of action. In: *Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria* (Hoover, D. and Steenson, L., Eds.), Academic Press, New York, NY, 1993; 121-150.
- Kolida S, Tuohy K, Gibson G. Prebiotic effects of Inulin and Oligofructosa. *Br J Nutr*. 2002; (87) 193-197.
- Korhonen H, Pihlanto A. Food-derived bioactive peptides – opportunities for designing Future Foods. *Curr Pharmac Des* 2003; (9)1297-1308.
- Kunz C, Rudloff S, Baier W, Klein N, Strobel S. Oligosaccharides in human milk: structural, functional, and metabolic aspects. *Annu Rev Nutr* 2000; (20) 699-722.
- Lawrence RA, Lawrence RM. Bioquímica de la leche humana. En: Lawrence RA, Lawrence RM. *Lactancia Materna. Una guía para la profesión médica*. 6ª ed. Madrid, España: Elsevier España; 2007; 76-111.
- Leer, R.J., van der Vossen, J.M.B.M., van Giezen, M., van Noort, J.M., Pouwels, P.H. Genetic analysis of acidocin B, a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. *Microbiol.*1995; (141) 35-1629.

- Lerche M. Inspección veterinaria de la leche. Ed Acribia; Zaragoza España, 1969; 150-188.
- Li H and DJ O'Sullivan. Heterologous expression of the *Lactococcus lactis* Bacteriocin, Nisin, in a dairy Enterococcus strain. Appl. Environ. Microbiol 2002; (68) 3392-3400.
- Lönnerdal B, Kelleher S.L. Micronutrient transfer: infant absorption. Adv Exp Med Biol 2009; (639) 29-40.
- Lönnerdal B, Lien EL. Nutritional and physiologic significance of alpha Lactalbumin in infants. Nutrition Review 2003; (9) 295-305.
- Lönnerdal B. Bioactive proteins in human milk: mechanisms of action. J Pediatr 2010; (156): 26-30.
- Lönnerdal B. Nutritional and physiologic significance of human milk proteins. Am J Clin Nutr 2003; (6) 43-1537.
- López Alvarez M.J. Proteins in human milk. Breastfeed Rev 2007; 15(1):5-16.
- López Alvarez MJ. Proteins in human milk. Breastfeed Rev 2007; 15(1):5-16.
- Marcos, E., Castillo, F.A., Dimitrov., S.T., Gombossy de Melo, B.D., De Souza, R.P. Novel biotechnological applications of bacteriocins; A review Food Control. 2013; (32)134-142.
- Marteau P, M. Vrese, CJ Cellier and J. Schrezenmeir 2001. Protection from gastrointestinal diseases with the use of probiotics Am J Clin Nut 2001; (73) 430-436.
- Moll, G.N., Konings, W.N., Driessen, A.J.M. Bacteriocins: mechanism of membrane insertion and pore formation. Antonie Van Leeuwenhoek 1999; (76)185-98.
- Montani M. Capturar la oportunidad en Alimentos Funcionales. Orafiti Latinoamérica. Revista Énfasis Alimentación 2005; (2) 78-82.
- Montville, T.J. Chen, Y. Mechanistic action of pediocin and nisin: recent progress and unresolved questions Appl. Microbiol. Biotechnol. 1998; (50) 511-519.
- Montville, T.J., Wikowski, K., Chikindas, M.L. Biologically based preservation system: In: Food microbiology: Fundamentals and Frontiers. 2a Ed. Doyle, Buechart and Montville (Eds). AMS Press, Washington, D.C.2001.
- Morais J. Estudio de adecuación de cepas lácticas autóctonas aisladas de leche cruda de Ovejas Guirra para la elaboración de Queso. Universidad Autónoma de Barcelona. 2004.
- Mulvenna, J.P., Wang, C., Craik, D.J. CyBase: a database of cyclic protein sequence and structure. Nucleic Acids Research, 2006, Vol. 34, Database issue.2006; 192-194.
- Nes, I.F., Yoon, S-S. Y Diep D.B. Ribosomally synthesized antimicrobial peptides (bacteriocinas) in lactic acid bacteria: a review. Food Science Biotechnology. 2007; (5): 657-690.
- Ortega, G.; Raz, I.; Magaña, H.; Ortiz, J.; Sierra, S.; Centurión, F. Interacción genotipo x ambiente en cabras lecheras. Bioagrociencias, 2011; (4), 32-40.
- Ottogalli, G. y Testolin, G. Dairy Products. En G. A. Spillered, A.V. y Van Nostrand. The Mediterranean Diet in Health and Disease Nueva York:



Botanical Garden Press.1991; 135-139.

