



00528  
80

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**CARACTERIZACIÓN DE UN CULTIVO MIXTO EMPLEADO  
EN LA ELABORACIÓN DE UNA LECHE FERMENTADA  
CON PROPIEDADES PROBIÓTICAS**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICA DE ALIMENTOS**

**PRESENTA**

**VERÓNICA RODRÍGUEZ DE SAN MIGUEL ARÉVALO**



**EXAMENES PROFESIONALES  
FACULTAD DE QUÍMICA**

**MÉXICO, D. F.**

**2003**

A





Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

# **PAGINACION DISCONTINUA**

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**CARACTERIZACIÓN DE UN CULTIVO MIXTO EMPLEADO  
EN LA ELABORACIÓN DE UNA LECHE FERMENTADA  
CON PROPIEDADES PROBIÓTICAS**

**TESIS  
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICA DE ALIMENTOS  
PRESENTA**

**VERÓNICA RODRÍGUEZ DE SAN MIGUEL ARÉVALO**

**MEXICO, D.F.**

**2003**

## **JURADO ASIGNADO:**

<b>Presidente</b>	<b>María del Carmen Wachter Rodarte</b>
<b>Vocal</b>	<b>José Mariano García Garibay</b>
<b>Secretario</b>	<b>Rina María González Cervantes</b>
<b>1er Suplente</b>	<b>Francisco Ruiz Terán</b>
<b>2do Suplente</b>	<b>Laura Patricia Pérez Cacep</b>

## **SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:**

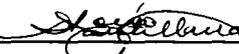
**Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco,  
Departamento de Sistemas Biológicos, Laboratorio de Biotecnología.**

**ASESOR DEL TEMA:**



**M. en B. Rina María González Cervantes**

**ASESOR TECNICO:**



**M. en C. Rocío Santillana Hinojosa**

**SUSTENTANTE:**



**Verónica Rodríguez de San Miguel Arévalo.**

**Dedico este trabajo:**

**A mis papas**

**A mis hermanos**

**A toda mi familia**

**Gracias por su amor, comprensión y apoyo.**

## AGRADECIMIENTOS

A la M.B. Rina Ma. González por su apoyo, paciencia y conocimientos aportados durante la realización de la tesis. Gracias Rina.

A la M.C. Rocío Santillana por su apoyo, asesoría y consejo durante la realización de la tesis.

A la Dra. Ma. del Carmen Wachter, por su tiempo y recomendaciones durante la revisión de éste trabajo. Así como su apoyo y confianza durante mi paso por la facultad.

Al Dr. Mariano García-Garibay por su tiempo, sus observaciones y recomendaciones durante la revisión de éste trabajo.

Al Dr. Francisco Ruiz Terán por su tiempo y comentarios acerca de este trabajo.

A Acacia Ramírez del laboratorio de lácteos de la UAM-Xochimilco, por su paciencia y permitirme el uso del Milko-scan.

A Agustín Reyó del laboratorio 4-A, por su facilitarme el equipo de cromatografía de líquidos de alta presión y por su asesoría.

A la Dra. Amelia Farrés, del laboratorio 312, por la cepa 2772 de *Lactobacillus delbrückii ssp. bulgaricus*.

A Gloria y Alicia, gracias por su amistad.

A mis amigas, por su amistad y constante apoyo durante todos estos años, así como a sus familias. Gracias por los empujones que tanto me ayudaron.

A todas esas personas que conocí a lo largo de la carrera y a la gente que conocí durante la realización de esta tesis, que me brindaron su apoyo y amistad.

Gracias a mi primo Lalo y a Flor, por su apoyo y el tiempo que me dedicaron para poder salir adelante.

A mis familiares, que siempre me han apoyado y con quienes puedo contar.

Y por último, GRACIAS a mi FAMILIA. Gracias papá y mamá por su apoyo, paciencia y comprensión durante estos años. Gracias a mis hermanos, Lety y Beto, por ser como son.

## INDICE

<b>Resumen</b>	1
<b>1. Introducción</b>	2
<b>2. Objetivos</b>	4
<b>3. Antecedentes</b>	5
<b>3.1 Probióticos</b>	5
3.1.1 Función de los microorganismos probióticos en el organismo	6
<b>3.2 Bacterias Acido Lácticas</b>	11
3.2.1 Metabolismo de las bacterias ácido lácticas	12
<b>3.3 Género <i>Bifidobacterium</i></b>	16
<b>3.4 Leches fermentadas</b>	19
3.4.1 Importancia de las leches fermentadas	20
3.4.2 Leches fermentadas con propiedades terapéuticas	22
3.4.3 Interacción entre las cepas de <i>Streptococcus thermophilus</i> y <i>Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus</i>	23
3.4.4 Fermentaciones de <i>Bifidobacterium lactis</i> en leche	24
3.4.5 Fermentaciones de <i>Lactobacillus acidophilus</i> en leche	25
<b>3.5 Medios de cultivo diferenciales y selectivos</b>	27
<b>4. Materiales y Métodos</b>	30
<b>4.1 Microorganismos</b>	30
<b>4.2 Medios de cultivo</b>	30
4.2.1 Cuenta de microorganismos por gramo de cultivo ABY-1, YC-380, La-5 y Bb-12	31
<b>4.3 Fermentaciones</b>	32
4.3.1 Base láctea	32
4.3.2 Fermentación de la base láctea con los cultivos ABY-1, La-5 Bb-12 y YC-380	32
4.3.3 Fermentación del cultivo La-5 y fermentación del cultivo Bb-12	

en aerobiosis, 24 horas	33
4.3.4 Fermentación del cultivo La-5 y fermentación del cultivo Bb-12	
en anaerobiosis, 24 horas	33
<b>4.4 Métodos analíticos</b>	<b>34</b>
4.4.1 Cuanta viable	34
4.4.2 Medición de pH	34
4.4.3 Acidez titulable	35
4.4.4 Concentración de proteínas	35
4.4.5 Determinación de ácidos y azúcares por HPLC	36
<b>5. Resultados y Discusión</b>	<b>37</b>
5.1 Medios de cultivo	37
5.2 Fermentaciones	49
5.2.1 Fermentación del cultivo mixto YC-380	49
5.2.2 Fermentación del cultivo mixto ABY-1	55
5.2.3 Comparación de las fermentaciones por los cultivos ABY-1 y YC-380	62
5.2.4 Fermentación del cultivo Bb-12	66
5.2.5 Fermentación del cultivo La-5	73
<b>6. Conclusiones</b>	<b>80</b>
<b>7. Recomendaciones</b>	<b>82</b>
<b>8. Apéndices</b>	<b>83</b>
I. Preparación de los medios de cultivo	83
II. Determinación de acidez titulable y °Dornic	85
III. Curvas de calibración de estándares para HPLC	86
IV. Corrección de la curva de calibración para determinar proteínas con elMilko-Scan	88
<b>9. Bibliografía</b>	<b>90</b>

## INDICE DE FIGURAS

Figura	Título	Página
3.2.1	Metabolismo y transporte de azúcares de las bacterias ácido lácticas	13
3.2.2	Metabolismo de azúcares de <i>Bifidobacterium</i>	17
5.1.1	Colonias de <i>S. thermophilus</i> en el medio M17 a 37 °C	40
5.1.2	Colonias características de <i>B. lactis</i> en el medio MRS a 37 °C	40
5.1.3	Colonias de <i>L. acidophilus</i> en el medio MRS a 37 °C	40
5.1.4	Colonias de <i>L. acidophilus</i> y <i>B. lactis</i> en el medio MRS mod a 37 °C	40
5.1.5	Morfología de las colonias de <i>B. lactis</i> y <i>L. bulgaricus</i> en agar MRS pH 5.2 a 37 °C	42
5.1.6	Colonias de <i>L. bulgaricus</i> y <i>B. lactis</i> en MRS mod a 45 °C	43
5.1.7	Colonias de <i>B. lactis</i> , <i>L. bulgaricus</i> y <i>L. acidophilus</i> en MRS pH 5.2 a 45 °C	43
5.1.8	Colonias de <i>B. lactis</i> , <i>L. bulgaricus</i> y <i>L. acidophilus</i> en MRS pH 5.2 a 37 °C	43
5.1.9	Colonias de <i>L. bulgaricus</i> en el medio MRS-NNL a 45 °C	43
5.2.1.1	Cambio de pH y acidez durante la fermentación por el cultivo YC-380	49
5.2.1.2	Crecimiento de los microorganismos presentes en el cultivo YC-380	50
5.2.1.3	Concentración de azúcares durante la fermentación por el cultivo YC-380	53
5.2.1.4	Producción de ácido láctico durante la fermentación por el cultivo YC-380	55
5.2.2.1	Cambio de pH y acidez durante la fermentación por el cultivo ABY-1	56

5.2.2.2 Crecimiento de los microorganismos presentes en el cultivo ABY-1_____	58
5.2.2.3 Concentración de azúcares durante la fermentación por el cultivo ABY-1_____	60
5.2.2.4 Producción de ácido láctico durante la fermentación por el cultivo ABY-1_____	61
5.2.3.1 Descenso de pH y cambio en la acidez durante las fermentaciones por los cultivos ABY-1 y YC-380_____	62
5.2.3.2 Crecimiento de <i>S. thermophilus</i> durante las fermentaciones por los cultivos ABY-1 y YC-380_____	63
5.2.3.3 Crecimiento de <i>L. bulgaricus</i> durante las fermentaciones por los cultivos ABY-1 y YC-380_____	63
5.2.3.4 Consumo de lactosa y producción de galactosa durante las fermentaciones con los cultivos ABY-1 y YC-380_____	65
5.2.3.5 Producción de ácido láctico durante las fermentaciones con los cultivos ABY-1 y YC-380_____	65
5.2.4.1 Cambio de pH y acidez durante la fermentación por el cultivo Bb-12 y la fermentación por el cultivo ABY-1_____	67
5.2.4.2 Crecimiento de <i>B. lactis</i> durante la fermentación por el cultivo Bb-12 y la fermentación por el cultivo ABY-1_____	67
5.2.4.3 Consumo de lactosa y producción de galactosa durante las fermentaciones con los cultivos Bb-12 y ABY-1_____	71
5.2.4.4 Producción de ácido láctico durante la fermentación con el cultivo Bb-12 y durante la fermentación con el cultivo ABY-1_____	72
5.2.4.5 Producción de ácido acético durante la fermentación con el cultivo Bb-12 y durante la fermentación con por el cultivo ABY-1_____	73
5.2.5.1 Cambio de pH y acidez durante la fermentación por el cultivo La-5 y la fermentación por el cultivo ABY-1_____	74
5.2.5.2 Crecimiento de <i>L. acidophilus</i> durante la fermentación por el cultivo La-5 y la fermentación por el cultivo ABY-1_____	75

5.2.5.3 Consumo de lactosa y producción de galactosa durante las fermentaciones con los cultivos La-5 y ABY-1\_\_\_\_\_77

5.2.5.4 Producción de ácido láctico durante la fermentación con el cultivo La-5 y durante la fermentación con el cultivo ABY-1\_\_\_\_\_78

## INDICE DE TABLAS

Tabla	Nombre	Página
3.4	Composición de la leche_____	21
4.1	Cultivos en polvo empleados en las fermentaciones_____	30
4.2	Medios de cultivo probados para la diferenciación y/o selección de los microorganismos_____	31
5.1.1	Medios y condiciones de diferenciación y/o selectividad_____	37
5.1.2	Cuenta de <i>L. acidophilus</i> por gramo de cultivo La-5 y ABY-1_____	45
5.1.3	Cuenta de <i>B. lactis</i> por gramo de cultivo Bb-12 y ABY-1_____	46
5.1.4	Cuenta de <i>L. bulgaricus</i> por gramo de cultivo ABY-1 y YC-380_____	47
5.2.1	Concentración de proteína durante la fermentación por el cultivo YC-380_____	51
5.2.2	Concentración de proteína durante la fermentación por el cultivo ABY-1_____	59
5.2.3	Incremento en la concentración de proteína durante la fermentación por los cultivos ABY-1 y YC-380_____	64
5.2.4	Concentración de proteína durante la fermentación por los cultivos ABY-1 y Bb-12_____	68

## RESUMEN

Se evaluó el comportamiento, a lo largo de la fermentación en una base láctea, de los microorganismos probióticos *Bifidobacterium lactis* y *Lactobacillus acidophilus* presentes en un cultivo mixto comercial (ABY-1), el cual también contiene los microorganismos nativos del yogurt *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*. El objetivo principal fue determinar si existe algún efecto benéfico o no por parte de los microorganismos del yogurt sobre la viabilidad de *B. lactis* y *L. acidophilus*, y asegurar la sobrevivencia requerida de los probióticos ( $10^6$ - $10^9$  UFC/ml) para cumplir con dicha función.

Se probaron diversos medios de cultivo para realizar una cuenta diferencial o selectiva de los diversos microorganismos presentes en el cultivo mixto. El mejor medio y condiciones para la diferenciación de los lactobacilos y la bifidobacteria fue MRS pH 5.2 en anaerobiosis a 37 °C a las 96 horas, para *S. thermophilus* el medio más adecuado fue el M17 en aerobiosis a 37 °C a las 24 horas.

La fermentación del cultivo mixto se llevó a cabo durante 5 horas a 43°C, tiempo en el cual la acidez alcanzó los 60 °D que requiere el producto. En cuanto a la viabilidad, se encontró que para los microorganismos probióticos presentes en el cultivo mixto fue ligeramente mayor que en las fermentaciones individuales: de 0.28 y 0.25 log UFC respectivamente para *B. lactis*, y de 0.82 y 0.44 respectivamente para *L. acidophilus*. Estos microorganismos no contribuyen en la acidificación del producto de manera significativa, su desarrollo durante ese periodo de fermentación es escaso, pero mantiene su viabilidad en una concentración de células viables suficiente para cumplir con la actividad probiótica, del orden de  $10^7$  para ambos microorganismos. Por lo anterior y en base a la información bibliográfica (Abu-Tarbush y col. 1998, Dave y Shah 1998, Gomes y Malcata 1998, Gomes y col. 1998) se cree que existe un ligero efecto benéfico debido a los productos de la fermentación de los microorganismos nativos del yogurt, tales como los productos de hidrólisis de proteínas y formación de CO<sub>2</sub>.

## 1. INTRODUCCIÓN

Los alimentos fermentados son conocidos desde la antigüedad y desde entonces la fermentación es empleada como un método de conservación de alimentos. La fermentación se lleva a cabo a partir del consumo de los azúcares presentes en el alimento, los cuales por medio de una transformación bioquímica por enzimas microbianas son transformados en otros compuestos y dependiendo del tipo de fermentación que se lleve a cabo (alcohólica, cítrica, láctica, acética o maloláctica), el producto adquiere nuevas características (Braverman, 1980).

Entre los diversos tipos de alimentos fermentados existentes se encuentran los leches fermentadas, que se elaboran principalmente con bacterias lácticas y en algunos casos levaduras (García-Garibay y col. 1993). El efecto como conservador de la fermentación por bacterias lácticas se debe a que disminuye el pH del alimento como consecuencia de la transformación de carbohidratos (hexosas y pentosas) en ácido láctico principalmente, lo cual impide el desarrollo de organismos contaminantes. Algunos de los microorganismos empleados para la elaboración de leches fermentadas como *Lactobacillus acidophilus* y *Bifidobacterium lactis* son considerados como probióticos. Los probióticos se pueden definir como microorganismos vivos los cuales al ser introducidos en un animal o al hombre afectan benéficamente al huésped mejorando las propiedades de la flora microbiana nativa (Hozapfel y col. 1998). Las funciones que ejercen son principalmente en el intestino, presentando acción antimicrobiana, colaborando en la síntesis de vitamina B y mejorando la digestión.

Por otro lado, actualmente en la industria para llevar a cabo fermentaciones en las cuales se desean obtener productos de buena calidad sanitaria y que sean homogéneos, se emplean cultivos "starter" o iniciadores; al ser cultivos puros libres de patógenos aseguran la viabilidad, eficacia y vida útil de los

microorganismos, además son difícilmente invadidos por bacteriófagos. Para la elaboración de leches fermentadas como el yogurt se emplean comúnmente cultivos iniciadores de *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus*, añadiendo en algunos casos microorganismos probióticos como *Lactobacillus acidophilus* y *Bifidobacterium* (Ballongue 1993). Sin embargo, cuando se llevan a cabo fermentaciones a partir de cultivos mixtos, las bacterias pueden perder su viabilidad por diferentes razones. Una de ellas sería que la velocidad de crecimiento de cada una de las cepas involucradas es diferente, esta situación provoca que se presenten cambios en el medio que pueden favorecer a unos microorganismos, pero perjudicar a otros. Tales cambios serían la presión de oxígeno, la presión osmótica, disponibilidad de nutrimentos y la acidez. Por lo anterior es necesario asegurar que un alimento funcional cumpla con la actividad probiótica que supuestamente posee, por lo que se recomienda que contenga una cuenta mínima de  $10^6$  a  $10^9$  células viables de microorganismos probióticos por gramo (Varnam y Sutherland 1995, Lee y Wong 1993).

Debido a todo esto es importante realizar formulaciones de productos fermentados lácteos en las que se asegure la viabilidad de los microorganismos probióticos y que cumplan con características finales sensoriales que sean aceptadas por el consumidor. En el presente trabajo se pretende conocer a lo largo de una fermentación mixta el efecto de los microorganismos propios del yogurt sobre los valores de viabilidad de dos cepas consideradas probióticas. Tomando en cuenta las consideraciones anteriores en este trabajo se planteó como objetivo caracterizar el cultivo mixto comercial ABY-1 que contiene los microorganismos *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus* y *Bifidobacterium lactis*.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo General

Caracterizar el cultivo mixto comercial ABY-1, el cual es empleado para la elaboración de leches fermentadas, y contiene las siguientes cepas: *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, y los probióticos *Lactobacillus acidophilus* y *Bifidobacterium lactis*.

### 2.2 Objetivos específicos

- ✓ Determinar el medio de cultivo diferencial o selectivo para realizar la cuenta de los microorganismos *L. delbrueckii ssp. bulgaricus*, *L. acidophilus*, *S. thermophilus* y *B. lactis*.
- ✓ Caracterizar la fermentación del cultivo mixto ABY-1 a través del monitoreo de la viabilidad de cada una de las cepas, la acidez y el consumo de lactosa a lo largo de la fermentación.
- ✓ Evaluar el impacto de *S. thermophilus* y *L. delbrueckii ssp. bulgaricus* sobre el crecimiento de las cepas probióticas a lo largo de la fermentación.
- ✓ Evaluar el cultivo mixto como vehículo de los microorganismos probióticos, determinando si cumplen con la viabilidad mínima requerida para ejercer dicha función al final de la fermentación.

### **3. ANTECEDENTES**

#### **3.1 Probióticos**

Los probióticos son suplementos en los alimentos de microorganismos vivos que benefician la salud de los consumidores manteniendo el balance microbiológico intestinal (Saarela y col. 2000). Algunos géneros como *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus* y *Streptococcus* constituyen un grupo de bacterias lácticas que se consideran como probióticos. En los últimos años se ha recurrido principalmente a *Lactobacillus casei*, *L. acidophilus*, *Bifidobacterium longum* y *B. bifidum* como microorganismos probióticos en los productos lácteos como yogurt y leches fermentadas (Cichoke, 1997, Saarela y col. 2000).

Para que un microorganismo se pueda considerar como probiótico debe cumplir con las siguientes propiedades tecnológicas, funcionales y aspectos de seguridad (Saarela y col. 2000):

##### ***Aspectos tecnológicos***

- Buenas propiedades sensoriales.
- Resistencia a fagos.
- Viabilidad durante el procesamiento.
- Estabilidad en el producto durante el almacenamiento.

##### ***Aspectos funcionales***

- Tolerancia al ácido de jugo gástrico humano.
- Tolerancia a la bilis.
- Adhesión a las superficies epiteliales y supervivencia en el tracto gastrointestinal del hombre.

- Inmunoestimulación, pero no efectos proinflamatorios.
- Actividad antagónica contra patógenos como *Helicobacter pylori*, *Salmonella sp.*, *Listeria monocytogenes* y *Clostridium difficile*.
- Propiedades antimutagénicas y anticarcinogénicas.

### **Aspectos de seguridad**

- Deben ser preferentemente de origen humano.
- Deben ser aislados del tracto intestinal humano sano.
- Deben tener un historial de no patogénicos.
- No deben tener relación con enfermedades como endocarditis infectiva o desórdenes en el tracto gastrointestinal.
- No deben desconjugar las sales biliares.
- No deben portar genes de resistencia a antibióticos.

Con respecto a los aspectos funcionales y de seguridad, las bacterias que conforman la microflora del intestino son bifidobacteria, lactobacilos y enterococos. Las bifidobacterias presentes en el intestino delgado y grueso son *B. bifidum*, *B. infantis*, *B. breve*, *B. adolescentis* y *B. longum*. El lactobacilo más común es *L. acidophilus* que habita en el intestino delgado, además de estos también se encuentran *L. salivarius*, *L. fermentum*, *L. casei*, *L. plantarum*, *L. breve* y *L. buchneri*. (Nakazama y Hasano, 1998).

### **3.1.1 Función de los microorganismos probióticos en el organismo**

#### *Adhesión al intestino y supervivencia.*

Los microorganismos probióticos son nativos de la flora intestinal y se obtienen a través de la madre durante el nacimiento y su implantación en el intestino se

promueve por la leche materna, hay otros que se obtienen por medio de los alimentos fermentados o suplementos en forma liofilizada.

Entre los microorganismos empleados para las leches fermentadas se encuentran *L. acidophilus* y *B. lactis*. Las cepas de *L. acidophilus* fueron aisladas originalmente de heces humanas, son relativamente insensibles a los ácidos biliares y se cree que sobreviven en grandes cantidades durante la digestión gastrointestinal por su buena adhesión al intestino (Hozapfel y col. 1998). Al contrario, *L. delbrueckii ssp. bulgaricus* y *S. thermophilus* no se establecen en el tracto intestinal por sí mismos, pero pueden sobrevivir en el intestino delgado y el colon después de 3 horas de haber sido ingeridas en yogurt o con la administración continua; además son sensibles a la destrucción por sales biliares. (Nakazama y Hasano 1998.).

Con respecto a las bifidobacterias, también se sabe que son resistentes o tolerantes al ácido y pueden sobrevivir a la acidez del ácido del jugo gástrico y pasar al intestino delgado (Kim 1988).

Por otro lado Ouwehand y col. (1999), probaron en un grupo de gente el efecto de la edad de los individuos sobre la adhesión de *Bifidobacterium* en el mucus del intestino, para lo que emplearon diferentes cepas de bifidobacteria, *B. lactis* Bb-12, B. 420, B. 913, B.BF1100. Encontraron que el número de bifidobacterias en heces y contenido intestinal reducen con el aumento en la edad del sujeto, aunque en el caso de *B. lactis* no hay mucha variación entre la adhesión de este microorganismo a el mucus de un recién nacido y un adulto, y como en los demás casos es muy baja la adhesión en el mucus de ancianos.

#### *Exclusión de microorganismos patógenos*

Los microorganismos benéficos limitan la proliferación de microorganismos patógenos por exclusión competitiva en el tracto gastrointestinal.

Se han realizado varios estudios referentes a la actividad de *L. acidophilus* contra microorganismos patógenos. Gilliland (1989) hizo una revisión de algunos de estos trabajos donde las diversas pruebas en que se consume este microorganismo en forma de tabletas o en algún producto lácteo, se comprobó que existe una acción inhibitoria sobre el crecimiento de *Staphylococcus aureus*, *Salmonell. typhimurium* y *Escherichia coli enteropatogénico* en el intestino.

Se sabe que *L. acidophilus* produce varias sustancias antibióticas como acidolina, acidofilina y lactocidina. Además se han reportado la existencia de dos sustancias inhibitorias producidas por este microorganismo que actúan en contra de organismos gram positivo y gram negativo, una es una proteína con peso molecular de 5.4 kDa y la otra es una enzima proteolítica resistente al calor y de bajo peso molecular. Este microorganismo también produce bacteriocinas las cuales actúan únicamente contra especies de familias similares a estas mismas bacterias, y no participan mucho en el control intestinal de los patógenos (Gilliland, 1989).

Se ha demostrado que las bifidobacterias tienen acción antagonista hacia organismos enteropatogénicos como *E. coli*, *Shigella dysenteriae*, *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus* y *Proteus sp.* (Kim, 1988). Las bifidobacterias producen ácido acético, fórmico y láctico a partir de la fermentación de azúcares. El ácido acético es más inhibitorio para las bacterias gram negativas que el ácido láctico. Como se ha observado en infantes, la presencia de ácido acético en el intestino es más importante que el pH bajo para el control de los microorganismos gram negativo (Gilliland, 1989).

### *Digestión de lactosa*

La sobrevivencia de las bacterias ácido lácticas presentes en productos lácteos durante la digestión gastrointestinal, influye probablemente en el grado de digestión *in vivo* de la lactosa. Se ha observado que la respuesta de digestión de lactosa de la leche *in vivo* varía dependiendo del microorganismo. Con *B. lactis* hay un ligero mejoramiento en la digestión de lactosa y con *L. delbrueckii ssp. bulgaricus* la digestión es casi completa. (Martini y col. 1991.)