- Palou A y F. Serra. Perspectivas europeas sobre alimentos funcionales. Alimentación, Nutrición y Salud. 2000; 7 (3): 76-90.
- Palou A. and F. Serra. Perspectivas europeas sobre los alimentos funcionales. Alimentación Nutrición y Salud 2000; 7 (3): 76-90.
- Park, Y. W. Goat milk—chemistry and nutrition. En: Park Y.W, Haenlein G.F.W. Handbook of Milk of Non-bovine Mammals. Blackwell Publishing Professional, Oxford, UK/Ames, Iowa, 2006; 34–58.
- Park, Y. W. Phisico-Chemical characteristics of goat and sheep milk. En: Small Ruminant Research. 2007; (68) 88-113.
- Parodi, P. W. Cows' milk fat components as potential anticarcinogenic agents. En: Journal of Nutrition. 1997; (127) 1055-1060.
- Pedrique de Aulacio, M. Microbiología. Manual de Métodos Generales. Segunda edición. Facultad de Farmacia. Universidad Central de Venezuela. 1992
- Prandini, A. Different level of conjugated linoleic acid (CLA) in dairy products from Italy. En: Journal of Food Composition and Analysis. 2007; (20) 472–479.
- Pumarola A., Rodriguez A., Torres J.A., García Rodriguez G., Piedrola Angulo. Microbiología y parasitología médica. 1987; (2) 66-68.
- Rao A.V. Dose-response effects of inulin and oligofructose on intestinal bifidogenesis effects. J Nutr. 1999; (129) 1442-1445.
- Reyes H., Martínez A. Lactancia humana. Bases para lograr su éxito. México: Ed. Médica Panamericana; 2011; 90.
- Reyes Vázquez H. Características de la leche materna. En: Reyes Vázquez H, Martínez González A. Lactancia Humana. Bases para lograr su éxito. 1ª ed. México: Editorial Médica Panamericana; 2011; 6- 80.
- Roberfroid M.B. Concepts and strategy of functional food science: the European perspective. Am. J. Clin. Nutr. 71(6); 2000; 1669-1664.
- Roberfroid MB. Introducing inulin-type fructans. Br J Nutr. 2005; (93) 13-25.
- Roger Y. Stanier. Microbiología 1992; 531-536.
- Rojas Hidalgo E: La fibra dietética. Rojas Hidalgo E, editor. Los carbohidratos en nutrición humana. Madrid. Aula Médica, 1994; 121-137.
- Ross, R.P., Galvin, M., McAuliffe, O., Morgan, S.M., Ryan, M.P., Twomey, D.P., Meaney, W.J., Hill, C. 1999. Developing applications for lactococcal bacteriocins. Antonie van Leeuwenhoek 1999 (76) 46-337.
- Ruiz-Larrea, F., Rojo-Bezares, B., Sáenz, Y., Navarro, L., Díez, L., Zarazaga, M., Torres, C. Bacteriocins para la estabilización microbiológica y reducción de la dosis SO2. International Symposium Microbiology and Foods safety of wine. Microsafetywinell. Vilafranca del penedés, Spain. 2007; 21-23.
- Saavedra J.M. Clinical applications of probiotic agents Am J Clin Nut 2001; (73) 1147-1151.
- Sablon, E., Contreras, B., Vandamme, E. Antimicrobial peptides of Lactic Acid Bacteria: Mode of Action, Genetic and Biosynthesis. In Advances in




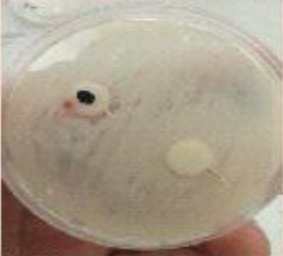

Biochemical Engineering/Biotechnology. Springer–Verlag 2000.