También se sabe que la permeabilización de la membrana celular de los cultivos de yogurt, promovida por la sensibilidad a la bilis, facilita que una vez introducidos los microorganismos en el intestino delgado la lactasa actúe sobre la lactosa. Se ha observado *in vitro*, que tratando las cepas de yogurt (*S. thermophilus* y *L. delbrueckii ssp. bulgaricus*) con ácidos biliares se rompe la célula y se elevan los niveles de actividad de la  $\beta$ -galactosidasa, sin embargo, la susceptibilidad a la ruptura por concentraciones fisiológicas de los ácidos biliares y la cuantificación de la supervivencia *in vivo* no se han estudiado.

En cuanto a *L. acidophilus* se cree que la ruptura de las células en la digestión *in vivo* posiblemente mejora la digestión de lactosa (Sanders y col. 1996).

### *Efecto sobre la absorción de colesterol*

Los probióticos convierten el colesterol en formas menos asimilables para el intestino, lo cual disminuye los niveles de colesterol en el suero (Ballongue 1993).

Kociubinski (1999) menciona que muchos estudios en humanos y animales indican que el consumo de productos lácteos elaborados con leche reducen los niveles de colesterol, algunos experimentos *in vitro* con *L. acidophilus* y *B. bifidum* sugieren que la asimilación de colesterol por estos microorganismos puede ser la causa de la disminución de esos niveles. Otros trabajos indican que la eliminación de colesterol en un medio líquido se debe a la coprecipitación de éste con sales biliares a un pH de 5.5. En su estudio Kociubinski probó diversas cepas de

*Bifidobacterium* y *Lactobacillus* de diferentes especies, para observar su tolerancia a la bilis y la formación de cristales en un medio líquido que contenía bilis y colesterol. Encontró que varias cepas de *Bifidobacterium* producen estructuras cristalinas que contienen colesterol.

#### *Producción de vitaminas*

Diversos procesos metabólicos en el organismo humano requieren de vitaminas del complejo B como coenzimas. Las bifidobacterias tienen la capacidad de sintetizar las siguientes vitaminas: vitamina (B1), riboflavina (B2), piridoxina (B6), ácido fólico (B9), cianocobalamina (B12), biotina (H) y ácido nicotínico (PP). (Kim 1988, Ballongue 1993), por lo que el consumo de productos elaborados con bifidobacterias nos podrían proporcionar parte del requerimiento diario.

#### *Actividad anticarcinogénica.*

Hay indicios de que algunas cepas probióticas pueden reducir la generación de compuestos carcinógenos y tóxicos que se producen en el tracto intestinal (Gilliland 1989). Inclusive en estudios en ratas se ha observado que *L. acidophilus* produce "algo" durante su crecimiento que inhibe la proliferación de células tumorales. A su vez se ha comprobado que *L. acidophilus* disminuye la actividad de las enzimas  $\beta$ -glucuronidasa, azoreductasa y la nitrato reductasa, enzimas de la microflora fecal que contribuye al cáncer de colon. (Nakazama y Hasano 1998, Gilliland 1989).

Hirayama y Rafter (2000) hicieron una revisión de los estudios realizados de microorganismos probióticos para la prevención de cáncer. Concluyen que no existe una evidencia directa de la supresión de cáncer en humanos como resultados del consumo de leches fermentadas o productos lácteos con cultivos

lácticos sin fermentar, sin embargo, estudios *in vitro* y en animales de laboratorio proporcionan una evidencia indirecta sobre esta propiedad. Entre los microorganismos probados se encuentran varias especies de *Lactobacillus* (*L. acidophilus*, *L. gasserii*, *L. confusus*) y *Bifidobacterium* (*B. breve*, *B. longum*, *B. adolescentis*, *B. infantis*, *B. bifidus*).

#### *Activación de la respuesta inmune*

Algunos componentes celulares de las bifidobacterias actúan como inmunomoduladores, es decir, promueven el ataque inmunológico en contra de células malignas. Esta activación del sistema inmune también contribuye hacia la resistencia del huésped a los patógenos (Yasui y cols. 1995.)

Perdigón y col. (1999) demostraron que *L. acidophilus* induce la activación del sistema inmune en la mucosa intestinal por una interacción con las células epiteliales. Se sabe también que *S. thermophilus* y *L. rhamnosus* tienen este tipo de interacción, mientras que *Lc. lactis* y *L. delbrueckii ssp. bulgaricus* inducen la producción de anticuerpos.

### **3.2 BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS**

El término "bacterias ácido lácticas" se refiere al grupo de bacterias que aprovechan la energía por la fermentación de ácido láctico por medio de carbohidratos y cuyos requerimientos nutrimentales son complejos (Ono y col 1998). Entre ellas se encuentran especies de los géneros *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* (Lee y Wong 1993).

La función principal de estas bacterias como cultivo iniciador para la elaboración de leches fermentadas son la seguridad en el aspecto microbiológico, producción de ácido por la fermentación de lactosa, producción de sustancias

aromáticas, y actividad hidrolítica hacia las proteínas de la leche (Ono y col 1998).

Las bacterias ácido lácticas homofermentativas, grupo al cual pertenecen las empleadas para la elaboración de leches fermentadas, pueden convertir 85% de los carbohidratos a ácido láctico, produciendo 2 moles de ácido láctico y 2 moles de ATP a partir de 1 mol de monosacárido. El ATP es empleado como una fuente de energía para la síntesis de compuestos que componen la célula como ácidos nucleicos y proteínas que son esenciales para la multiplicación celular (Ono y col. 1998).

Durante el metabolismo de la lactosa se lleva a cabo la regeneración de los equivalentes reductores ( $\text{NAD}^+$ ). El oxígeno en la leche es empleado como un aceptor de electrones por las bacterias lácticas a través de la actividad de oxidasas y peroxidasas. Como consecuencias el hidrógeno de  $\text{NADH}$  es transferido al oxígeno para producir  $\text{H}_2\text{O}_2$  y el  $\text{NAD}^+$  es regenerado (Johnson y Steele 1997).

### **3.2.1 Metabolismo de las bacterias ácido lácticas**

Es bien sabido que varios aminoácidos son esenciales para estimular el crecimiento de las bacterias ácido lácticas. La leche de buena calidad tiene pocos aminoácidos libres y el nitrógeno orgánico está presente en forma de un complejo junto con las caseínas y las proteínas globulares del suero, por lo que el crecimiento en leche se encuentra limitado por la fuente de nitrógeno y la producción de ácido láctico será lenta a menos que el cultivo iniciador contenga enzimas proteolíticas que degraden la proteína de la leche, como proteinasas y peptidasas.

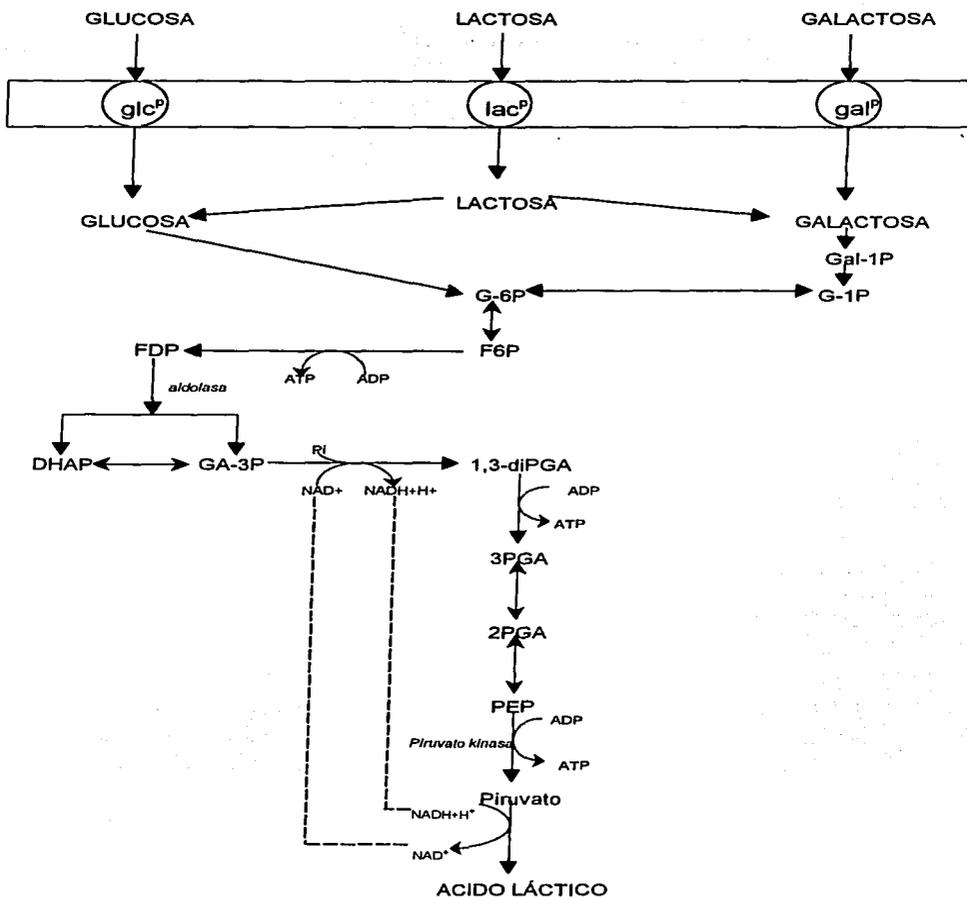


Figura 3.2.2. Metabolismo de carbohidratos por las bacterias ácido lácticas homofermentativas. Se muestran los sistemas de transporte activo dependientes de ATP ( $p$ =permeasa). (Tomado de Bactéries Lactiques, Aspects Fondamentaux et Technologiques, H.de Roissart y F.M. Luquet, 1994).

Las rutas principales en la fermentación en leche son las del metabolismo de la lactosa y demás azúcares que se puedan encontrar en el medio (figura 3.2.1), y el metabolismo del nitrógeno, sin embargo, también existen rutas menores que son importantes para que el producto cumpla con sus características finales.

También las rutas menores son importantes para continuar la viabilidad de la población, permitiendo la competencia en un medio no habitable. Para la fermentación en leche estas rutas son las que imparten diferentes sabores. El piruvato puede ser canalizado a compuestos que imparten sabor y aroma. El ácido acético tiene un sabor diferente al de el ácido láctico. El diacetilo y el acetaldehído son los compuestos que dan un sabor característicos al yogurt. En general la producción de compuestos como diacetilos y acetoina ocurren cuando hay una fuente alternativa de piruvato que no involucra la formación de NADH, como citrato o la adición de otro azúcar fermentable.

Durante la fermentación la utilización eficiente de lactosa como fuente de carbono depende del sistema de transporte del organismo y una enzima para hidrolizarla en sus monosacáridos correspondientes (Marshall 1992). *S. thermophilus* y algunos lactobacilos termofílicos homofermentativos transportan la lactosa a través de la membrana citoplasmática por un sistema antiporte lactosa-galactosa manejado por un gradiente electroquímico  $H^+$ , consumen la lactosa por medio de una permeasa. Una vez dentro de la célula es hidrolizada por la enzima  $\beta$ -galactosidasa produciendo glucosa y galactosa.

La glucosa obtenida es metabolizada hasta piruvato por la vía Embden-Meyerhoff-Parnas o la ruta glicolítica, produciéndose dos moles de lactato por mol de lactosa utilizada. Al contrario, la galactosa es excretada de las células acumulándose en la leche. Las cepas de lactobacilos termofílicos que no excretan la galactosa son capaces de utilizar la ruta de Leloir para metabolizarla hacia ácido láctico. *L. delbrueckii ssp. bulgaricus* y la mayoría de las cepas de *S. thermophilus* no pueden metabolizar la galactosa y el azúcar permanece en la

leche para ser empleada por otros microorganismos presentes (Johnson y Steele 1997, Marshall 1992).

En cuanto a la fuente de nitrógeno, existen dos tipos principales de proteínas en la leche, las caseínas y las proteínas del suero. Las caseínas ( $\alpha_{s1}$ -caseína,  $\alpha_{s2}$ -caseína,  $\kappa$ -caseína,  $\beta$ -caseína,  $\gamma_{1-3}$ -caseína) se presentan en forma de micelas altamente hidratadas y son susceptibles a la proteólisis. Las proteínas del suero ( $\beta$ -lactoglobulina,  $\alpha$ -lactoalbúmina, albúmina sérica e inmunoglobulinas) permanecen solubles en la leche después de la precipitación de las caseínas y son menos susceptibles a la proteólisis microbiana. Otras fuentes de nitrógeno de la leche son los compuestos nitrogenados no proteicos como la urea, los péptidos y los aminoácidos, los cuales pueden ser empleados instantáneamente por los microorganismos (Frank, 1997). Es necesario que los microorganismos que crezcan en leche tengan un buen sistema proteolítico debido a la baja concentración de aminoácidos en la leche. La caseína que compone alrededor del 80% de las proteínas de la leche es la fuente primaria de nitrógeno una vez consumido el nitrógeno no proteico. El sistema proteolítico en las bacterias ácido lácticas puede dividirse en tres componentes: enzimas extracelulares, sistemas de transporte y enzimas intracelulares (Johnson y Steele, 1997).

Los péptidos y aminoácidos formados por proteólisis imparten sabor y son precursores del sabor en los productos lácteos fermentados. El metabolismo de nitrógeno es importante en la formación de compuestos volátiles del sabor por el metabolismo de la treonina, la treonina aldolasa rompe el aminoácido en glicina y acetaldehído (Johnson y Steele 1997, Marshall, 1992).

Existe evidencia circunstancial de la actividad de proteinasa extracelular en *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, cuya actividad ayuda al crecimiento de *S. thermophilus* (Marshall, 1992).

También se ha encontrado que *S. thermophilus* no es capaz de producir un nivel significativo de prolina libre a partir de la  $\beta$ -caseína y que los péptidos fosforilados (de la parte N-terminal fosforilada de  $\beta$ -caseína) son más resistentes que otros péptidos a la hidrólisis por peptidasas, en especial las aminopeptidasas. Además se encontró que *S. thermophilus* presenta al menos una caboxipeptidasa, la cual no es capaz de remover la prolina en la posición del C-terminal (Deutsch y col, 2000).

### **3.3 GÉNERO *Bifidobacterium***

Las bacterias del género *Bifidobacterium* presentan una forma bacilar, no son esporuladas, son gram-positivo e inmóviles. La pared exterior es irregular por lo que presentan protuberancias en los extremos que tienen una o más ramificaciones, como consecuencia las células pueden presentar la forma de bastón, V, Y o X. El pleomorfismo parece ser por efecto del medio (Ballongue 1993).

Estos microorganismos son anaerobios, aunque la tolerancia al oxígeno depende de la cepa, de a cuerdo a esto se ha observado en aerobiosis tres tipos de comportamiento, uno es el crecimiento en aerobiosis sin la acumulación de peróxido de hidrógeno, por lo que se piensa que en este caso un sistema de peroxidasa consume el  $H_2O_2$ . Otro comportamiento es el crecimiento limitado por la acumulación del peróxido de hidrógeno que al parecer inhibe el crecimiento ya que tiene un efecto negativo sobre la enzima F6PPK. Por último se ha observado en algunos casos que no crece en ausencia del  $H_2O_2$  debido a que requiere de un bajo potencial redox para crecer y fermentar (Ballongue 1993).

*B. lactis* es una especie que se ha considerado en algunos casos como una especie diferente. Ventura y col. (2001) hicieron una prueba para la identificación de *B. lactis* empleando la cepa Bb-12 DSM 10140, comparándola con la cepa

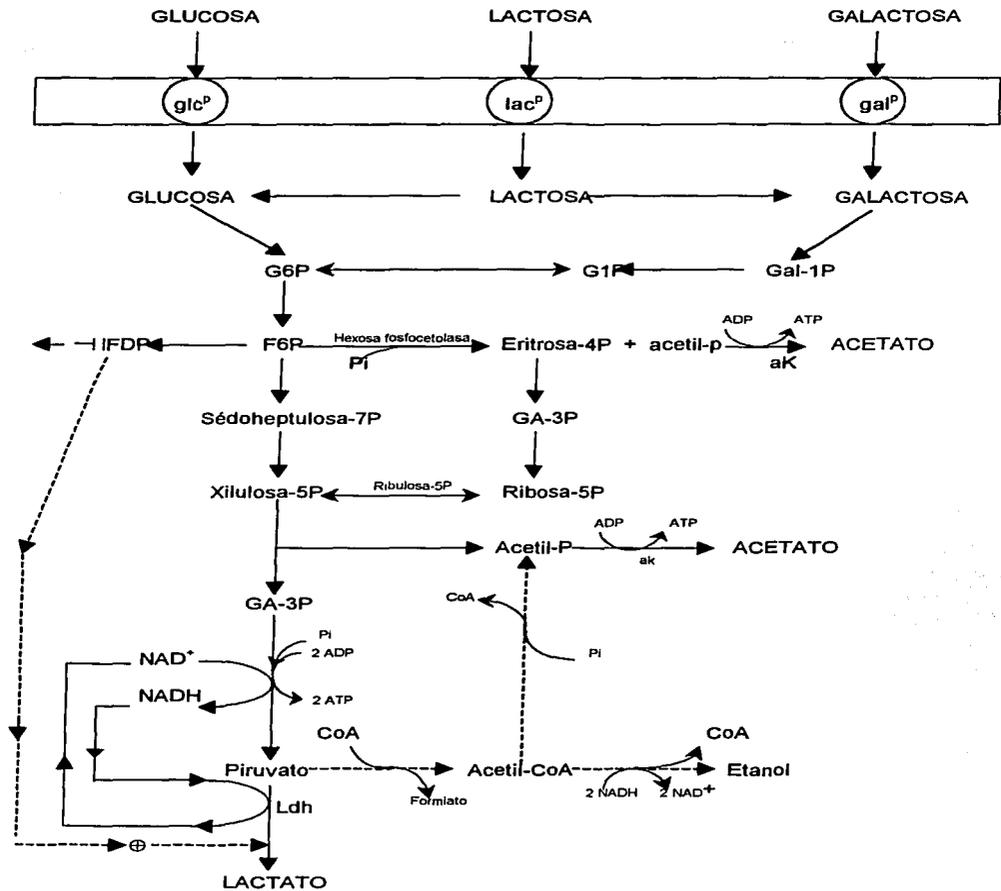


Figura 3.2.1. Metabolismo y transporte de azúcares por *Bifidobacterium*. El sistema de transporte de los azúcares es dependiente de ATP (p=permeasas). (Tomado de Bactéries Lactiques, Aspects Fondamentaux et Technologiques, H.de Roissart y F.M. Luquet, 1994)

ATCC25527 de *B. animalis*. Encontraron algunas diferencias en el DNAr de ambas cepas, algunos nucleótidos no correspondían en las secuencias de DNAr entre estas dos especies. Aunque mencionan que Roy y col. describen que esta cepa de *B. animalis* ATCC25527 tiene un patrón único en electroforesis de campo en gel de agarosa, el cual es de mayor similitud al de *B. lactis* DSM10140, que otras cepas de *B. animalis*.

Para el metabolismo de carbohidratos el género *Bifidobacterium* presenta una vía glucolítica diferente a la de las bacterias ácido lácticas, en la que existe una enzima específica del género, que es la fructosa-6-fosfato fosfoetolasa (F6PPK) y carece de aldolasa y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, dos enzimas que se encuentran en *Lactobacillus* (Ballongue 1993, Tamime y col. 1995).

El ácido pirúvico puede ser transformado en lactato o etanol. Para obtener el primero hay una reducción del piruvato por la L(+) deshidrogenasa, una enzima cuya actividad es controlada por la fructosa-1,6-difosfato; para la síntesis de etanol el piruvato es transformado en ácido fórmico y acetil fosfato, una porción del segundo es reducida a etanol regenerando NAD (Figura 3.3.2). Los productos finales de la fermentación se obtienen por la ruta de Embden-Meyerhoff-Parnas que actúa sobre el gliceraldehido-3-fosfato. (Ballongue 1993, Tamime y col, 1995).

En cuanto al metabolismo de nitrógeno, muchas cepas de bifidobacterias emplean sales de amonio como fuente de nitrógeno y cepas como *B. suis* y *B. cuniculi* requieren oxígeno orgánico. In vitro *B. bifidum* produce alanina, valina, aspartato y treonina. Algunas cepas no exhiben suficiente actividad proteolítica para el crecimiento en leche. La leche contiene pocos aminoácidos y péptidos libres. Para un crecimiento rápido la leche debe ser suplementada con hidrolizados de caseína, un caldo nutritivo o extracto de levadura.

Poco se ha trabajado en las proteinasas y peptidasas. El-Soda y col. (1992) reportaron actividad casiolítica de *B. infantis* y *B. longum*. Se sabe que las exopeptidasas son producidas por muchas especies, además se ha purificado una aminopeptidasa y una prolina iminopeptidasa de *B. breve*. También se ha detectado actividad carboxipeptidasa.

### **3.4 LECHES FERMENTADAS**

Las leches fermentadas son aquéllas que se fermentan con bacterias ácido lácticas, levaduras y mohos. Se clasifican generalmente en función del tipo de microorganismo utilizado en su elaboración (Varnam y Sutherland, 1995). Se distinguen principalmente cinco tipos:

- *Fermentación láctica por bacterias mesófilas* (suero de mantequería fermentado, nata fermentada y las leches viscosas escandinavas)
- *Fermentación láctica por bacterias termófilas* (yogurt y suero de mantequilla acidificado),
- *Leches fermentadas terapéuticas* (leche acidófila, yakult y productos terapéuticos patentados)
- *Fermentación por bacterias lácticas y levaduras* (kefir y el koumiss)
- *Fermentación por bacterias lácticas y mohos* (villi).

Para el desarrollo de productos lácteos comerciales es necesario poder predecir la velocidad de acidificación y el desarrollo de las bacterias lácticas. El descenso de pH durante la manufactura y en el producto terminado también es importante ya que afecta la coagulación del producto. Diferentes factores pueden causar variaciones en cuanto a la producción de ácido en el producto, como los residuos de antibióticos en leche o el uso de cultivos sobremadurados. Otros factores que alteran la fermentación son cepas contaminantes y la presencia de bacteriófagos.

Por lo anterior se han creado los cultivos iniciadores, que son cultivos compuestos por cepas puras de microorganismos ya sea individuales de una especie, o mixtas de dos o más especies, dependiendo del producto deseado (Johnson y Steele, 1997). El éxito de la fermentación de leche depende de la producción rápida de ácido por los cultivos iniciadores, el microorganismo debe crecer en grandes cantidades para producir ácido en tiempos cortos.

Entre las ventajas de emplear cultivos iniciadores congelados se pueden mencionar las siguientes:

- Eliminan la necesidad de realizar resiembras y el mantenimiento de los cultivos que son necesarios para asegurar la viabilidad y la actividad de las cepas.
- Disminuyen los problemas de contaminación durante siembra y mantenimiento.
- Protección frente a la infección por bacteriófagos.
- El almacenamiento es sencillo así como su manipulación por la gran variedad de presentaciones.

### **3.4.1 Importancia de las leches fermentadas**

El consumo de leches fermentadas es importante ya que la leche es un alimento con alto contenido de nutrimentos (tabla 3.4.1) y con la fermentación se producen cambios en la leche que aumentan su valor nutrimental y genera características sensoriales agradables como es el caso del yogurt. Además se le atribuyen propiedades terapéuticas debido a los microorganismos presentes.

Por otro lado el proceso de la fermentación sirve como un método de conservación de la leche, el mecanismo por el cual las bacterias ácido lácticas ayudan en la conservación de los alimentos es el empleo de carbohidratos y su

conversión en ácido láctico, a su vez el descenso en el pH provee una medida de protección contra la contaminación de otros organismos.

Tabla 3.4.1 Composición de la leche

Componente	Cantidad	Componente	Cantidad
Agua	87.3 g/100g	Cationes de sales	
Lactosa	4.6 g/100g	Sodio	58 mg/100g
Grasa	3.9 g/100g	Potasio	140 mg/100g
Caseína	2.6 g/100g	Calcio	118 mg/100g
Proteínas del suero	0.6 g/100g	Magnesio	12 mg/100g
Nitrógeno no proteico		Aniones de sales	
N no proteico total	296 mg/L	Citrato	176 mg/100g
N en urea	142 mg/L	Cloruro	104 mg/100g
N en péptidos	32 mg/L	Fósforo	74 mg/100g
N en aminoácidos	4 mg/L		
N en creatinina	25 mg/L		

Tomada de Food Microbiology, fundamental and Frontiers, J.F.Frank. A.S.M. Press, (Ed. Doyle, Beuchat y Montville) NY, 1997.

Los principales componentes del aroma en la leche fermentada tipo yogurt son el acetaldehído, diacetilo y acetoina (Belitz, 1997).