- Saini, A. L.; Gili, R. S. Goat Milk: An Attractive Alternative. *Indian Dairyman*, 1991; (42) 562-564.
- Sánchez Rodríguez J., Serrano S., Marfil R., Jodral M.L. Patógenos emergentes en la línea de sacrificio de porcino. *Fundamentos de seguridad alimentaria*. 2009; 50-86.
- Sanders M.E. 2000. Considerations for Use of probiotic bacteria to modulate human health *J. Nut* . 2000; (130) 384-390.
- Sanders ME, in't Veld JH. Bringing a probiotic-containing functional food in the market: microbiological, product, regulatory and labeling issues. *Antonie Van Leeuwenhoek* 1999; (76) 293-315.
- Schillinger, U., Geisen, R., Holzapfel, W.H. Potential of antagonistic microorganisms and bacteriocins for the biological preservation of food. *Trends Food Sci Technol*. 1996; (7) 158–164.
- Schrezenmeir, J. and M. Vrese. Probiotics, prebiotics, and symbiotic—approaching a definition. *Am J Clin Nut*. 2001; (73) 361-364.
- Silanikove, M., Recent advances in exploiting goat's milk: Quality, safety and production aspects. En: *Small Ruminant Research*. 2010. (89)110-124.
- Silvia G, Bogart E. Clínicas de lactancia en hospitales infantiles y generales. *Lineamiento Técnico. Secretaría de Salud, Edit: Centro Nacional de Equidad de Género y Salud Reproductiva* 2006; 84.
- Smith J y Charter E. *Functional food product Development*. Wiley Canada. 2011; 10-30.
- Steijns J.M. Dairy products and health: Focus on their constituents or on the matrix? *Int Dairy J* 2008; (18)425–435.
- Stoyanova, L.G., Ustyugova, E.A. y Netrusov, A.I. Antibacterial metabolites of lactic acid bacteria: their diversity and properties. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2012; 48 (3): 229-243.
- Suzuki, M., Yamamoto, Y. Kawai, T., Inoue, N., Yamazaki, K. Mode of action of piscicocin CS526 produced by *Carnobacterium piscicola* CS526. *J. Appl. Microbiol*. 2005; (5): 1146.
- Taylor S.N, Wagner C.L, Hollis B.W. Vitamin D. supplementation during lactation to support infant and mother. *J Am Coll Nutr* 2008; 27(6):690-701.
- Van Loo J, Coussement P, De Leenheer L, Hoebregs H, Smits G. On the presence of inulin and oligofructose as natural ingredients in the Western Diet. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 1995; (6) 525-552.
- Vaughan EE, Mollet B. Probiotics in the new millennium. *Nahrung* 1999;(43)148-153.
- Vázquez, S.M., Suárez, H. y Zapata, S. Utilización de sustancias antimicrobianas producidas por bacterias ácido Lácticas en la conservación de la carne. *Revista Chilena de Nutrición*. 2009; 36(1): 64-71.
- Venema K, J Kok, JD Marugg, MY Toonen, AM Ledebøer, Venema G, Chikindas ML. Functional analysis of the pediocin operon of *Pediococcus acidilactici* PAC1.0: Ped B is the immunity protein and PedD is the precursor processing enzyme. *Mol. Microbiol*. 1995; (17) 515-522.

- Worobo RW, MJ Van Belkum, M Sailer, KL Roy, JC Vederas and ME Stiles. A signal peptide secretion-depend bacteriocin from *Caernobacterium divergens*. J. Bacteriol.1995; (11) 3143-3149.
- Worobo, R.W., Henkel, T., Sailer, M., Roy, K.L., Vederas, J.C., Stiles, M.E. Characteristics and genetic determinant of a hydrophobic peptide bacteriocin, carnobacteriocin A, produced by Carnobacterium piscicola LV 17A. Microbiol. 1994; (140)517-26.
- Yang, R., Ray, B. Factors influencing production of bacteriocins by lactic acid bacteria. Food Microbiol. 1994; (11) 91-281.
- Yang, R., Ray, B. Prevalence and biological control of bacteriocin-producing psychrotrophic leuconostocs associated with spoilage of vaccum-packaged process meats. J. Food Prot. 1994; (57) 209-217.
- Yousef AE, JB Luchansky, AJ Degnan and MP Doyle. Behavior of Lysteria monocytogenes in wiener exudades in the presence of *Pediococcus acidilactici* H or pediocin AcH during storage at 4 or 25oC. Appl. Environ. Microbiol. 1991; (57) 1461-1467.
- Ziemmer C.J, Gibson G.R. An overview de probiotics, prebiotics and symbiotics in the functional food concept: Perspectives and future strategies. Int Dairy J 1998; 8(6):473-479







9. Anexo 1

Tabla 14. Halos de inhibición de *E. Coli* a Temperatura Ambiente a las 48 horas.

PROBIÓTICO	HALO DE INHIBICIÓN
BD	
XE	
LC2	
LC1	
BS1	


10. Anexo 2

Tabla 15. Halos de inhibición de *S. Aureus* a Temperatura Ambiente a las 48 horas.

PROBIÓTICO		HALO DE INHIBICIÓN	
<b>BD</b>			
<b>XE</b>			
<b>LC2</b>			
<b>LC1</b>			
<b>BS1</b>			
<b>BAA</b>			

11. Anexo 3.

Tabla 16. Halos de inhibición de *K. Pneumoniae* a Temperatura Ambiente a las 48 horas.

PROBIOTICO		HALO DE INHIBICION	
<b>BD</b>			
<b>XE</b>			
<b>LC2</b>			
<b>LC1</b>			
<b>BS1</b>			
<b>BAA</b>			