Al final de la fermentación de leche por las cepas comunes de yogurt (*L. delbrueckii ssp. bulgaricus* y *S. thermophilus*) los nutrimentos de la leche sufren cambios en su composición. Los aminoácidos esenciales prolina, serina, alanina, valina, leucina e histidina, presentan un incremento. Las vitaminas presentes en la leche inicialmente son metabolizadas y después son sintetizadas por los microorganismos. El efecto es mínimo sobre los niveles de tiamina, riboflavina, ácido nicotínico, ácido pantoténico y biotina, si bien la concentración en estas dos últimas vitaminas generalmente disminuye, mientras que las otras aumentan. El ácido fólico incrementa en un 100% con respecto a la concentración inicial. La vitamina B12 es usada por *L. delbrueckii ssp. bulgaricus* y su concentración disminuye en el yogurt. Además se ha observado que la digestión de proteínas en

el yogurt es dos veces más rápida que en la leche cruda (Varnamm y Sutherland, 1995).

### **3.4.2 Leches fermentadas con propiedades terapéuticas**

El uso de leches fermentadas como alimentos con propiedades terapéuticas fue popular a partir de 1910, cuando Metchnikoff postuló que el consumo de este tipo de leches prolongaba la vida, en base a sus observaciones sobre la longevidad de la población de los Balcanes por el consumo del yogurt. Sin embargo alcanzaron mayor auge en los 50's cuando se les comenzó a agregar sabores y frutas haciéndolas más agradables para el consumidor. (Tamime y Robinson, 1981)

La microflora tradicional del yogurt está conformada por *S. thermophilus* y *L. delbrueckii ssp. bulgaricus*. Estos microorganismos no se establecen en el tracto intestinal por sí mismos, pero pueden sobrevivir en el intestino delgado y el colon después de 3 horas de haber sido ingerido el yogurt o con la administración continua (Nakazama y Hasano 1998.) Este cultivo ha sido mejorado añadiendo algunas veces *Bifidobacterium* spp. y *L. acidophilus*. (Ballonge 1993, Gomes y Malcata 1998)

Los yogures terapéuticos se distinguen de los tradicionales en los microorganismos que componen el cultivo iniciador, pero son iguales en otros aspectos tecnológicos de la fabricación. Se utiliza *L. acidophilus*, *Bifidobacterium* y con menor frecuencia *L. casei*. Los yogures terapéuticos pueden prepararse utilizando únicamente cultivos terapéuticos, pero debido a su baja velocidad de acidificación se combinan con las bacterias lácticas normalmente usadas en la elaboración del yogurt (Varnam y Sutherland 1995, Dave y Shah 1996, Ballongue 1993). Una fermentación lenta además de producir efectos negativos

económicamente tiene el riesgo de sufrir contaminaciones por el crecimiento de microorganismos indeseables o bacteriófagos.

Los cultivos iniciadores utilizados en los yogures terapéuticos deben ser capaces de sobrevivir al tránsito estomacal, permanecer activos en presencia de sales biliares y tener capacidad de colonizar el intestino. Para cumplir con la actividad terapéutica se considera un mínimo viable de  $10^6$  a  $10^9$  células viables por mililitro (Varnam y Sutherland 1995, Lee y Wong 1993). Tanto el género *Bifidobacterium* como *L. acidophilus* son sensibles al ácido y para conseguir que el producto final contenga el mínimo terapéutico hay que mantener el valor final de pH arriba de 4.6. (Varnam y Southerland, 1995).

### **3.4.3 Interacción entre las cepas de *S. thermophilus* y *L. delbrueckii ssp. bulgaricus***

La interacción entre estos microorganismos es de las más estudiadas. Se sabe que *S. thermophilus* es estimulado por los aminoácidos y péptidos liberados de la caseína por la acción de las proteasas del *L. delbrueckii ssp. bulgaricus*, mientras este segundo es estimulado por el  $\text{CO}_2$ , ácido pirúvico y el ácido fórmico producidos por el estreptococo. El efecto del ácido fórmico en la estimulación del crecimiento quizá se deba a una mayor velocidad de síntesis de purina. (Marshall, 1992).

No está claro cuáles aminoácidos son los responsables de la estimulación de *S. thermophilus*, pero se ha encontrado que ante la carencia de la valina, histidina, ácido glutámico, triptofano, metionina, leucina e isoleucina en el medio se reduce al crecimiento de *S. thermophilus* en un 50%. (Tamime y Robinson 1981).

Esta interacción era considerada a inicios de los 80's como simbiosis (Tamime 1981), pero debido a que se trata de una interacción positiva entre las especies y que pueden crecer uno en ausencia del otro, en 1984 Diessen estableció que se trataba de protooperación (Marshall 1992) y así ha sido reconocida últimamente por autores como Sodini y col. (2000), y Moreira y col. (2000) que han comprobado este comportamiento entre estas cepas.

#### **3.4.4 Fermentaciones de *B. lactis* en leche**

La leche es un medio rico en nutrimentos, a pesar de ello, estos no se encuentran en la forma más disponible o en las concentraciones óptimas. (Gomes y Malcata. 1998).

Tamime y col. (1995), menciona que en el caso de las bifidobacterias, existe polémica acerca del crecimiento de este microorganismo en leche; algunos autores reportan no haber detectado crecimiento mientras otros reportan crecimiento de la misma cepa. Por eso para asegurar el crecimiento en leche se emplean cultivos mixtos con lactobacilos ya que al parecer las enzimas proteolíticas y aminopeptidasas de estos estimulan su crecimiento.

Samona y col. (1996), examinaron la producción de ácido y crecimiento de *B. bifidum*, *B. longum* y *B. adolescentis* en leche durante 48 horas incubando a 37 °C. Encontraron que no hay una relación entre el crecimiento y la producción de ácido. La cepa que mayor capacidad tenía de acidificación en leche fue *B. adolescentis*, mientras las otras dos producían cantidades muy pequeñas de ácido.

Desjardins y col. (1990) estudiaron el cultivo de *B. bifidum*, *B. breve*, *B. longum* y *B. infantis* en leche usando bioreactores a 37 °C con agitación y controlando el

pH a 5.7. Encontraron que el lactato y acetato acumulados limitan el crecimiento de las bifidobacterias.

Gomes y col. (1998), realizaron dos ensayos sobre el crecimiento de *B. lactis* en leche. En uno se inoculó *B. lactis* en leche con dos tipos de hidrolizados, encontraron que este microorganismo en leche adicionada con hidrolizado de neutrasa de *Bacillus subtilis* o de proteasa de *Aspergillus sp*, presentó un aumento de biomasa y de producción de ácido en comparación de los obtenidos en la leche normal. En otro estudio se creció *B. lactis* en leche de cabra y leche de oveja, encontraron que en la leche de estos animales, a la que se había añadido el hidrolizado respectivo de cada una obtenido por la proteasa de *Aspergillus sp*, hay un mejor crecimiento de *B. lactis* que en estas leches con aminoácidos libres añadidos y a su vez es mayor el crecimiento de este microorganismo en la leche con los aminoácidos que en la leche normal. Concluyen que *B. lactis* es un microorganismo que requiere para su crecimiento determinados aminoácidos como Lys, Leu y Pro, y vitaminas, por lo que es difícil emplear leche entera como medio de propagación para cultivos iniciadores. Además observaron que cuando *B. lactis* actúa en un cocultivo con *L. acidophilus*, hay una interacción positiva por parte de *L. acidophilus* sobre *B. lactis*, ya que se incrementa la velocidad de crecimiento y de acidificación de *B. lactis*.

Lo anterior sugiere que el bajo crecimiento de *B. lactis* en leches se debe parcialmente a la carencia de péptidos pequeños y de aminoácidos libres.

Dave y Shah (1998) hicieron un estudio sobre el efecto de la adición de cisteína, proteína de suero concentrado, suero en polvo, hidrolizados ácido de caseína y triptona, sobre la viabilidad de *S. thermophilus*, *L. acidophilus* y *Bifidobacterium* durante su fermentación en un cultivo mixto en leche. Sugieren que los péptidos y aminoácidos mejoran la viabilidad de bifidobacteria en el yogurt elaborado con el cultivo compuesto de estos tres microorganismos.

### 3.4.5 Fermentaciones de *L. acidophilus* en leche

La fermentación más común en leche con este microorganismo es la que se realiza para obtener la llamada leche acidófila, la cual se sabe que tiene propiedades benéficas para el organismo. Esta se elabora con un inóculo del 1 al 3% y se fermenta a temperatura de 37 °C durante 24 h. Para conseguir la máxima viabilidad microbiana se necesita controlar las condiciones de incubación hasta alcanzar un porcentaje de ácido láctico de 0.6 a 0.7 (Robinson y Tamime 1987, Varnam y Southerland 1995).

Gomes y col. (1998), realizaron el mismo ensayo con los hidrolizados obtenidos por las proteasas que usaron para mejorar el crecimiento de *B. lactis* en leche, para observar el crecimiento de *L. acidophilus*. Encontraron que tanto el crecimiento como la velocidad de acidificación de *L. acidophilus* no fueron mejorados significativamente por la adición de los hidrolizados de leche, el crecimiento fue lento. Al parecer la presencia de péptidos pequeños y aminoácidos libres causan un desbalance en el medio lácteo y en su sistema de transferencia, consecuentemente se suprime el crecimiento.

Mencionan que *L. acidophilus* contiene proteinasas en la superficie de la pared celular, lo que le permite hidrolizar caseína de leche, por lo que puede producir péptidos de bajo peso molecular. Concluyen que además de crecer lentamente, su sistema proteolítico fue aparentemente capaz de generar su propia fuente de nitrógeno.

Al realizar el estudio en leche de cabra y leche de oveja, encontraron que *L. acidophilus* mejora su crecimiento en la leche de oveja adicionada con aminoácidos libres y no hay gran diferencia entre el crecimiento en leche sin tratar y la leche añadida con el hidrolizado. Sin embargo en la leche de cabra en todos los casos se observó una disminución de la viabilidad sin importar la fuente de nitrógeno, por lo que el bajo crecimiento de este microorganismo se atribuyó al exceso de ácidos grasos en este tipo de leche.

En el estudio de Dave y Shah (1998), *L. acidophilus* aumentó poco su velocidad de crecimiento cuando el yogurt se complementó con hidrolizado ácido de caseína y triptona y en el caso de la cisteína fue menor el crecimiento que en el control.

### **3.5 MEDIOS DE CULTIVO DIFERENCIALES Y SELECTIVOS**

Un medio de cultivo diferencial es aquél en el cual el crecimiento de los microorganismos de diferentes especies tiene una morfología que los hace distinguibles uno del otro. Mientras que en un medio de cultivo selectivo por medio de antibióticos u otro tipo de inhibidores en el medio permiten únicamente el crecimiento de una sola especie, la cual es resistente al agente inhibidor (Pelzcar, 1980).

Se han estudiado diversos medios de cultivo tanto diferenciales como selectivos para el crecimiento de bacterias lácticas, en especial las presentes en los cultivos empleados para la elaboración de yogurt y el género *Bifidobacterium*.

Para el crecimiento de *Streptococcus thermophilus* se ha reportado con gran éxito el empleo del medio M17 en productos que contienen cultivos (Lim y col. 1995, Lapierre y col. 1992, Sanders y col. 1996), así como el agar ST.

Se han diseñado diversos medios de cultivo selectivos para *Bifidobacterium*, presente en cultivos mixtos, cuya base son los antibióticos o una fuente única de carbono para inhibir las bacterias lácticas. Entre los antibióticos empleados se encuentran la gentamicina, neomicina, paromomicina, ácido nalidíxico, terramicina, dicloxacilina (Lim y col 1995, Boullletin of the IDF 340, Shin y col, 2000). Las mejores condiciones de incubación para *Bifidobacterium* son a 37 °C,

48 h. en anaerobiosis (Lim y col. 1995, Boullletin of the IDF 340g, Desjardins y col 1990).

Otros agentes inhibidores para bacterias acidolácticas son el cloruro de litio y el propionato de sodio. Estos han sido probados en el medio LCL (hígado, cisteína, lactosa) en una concentración de 2 g/L y 3 g/L respectivamente, a una temperatura de incubación de 40°C durante 48 horas en condiciones anaerobias, inhibieron el crecimiento de *L. delbrueckii ssp bulgaricus* y a *L. acidophilus* en su totalidad, aunque la inhibición no fue total para *S. thermophilus* y *Lactococcus lactis ssp. cremoris*. Tomando como referencia el medio TJA (agar jugo de tomate) donde crece bien *Bifidobacterium* se encontró que en el medio diseñado casi no hay diferencia en la cuenta obtenida (Lapierre y col, 1992). Se conoce poco acerca del mecanismo del cloruro de litio sobre las células, es empleado comúnmente para el aislamiento selectivo de bifidobacterias. El propionato de sodio es empleado también en la industria de los quesos para prevenir el crecimiento de hongos y como agente selectivo para el aislamiento de bifidobacterias.

Desjardins y col. (1990), emplearon el medio MRS lactobacilli de Difco modificado añadiendo L-cisteína-HCL (0.05%), Bacto-agar (0.075%), Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (0.02%) y CaCl·H<sub>2</sub>O (0.01%) para estimular el crecimiento de bifidobacterias.

Otro medio que se ha empleado comúnmente para realizar cuentas selectivas de *Bifidobacterium* es el medio MRS NPNL (neomicina-patamomicina-ácido nalidixico, Teraguchi y col. (1978), sin embargo se ha encontrado que hay pérdida de microorganismos viables. Lim y col. (1995) encontraron que en el medio BL-OG (sangre-glucosa-hígado+oxgall 0.2 mg/ml y gentamicina 30 µg/ml) hay mayor recuperación de bifidobacterias (*B. bifidum*, *B. longum*, *B. infantis*) que en el medio NPNL y comparando con el medio BL donde crecen bien las bifidobacterias lograron una recuperación de hasta el 90%, por lo que se

considera a la gentamicina como un buen antibiótico que inhibe menos el crecimiento de las bifidobacterias.

Dave y Shah (1996) hicieron varias pruebas para encontrar medios de cultivo selectivos y/o diferenciales para *S. thermophilus*, *L. delbruekii ssp. bulgaricus*, *L. acidophilus* y *B. lactis* las cuatro cepas. Para *S. thermophilus* encontraron que el mejor medio de cultivo era el agar ST (*Streptococcus thermophilus* agar) y el M17 en condiciones de incubación de 37° C 24 horas en aerobiosis. Además emplearon en medio MRS pH 5.2 para la enumeración de *L. delbruekii ssp. bulgaricus* a 45 ° C  $\geq$ 72 h, resultando este un medio diferencial para esta especie y *Bifidobacterium*, aunque la recuperación de *L. delbruekii ssp. bulgaricus* fue de uno a dos logaritmos menor que la obtenida en MRS agar a 37 °C. El medio MRS-maltosa puede ser usado para estimar la cuenta total de *L. acidophilus* y *B. lactis* en un cultivo mixto. También como medio diferencial para *L. acidophilus* encontraron el MRS-salicina (1%) y el MRS-sorbitol (1%). Para la enumeración de bifidobacteria sugieren el método de substracción de la cuenta de *L. acidophilus* obtenidas en MRS-salicina o MRS-sorbitol de la cuenta total obtenida de MRS-maltosa, dando así la población de bifidobacteria. Se recomienda más este método que el empleo de MRS-NNLP ya que algunas cepas de bifidobacteria en este medio fueron inhibidas de un 40 a un 60%. Probaron el medio MRS-oxgall (10 g/L) donde se observó inhibición de *Bifidobacterium* y *L. acidophilus*.

## 4. MATERIAL Y METODOS

### 4.1 Microorganismos

Se emplearon cuatro diferentes cultivos en polvo (liofilizado) de Christian-Hansen cuya composición se muestra en la Tabla 4.1.

Tabla 4.1. Cultivos en polvo empleados en las fermentaciones.

<b>Cultivo</b>	<b>Microorganismos</b>
ABY-1	<i>Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus</i> <i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Streptococcus thermophilus</i> <i>Bifidobacterium lactis</i>
YC-380	<i>Lactobacillus bulgaricus ssp. delbrueckii</i> <i>Streptococcus thermophilus.</i>
Bb-12	<i>Bifidobacterium lactis</i>
La-5	<i>Lactobacillus acidophilus</i>

Estos cultivos son de bacterias lácticas termófilas, del tipo DVS "direct vat set" y se encuentran en sobres de aluminio de aproximadamente 25 g, aunque su contenido está expresado en unidades, siendo una unidad el equivalente a una cuenta total de  $10^6$  UFC.

### 4.2 Medios de Cultivo

En la tabla 4.2 se presentan los medios de cultivo comerciales empleados para las pruebas de diferenciación y/o selección de las cepas presentes en el cultivo mixto ABY-1. En el apéndice I se muestra la preparación de estos medios.

Tabla 4.2. Medios de cultivo probados para realizar las cuentas diferenciales y/o selectivas de los cuatro microorganismos presentes en el cultivo mixto ABY-1.

MEDIO (Agar)	CONDICIONES DE INCUBACION			REFERENCIAS
	Aerobiosis/Anaerobiosis	Temperatura	Tiempo	
Belliker	Aerobiosis	37 °C	24 h	
Columbia+ácido propiónico	Anaerobiosis	37 °C	48 h	Beerens, 1990.
M17	Aerobiosis	37 °C	24 h	Lapierre y col. 1992, Lim y col. 1996, Dave y col. 1998.
MRS	Aerobiosis	37 °C	48 h	
MRS galactosa	Aerobiosis	37 °C	48h	Breed y col. 1974
MRS sacarosa	Aerobiosis	37 °C	48h	Breed y col. 1974
MRS modificado	Anaerobiosis	37 °C	48 h	Desjardins y col 1990.
		45 °C	72h	
MRS+NNL	Anaerobiosis	37 °C	48 h	Marlita y col. 1989
MRS pH 5.2	Anaerobiosis	37 °C	48 h, <72h	Dave y col. 1996.
		45 °C	72 h	
PDA	Aerobiosis	37 °C	48 h	Breed y col. 1974

Las condiciones de anaerobiosis se obtuvieron empleando jarras herméticas Oxoid de aproximadamente dos litros, a las cuales se les coloca un sobre "gas pack" que genera las condiciones de anaerobiosis, con un contenido aproximado de 1200 ml de H<sub>2</sub> y 350 ml de CO<sub>2</sub>. También se empleó una cámara de anaerobiosis (Forma-Scientific) cuya mezcla de gases en el interior es de 5% H<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub> y 85% N<sub>2</sub>.

#### 4.2.1 Cuenta de microorganismos por gramo de cultivo ABY-1, YC-380, La-5, y Bb-12

Se hizo una cuantificación por gramo de producto a los cultivos ABY-1, La-5, Bb-12 y YC-380, en los diferentes medios para ver con cual se lograba la mayor recuperación de microorganismos. Para esto se inocularon 100 ml de base láctea con 0.1 g de cultivo y se dejó incubar a 43 °C durante 30 minutos. Se realizaron diluciones de 10<sup>-6</sup> a 10<sup>-8</sup>, se inocularon las cajas y se incubaron en anaerobiosis a 37 °C de 48 a 72 horas y a 45 °C de 48 a 96 horas.

## 4.3 Fermentaciones

### 4.3.1 Base láctea

Se empleó leche en polvo Svelty Calcio-plus de Nestlé (ver composición en apéndice I), para preparar la base láctea al 8 % (peso/peso). Se calentó ligeramente (50-60 °C) y se agitó con un agitador magnético. Se distribuyó un volumen de 75 ml en matraces erlen-meyer de 120 ml, se taparon con tapón de algodón y se esterilizan a 15 lb/in<sup>3</sup> durante 10 min. Se dejaron enfriar a 40-45 °C, para posteriormente ser inoculados con el preinóculo del cultivo correspondiente.

### 4.3.2 Fermentación de la base láctea con los cultivos ABY-1, La-5, Bb-12 y YC-380.

Para la fermentación se inocularon 0.15 Unidades del cultivo en polvo por litro de base láctea, como lo establece el fabricante. Se preparó un preinóculo cuyo contenido por ml proporcionó la cantidad equivalente a las 0.15 U/L para cada matraz a inocular, se dejó en adaptación estático en una incubadora a 43°C durante media hora. Se inoculó la base láctea que se encontraba a una temperatura aproximada de 40 °C, se agitó y se dejó incubar estático a 43 °C. Se tomaron muestras cada hora desde el tiempo inicial hasta que la fermentación alcanzó los 60 °D (apéndice II).

La fermentación de la base láctea por el cultivo YC-380 se realizó como control para observar el efecto de los microorganismos probióticos sobre *S. thermophilus* y *L. delbrueckii ssp. bulgaricus*. Del mismo modo las fermentaciones con los cultivos La-5 y Bb-12 se llevaron a cabo como control, para observar si hay un efecto benéfico durante la fermentación del cultivo ABY-1 sobre *B. lactis* y *L.*

*acidophilus*. Para las fermentaciones de los cultivos La-5, Bb-12, y YC-380, se preparó un preinóculo, el cual era un concentrado que al añadir 1 ml de éste a los matraces que contenían la base láctea, proporcionaba una cantidad de UFC/ml similar a la de cada microorganismo presente al inicio de la fermentación del cultivo mixto ABY-1 (el equivalente de 0.15 U/L). Se dejó en adaptación estático, durante media hora a 43 °C. Se inoculó la base láctea con el preinóculo, se incubó estático a 43 °C y se siguió el mismo procedimiento realizado para la fermentación del cultivo ABY-1 en cuanto a muestreo y análisis. Cada fermentación se realizó por duplicado.

#### *4.3.3 Fermentación del cultivo La-5 y fermentación del cultivo Bb-12, en aerobiosis, 24 horas.*

Se siguió el mismo procedimiento que para la fermentación para cada cultivo individual, pero el muestreo se realizó en el tiempo cero y a partir de las 12 horas de incubación hasta las 24 horas en intervalos de 3 horas por lo que sólo se prepararon 12 matraces considerando los duplicados. Los análisis realizados fueron los mismos que para las fermentaciones de 6 horas.

#### *4.3.4 Fermentación del cultivo La-5 y fermentación del cultivo Bb-12, en anaerobiosis, 24 horas.*

Estas fermentaciones se llevaron a cabo por duplicado, en viales de 100 ml a los cuales se les colocó 35 ml de base láctea sin esterilizar, se añadieron 300 µl de NaOH 10 M, se gasificó con CO<sub>2</sub> durante dos minutos y se tapó el vial y se selló. Se esterilizó a 15 lb/in<sup>3</sup> durante 10 minutos. Se dejaron enfriar a una temperatura cercana a los 40 °C y se inocularon con el preinóculo. El preinóculo se preparó de igual manera que en la fermentación de los cultivos individuales.

Se tomaron muestras desde el tiempo inicial hasta las 24 horas en intervalos de 3 horas, los análisis realizados fueron los mismos que para las fermentaciones individuales.

#### **4.4 Métodos analíticos**

##### *4.4.1 Cuenta viable*

Se empleó el método de dispersión en placa. Se tomaron 200  $\mu\text{l}$  de muestra y se hicieron diluciones de  $10^{-3}$  hasta  $10^{-7}$  en una solución de agua peptonada 0.1% y Tween 80 al 0.05% y un par de perlas de vidrio. Se agitaron con un vortex a baja velocidad, el tween 80 y la agitación con las perlas de vidrio son importantes para la disgregación de las células. Se inocularon 100  $\mu\text{l}$  de las diluciones consideradas en cajas petri con los medios seleccionados para cada cepa. El plaqueo se realizó por triplicado.

Para la cuantificación de *L. delbrueckii ssp. bulgaricus*, *L. acidophilus* y *B. lactis* se empleó el agar MRS pH 5.2 incubando a 37 °C, hasta 96 horas en anaerobiosis en el caso de los cultivos mixtos, y en los individuales se incubó a 37 °C, 48 horas en anaerobiosis; para la cuantificación de *S. thermophilus* se empleó el medio M17 incubando a 37 °C, 24 horas en aerobiosis.

##### *4.4.2 Medición de pH*

Se determinó con un potenciómetro *Conductronic pH 20* previamente calibrado con soluciones amortiguadoras de pH 7 y 4.

#### *4.4.3 Acidez titulable*

Se determinó el porcentaje de acidez tomando 9 ml de muestra, a los cuales se les añadió una gota de solución de fenolftaleína en etanol 0.1% y se tituló con NaOH 0.1 N. A partir del porcentaje de ácido láctico se determinaron los grados Dornic (apéndice II). Esta prueba se realizó en el momento de la toma de muestra por duplicado.

#### *4.4.4 Determinación de la concentración de proteínas*

Se empleó el Milko-Scan 133 de Fossomatic, el cual determina proteínas por espectroscopía de infrarojo. Su principio es la lectura de grupos funcionales, por lo que para determinar proteínas emplea una longitud de onda de 6.5  $\mu\text{m}$ , leyendo el enlace N-H de los enlaces peptídicos. Este principio ha sido muy empleado para la determinación de proteína en leche y productos lácteos (Agné 1998, Hewavitharana y van Brakel 1997, Luinge y col. 1993, Rodríguez-Otero y Hermida 1996, van de Voort y Elkashef 1990, van de Voort y col. 1992), así mismo, se encuentra como uno de los métodos sugeridos por la AOAC (1990) para el análisis de leche. Para hacer esta determinación se tomaron 5 ml de muestra y se congelaron a  $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , la prueba se hizo al día siguiente o a más tardar en tres días. En el caso de los primeros tiempos de fermentación, así como en las muestras en que no se presentó viscosidad o precipitados en la leche fermentada, se tomaron de 5 a 3 ml de muestra y se colocaron bajo la pipeta del aparato la cual automáticamente toma la cantidad de muestra necesaria para el análisis (1 ml). Cuando la leche presentó cambios tales como el aumento en la viscosidad o precipitación de proteínas, se empleó NaOH 4 M para solubilizar la proteína. Cada determinación se realizó por triplicado.

#### *4.4.5 Determinación de ácidos y azúcares por HPLC*

Se tomaron aproximadamente 10 ml de muestra y se congelaron a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Una semana antes de la determinación se hizo un pretratamiento de las muestras acidificándolas con HCl 2 N y centrifugación 5000 rpm, durante 20 min para separar la proteína, el análisis se realizó al sobrenadante, el cual se filtró con milipore de  $0.22\text{ }\mu\text{m}$  y se diluyó 1:10, de esta solución se inyectaron  $100\text{ }\mu\text{l}$  al cromatógrafo.

Se empleó un cromatógrafo de líquidos Perkin-Elmer serie 250 con una bomba LC 250, un loop de  $20\text{ }\mu\text{l}$ ; se empleó la columna tipo aminex Grom Resin Zn de Grom, de intercambio catiónico, y el detector LC-30 de índice de refracción, con un integrador modelo 1022S. Como fase móvil se empleó  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0.1 N con un flujo de  $0.5\text{ ml/seg}$ .

Se inyectaron patrones de glucosa, galactosa y lactosa por separado para determinar el tiempo de retención de cada azúcar, también se inyectaron patrones de los ácidos empleando lactato de litio como patrón para el ácido láctico y acetato de sodio para el ácido acético. Posteriormente se hicieron mezclas de los patrones con concentraciones del 0.1 al 0.5 %, los cuales se emplearon para elaborar una curva patrón para cada compuesto a determinar (apéndice III).

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1 Medios de cultivo diferenciales y/o selectivos

Se hicieron pruebas utilizando diferentes medios de cultivo con el fin de determinar en cuáles se podían diferenciar los microorganismos que componen el cultivo mixto ABY-1. En la tabla 5.1.1 se presentan los medios y las condiciones empleados para la selección y/o diferenciación para los lactobacilos, bifidos y estreptococos.

Tabla 5.1.1 Diferenciación y/o selección de las colonias de *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus* y *Bifidobacterium lactis* en diferentes medios de cultivo y condiciones de incubación.

MEDIO (Agar)	CONDICIONES DE INCUBACION			DIFERENCIAL	SELECTIVO
	Aerobiosis/ Anaerobiosis	Temperatura	Tiempo		
Bellinker	Aerobiosis	37 °C	24 h	<i>S. thermophilus</i>	
Bellinker	Aerobiosis	37 °C	48 h	<i>S. thermophilus</i> y lactobacilos*	
M17	Aerobiosis	37 °C	24 h		<i>S. thermophilus</i>
Columbia+ac. propiónico	Anaerobiosis	37 °C	48 h		<i>B. lactis</i>
MRS	Aerobiosis	37 °C	48 h	Lactobacilos* y <i>S. thermophilus</i>	
	Anaerobiosis	37 °C	48 h	<i>B. lactis</i> <i>L. acidophilus</i>	
MRS galactosa	Aerobiosis	37 °C	48h	<i>S. thermophilus</i>	
MRS sacarosa	Aerobiosis	37 °C	48h	Lactobacilos*	
MRS modificado	Anaerobiosis	37 °C	48 h	<i>B. lactis</i> <i>L. acidophilus</i>	
		45 °C	72h	<i>B. lactis</i> <i>L. acidophilus</i>	
MRS+NNL	Anaerobiosis	37 °C	48 h	<i>B. lactis</i> <i>L. acidophilus</i>	
MRS pH 5.2	Anaerobiosis	37 °C	<72 h	<i>B. lactis</i> <i>L. acidophilus</i> <i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i>	

MRS pH 5.2	Anaerobiosis	45 °C	<72 h	<i>L. acidophilus</i> <i>L. delbrueckii</i> <i>ssp. bulgaricus</i> <i>B. lactis</i>	
PDA	Aerobiosis	37 °C	48 h	Lactobacilos* y <i>S. thermophilus</i>	

\*Se diferenció *S. thermophilus* de los lactobacilos, pero no se diferenciaron los lactobacilos entre sí.

*Streptococcus thermophilus* no creció en condiciones de anaerobiosis, por lo que no hubo problema con su diferenciación de los otros microorganismos. El mejor medio para su crecimiento fue el M17, donde las colonias eran pequeñas, redondas, color crema, con elevación y brillo (fig. 5.1.1), además el tiempo de incubación requerido fue 24 horas, después de este tiempo la población no aumentó. En cambio, en el medio Bellinker, a las 24 horas de incubación crecieron colonias de *S. thermophilus* y de los lactobacilos también, en este tiempo son muy similares las colonias de los microorganismo y después de las 48 horas las colonias de los lactobacilos presentaron alrededor un borde ondulado semitransparente con lo cual se diferenciaban del estreptococo, pero por el tamaño tan pequeño de la colonia fue difícil de distinguir.

En el agar columbia+ac. propiónico, creció *Bifidobacterium lactis* únicamente. Este medio inhibe los otros microorganismos debido al propionato. Las colonias que crecieron eran grandes, redondas, blancas, con elevación y brillo, que es la morfología característica de este género de microorganismos.

En el medio MRS en aerobiosis crecieron los lactobacilos y algunas colonias de estreptococos, pero no se pudo diferenciar entre las colonias de los lactobacilos. Las colonias de los lactobacilos eran pequeñas, redondas, color crema, con bordes estrellados y planas, con una elevación en el centro, no presentaban brillo. *S. thermophilus* también creció en este medio pero escasamente, las colonias eran pequeñas, redondas, color crema, de bordes

lisos, opacas y sin elevación. En este medio en condiciones de anaerobiosis crecieron con características diferenciales las colonias de *B. lactis* y *Lactobacillus acidophilus*. Las del primero, como se muestra en la figura 5.1.2, eran color crema, redondas, de medianas a grandes, de bordes lisos, con elevación y con brillo, mientras que las del segundo, figura 5.1.3, presentaban bordes ondulados, color blanco a crema, eran planas con una pequeña elevación en el centro y con brillo.

El medio MRS-galactosa y MRS-sacarosa se esperaba tener un crecimiento selectivo de *L. delbrueckii ssp. bulgaricus* y *L. acidophilus*, respectivamente en cada medio. *L. delbrueckii ssp. bulgaricus* fermenta la galactosa, pero no la sacarosa, al contrario de este microorganismo, *L. acidophilus* si fermenta la sacarosa pero no la galactosa. En el medio MRS-galactosa se encontraron colonias de lactobacilos pequeñas y medianas, de color beige, y apariencia estrellada (rugosa). En MRS-sacarosa crecieron colonias pequeñas de lactobacilos, opacas y estrelladas que no se distinguen muy bien en el medio. También creció en estos medios *S. thermophilus*, siendo las colonias de este microorganismo de pequeñas a grandes, redondas, color crema y con brillo; en el medio MRS-sacarosa al parecer se formó un polisacárido ya que las colonias están rodeadas de una mucosa. Debido a la escasez en el crecimiento de colonias de lactobacilos en ambos medios (se encontró crecimiento en el orden de  $10^{-3}$  y  $10^{-2}$  UFC/ml) fueron descartados para la realización de la cuenta en placa de los microorganismos.

En el agar PDA cuando se inoculó con el cultivo mixto crecieron colonias pequeñas y puntiformes traslúcidas, que se confundían con el medio, en la observación por tinción de gram se encontró que eran bacilos. Según Breed y col. (1974), *L. delbrueckii ssp. bulgaricus* debe crecer en este medio siendo las colonias color blanco-amarillo, pero no se observó esta morfología, por lo que se descartó este medio para la cuenta diferencial de los microorganismos presentes

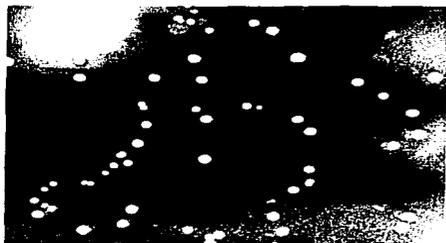


Figura 5.1.1. Colonias de *S. thermophilus* en el medio M17 en aerobiosis, 37 °C, 48 horas.



Figura 5.1.2 Colonias características de *B. lactis* en el medio MRS en anaerobiosis, 37 °C, 48 horas.

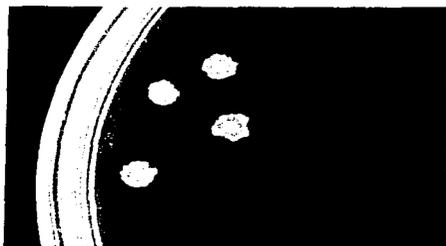


Figura 5.1.3. Colonias de *L. acidophilus* en el medio MRS en anaerobiosis, 37 °C, 48 horas.

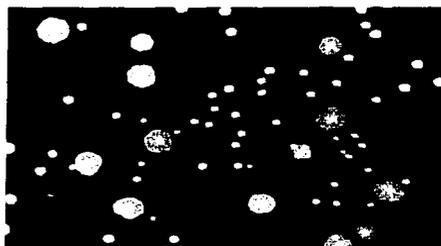


Figura 5.1.4. Colonias de *L. acidophilus* y *B. lactis* en el medio MRS mod en anaerobiosis, 37 °C, 48 horas.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

en los cultivo mixto. En este medio también se encontraron colonias de *S. thermophilus*, con apariencia estrelladas, planas y semitransparentes.

El medio MRS modificado ha sido empleado anteriormente por Desjardin y col. (1990) para favorecer el crecimiento de las bifidobacterias, debido a que contiene cisteína; este aminoácido provoca disminución del potencial redox del medio. Este medio de cultivo se utilizó para el conteo del cultivo mixto (ABY-1), incubando a 37 °C durante 48 horas en anaerobiosis. Se observó claramente la diferencia entre las colonias de *L. acidophilus* y *B. lactis* (Fig. 5.1.4). Las colonias de *L. acidophilus* eran redondas, planas, de bordes ondulados color blanco-crema y con una elevación que parece un punto en el centro de la colonia. Las colonias de *B. lactis* fueron características como las que se describen para el medio columbia-ac. propiónico. Aunque se dejó incubar este medio por 24 horas más, no se observó otro tipo de colonia usando un inóculo proveniente del cultivo mixto.

Al hacer la prueba de crecimiento de *L. delbrueckii ssp. bulgaricus* puro en este medio a 45 °C durante 96 h de incubación se encontró una morfología diferencial de las colonias, eran redondas, de bordes ondulados y rugosas, aparentando varias capas agrupadas formando la colonia (figura 5.1.6).

En el medio MRS-pH 5.2 crecieron *L. acidophilus*, *L. delbrueckii ssp. bulgaricus* y *B. lactis*. Dave y Shah (1996) encontraron que este medio era bueno para diferenciar entre *Bifidobacterium* y *L. delbrueckii ssp. bulgaricus*, incubando a 45 °C por más de 72 horas en anaerobiosis, sin embargo, en estas condiciones, la recuperación de *L. delbrueckii ssp. bulgaricus* fue de 1 a 2 logaritmos menor que en el medio MRS, por lo que en este estudio se probó en diferentes condiciones. A las 48 horas de incubación a 37 °C, las colonias de *B. lactis* y *L. delbrueckii ssp. bulgaricus* fueron similares, mientras que las de *L. acidophilus* presentaban una morfología característica (igual a la de MRS y MRS modificado). La única característica que hacía diferenciales las colonias de *B. lactis* y *L. delbrueckii ssp. bulgaricus* es que la primera presentaba una elevación cóncava uniforme,

mientras que la segunda tenía una elevación que parte del centro de la colonia. En cuanto al color y la forma eran iguales (Fig. 5.1.5). A las 96 horas de incubación las colonias de *L. delbrueckii ssp. bulgaricus* se volvían más oscuras y presentaban rugosidad en la superficie por lo que los bordes se veían “estrellados”, siendo fácilmente diferenciales de las colonias de *B. lactis*, mientras que las colonias de *L. acidophilus* conservaban su morfología (figura 5.1.7).

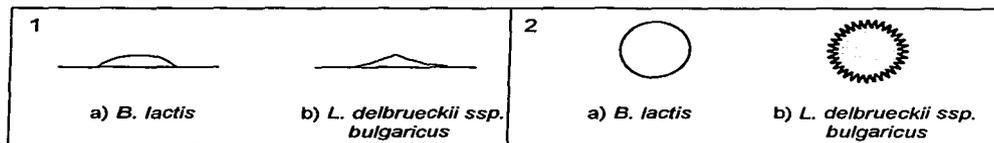


Figura 5.1.5. Morfología de las colonias de *B. lactis* y *L. delbrueckii ssp. bulgaricus* en agar MRS pH 5.2 a 37 °C. 1) Elevación antes de 72 h de incubación. 2) Bordes después de las 72 horas de incubación.

En la figura 5.1.8 se puede observar que en el medio MRS pH 5.2 a 45 °C, hubo un cambio en la morfología de las colonias de *L. acidophilus*, eran semitransparente a las 48 horas y a las 72 horas se ven dispersas en el medio. La morfología de las colonias de *L. delbrueckii ssp. bulgaricus* también cambió con la temperatura, se formaron colonias blancas con bordes ondulados, con una elevación en el centro de apariencia aterciopelada. Dave y Shah (1996), que emplean estas condiciones para el crecimiento diferencial de este microorganismo, describen a las colonias de este microorganismo como algodonosas. También la morfología de las colonias de *B. lactis* se vio afectada como se puede observar en la misma figura.

El medio MRS-NNL originalmente está diseñado para ser selectivo para bifidobacterias, sin embargo en los medio selectivos que emplean este tipo de antibióticos existe una disminución de un 40% a un 60% en la recuperación de los



Figura 5.1.6. Colonias de *A L. bulgaricus* y *B B. Lactis*, en el medio MRS mod en anaerobiosis a 45 °C, 96 horas.

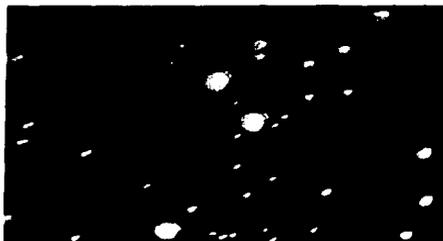


Figura 5.1.7. Colonias de *A B. Lactis*, *B L. bulgaricus* y *C L. acidophilus* en el medio MRS pH 5.2 en anaerobiosis a 37 °C, 96 horas.



Figura 5.1.8. Colonias de *A B. Lactis*, *B L. bulgaricus* y *C L. acidophilus*, en el medio MRS pH 5.2 en anaerobiosis a 45 °C, 96 horas.



Figura 5.1.9. Colonias de *L. bulgaricus* en el medio MRS-NNL en anaerobiosis a 45 °C, 96 horas.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

microorganismos (Dave y Shah, 1996), por lo mismo se empleó la solución de antibióticos en menor concentración, originalmente se emplean 5 ml/100 ml de medio de cultivo (Marlita y Bufford, 1989), en este estudio se emplearon 5 ml/1000 ml de medio de cultivo, es decir, se empleó 10 veces más diluido. Con esto se logró tener una recuperación similar de *B. lactis* que en los medio sin antibióticos (tabla 5.1.3), pero se perdió la selectividad al crecer también *L. acidophilus*. Las colonias de *B. lactis* en este medio de cultivo eran características al igual que las colonias de *L. acidophilus*.

En este medio *L. delbruekii ssp. bulgaricus* creció también presentando colonias de grandes a medianas, con bordes lisos, amorfas, un poco onduladas color blanca, con brillo y poca elevación, a contra luz se observaba un halo alrededor de la colonia. Cuando se incubaba este medio a 45 °C por más de 72 horas, crecieron colonias medianas con bordes irregulares que se encontraban punteadas y al parecer eran varias colonias, por lo que fue difícil definir el límite de la colonia y saber si había dos juntas (fig. 5.1.9).

Una vez probados los medios diferenciales se seleccionaron los medios MRS-modificado, MRS-pH 5.2 y MRS-NNL para la diferenciación de los lactobacilos y la especie de bifidobacteria presentes en el cultivo mixto ABY-1. Se hizo un conteo por gramo de producto de los cultivos comerciales en estos medios, con el fin de observar en cual se presentaba además de la diferenciación de las colonias de los microorganismos, una mayor recuperación de células viables.

#### Cuenta de *L. acidophilus*

La cuenta de células de *L. acidophilus* varió en los medios empleados de acuerdo al cultivo a partir del cual se hizo la cuenta. Como se puede observar en la tabla 5.1.2 para el cultivo individual La-5 se obtuvo mayor recuperación de microorganismos en el medio MRS modificado (MRS mod) con una cantidad de

11.01 log UFC/g. La diferencia del crecimiento en este medio con el del medio MRS NNL y el MRS pH 5.2 a 37 °C y 45 °C es de 0.1, 0.2 y 0.2 ciclos logarítmicos, respectivamente. Mientras que al realizar la cuenta de *L. acidophilus* por gramo de cultivo mixto ABY-1 se encontró mayor recuperación en el medio MRS pH 5.2 a 37 °C, 72 h, obteniéndose 10.3 log UFC/g, la diferencia con el crecimiento en el medio MRS mod a 37 °C y el MRS pH 5.2 a 45 °C es de 0.1 ciclos logarítmicos con cada medio; la mayor diferencia fue de 0.3 ciclos logarítmicos, que se presentó con el medio MRS mod a 45 °C. Los valores de los log de UFC entre cada medio empleado son muy cercanos y es muy similar la dispersión entre las cuentas en los diferentes medios, por lo que en general todas las condiciones y medios resultan aceptables para la cuenta de *L. acidophilus*.

Para este microorganismo fueron suficientes 48 horas de incubación en cualquier medio para obtener las colonias de morfología característica. A 45 °C como temperatura de incubación la colonia era casi transparente y difusa en el medio.

Tabla 5.1.2. Cuenta de *L. acidophilus* por gramo de cultivo puro (La-5) y mixto (ABY-1) en diferentes medios y condiciones de tiempo y temperatura. Todas las pruebas se realizaron en anaerobiosis.

Cultivo	Medio	Temperatura, tiempo	Colonia	UFC/g	log <sub>10</sub> UFC/g (log σ) <sup>a</sup>
La-5	MRS mod	37 °C, 48 h	Característica <sup>b</sup>	10.5x10 <sup>10</sup>	11.0 (0.05)
	MRS NNL	37 °C, 48 h	Característica <sup>b</sup>	82.3x10 <sup>9</sup>	10.9 (0.03)
	MRS pH 5.2	37 °C, 48 h	Característica <sup>b</sup>	68.3x10 <sup>9</sup>	10.8 (0.04)
		45 °C, 96 h	Característica <sup>b</sup> semitransparentes	67.310 <sup>9</sup>	10.8 (0.04)
ABY-1	MRS mod	37 °C, 48 h	Característica <sup>b</sup>	15.33x10 <sup>9</sup>	10.2 (0.18)
		45 °C, 96 h	Transparente y amorfa <sup>c</sup>	15.3x10 <sup>10</sup>	10.0 (0.58)
	MRS pH 5.2	37 °C, 72 h	Característica <sup>b</sup>	19x10 <sup>9</sup>	10.3 (0.08)
		45 °C, 96 h	Características <sup>b</sup> semitransparentes	14.6x10 <sup>9</sup>	10.2 (0.07)

<sup>a</sup>Log σ es a desviación estándar del logaritmo de UFC. Los datos que se presentan son el promedio de al menos dos experimentos.

<sup>b</sup>Colonias medianas de bordes ondulados, color blanco a crema, planas y con una pequeña elevación en el centro.

<sup>c</sup>Colonias medianas a grandes, dispersas en el medio, semitransparentes y con puntos blancos.

### Cuenta de *B. lactis*

La tabla 5.1.3 muestra que para el cultivo individual Bb-12 fue mayor la recuperación en el medio de cultivo MRS pH 5.2 a 37 °C durante 48 horas, 11.9 log UFC/g, lo cual difiere en tan solo 0.1 ciclos logarítmicos con la cuenta obtenida en MRS NNL, y en el MRS modificado. Se pudo ver en el caso del medio MRS pH 5.2 un ligero efecto de la temperatura sobre la viabilidad teniendo una diferencia de 0.1 ciclos logarítmicos entre los 37 °C y los 45 °C. Como se puede apreciar en la misma tabla, la dispersión de los resultados se mantuvo en un rango de 10.94 a 9.78. En el cultivo mixto ABY-1 también se obtuvo una mayor recuperación en el medio MRS pH 5.2 a 37 °C, la incubación durante más de 72 horas fue requerida para poder diferenciar las colonias de *B. lactis* y *L. delbrueckii ssp. bulgaricus* ya que antes de este tiempo las colonias vistas por la parte inferior de la caja eran similares.

Tabla 5.1.3. Cuenta de *B. lactis* por gramo de cultivo Bb-12 y ABY-1 en diferentes medios y condiciones de tiempo y temperatura. Todas las pruebas se realizaron en anaerobiosis.

Cultivo	Medio	Temperatura, tiempo	Colonia	UFC/g	log <sub>10</sub> UFC/g (log σ) <sup>a</sup>
Bb-12	MRS mod	37 °C, 48 h	Característica <sup>b</sup>	56.82x10 <sup>10</sup>	11.8 (0.07)
		45 °C, 48 h	Característica <sup>b</sup>	39x10 <sup>10</sup>	11.6 (0.05)
	MRS NNL	37 °C, 48 h	Un poco irregulares <sup>c</sup> bordes con elevación en el centro	66x10 <sup>10</sup>	11.8 (0.03)
	MRS pH 5.2	37 °C, 48 h	Características <sup>b</sup> pequeñas	75.8x10 <sup>10</sup>	11.9 (0.04)
45 °C, 72 h		Irregulares <sup>c</sup> pequeñas	61.710 <sup>10</sup>	11.8 (0.06)	
ABY-1	MRS mod	37 °C, 48 h	Característica <sup>b</sup>	15.3x10 <sup>10</sup>	11.2 (0.04)
		45 °C, 96 h	Irregulares <sup>c</sup> pequeñas	14x10 <sup>10</sup>	11.2 (0.02)
	MRS pH 5.2	37 °C, 96 h	Característica <sup>b</sup>	19x10 <sup>10</sup>	11.3 (0.02)
		45 °C, 96 h	Irregulares <sup>c</sup> pequeñas	12x10 <sup>10</sup>	11.1 (0.06)

<sup>a</sup>Log σ es la desviación estándar del logaritmo de UFC. Los datos que se presentan son el promedio de al menos dos experimentos.

<sup>b</sup>Colonias medianas de bordes lisos, color blanco a crema, con elevación y brillo.

<sup>c</sup>Las colonias irregulares eran colonias redondas con bordes estrellados en vez de lisos.

Cuenta de *L. delbrueckii ssp. bulgaricus*

La tabla 5.1.4 presenta los resultados obtenidos para la cuenta de *L. delbrueckii ssp. bulgaricus* en los cultivos mixtos ABY-1 que contiene las cuatro cepas y YC-380 que contiene solamente *L. delbrueckii ssp. bulgaricus* y *S. thermophilus*. Se empleó el medio MRS pH 5.2 en anaerobiosis para la cuenta por gramo de producto y para las cuentas de las fermentaciones, debido a que fue en este medio donde se encontraron la mejores condiciones de diferenciación de *L. delbrueckii ssp. bulgaricus* con *B. lactis* y *L. acidophilus*.

Se puede observar que en el medio a 37 °C se obtuvo una mayor recuperación de UFC que a 45 °C, además de una morfología menos confusa que fue más fácil de identificar, considerándose esta temperatura más adecuada que a 45 °C.

Tabla 5.1.4. Cuenta de *L. delbrueckii ssp. bulgaricus* por gramo de por gramo de cultivo YC-380 y ABY-1 en diferentes medios y condiciones de tiempo y temperatura. Todas las pruebas se realizaron en anaerobiosis.

Cultivo	Medio	Temperatura, tiempo	Colonia	UFC/g	log <sub>10</sub> UFC/g (DE) <sup>a</sup>
ABY-1	MRS pH 5.2	37°C, 96 h	Redondas, crema, elevación y bordes estrellados	8x10 <sup>9</sup>	9.9 (0.19)
		45 °C, 96h	Bordes ondulados sin forma, mediana, blanca, con aspecto algodonoso	4.66x10 <sup>9</sup>	9.7 (0.28)
YC-380	MRS pH 5.2	37°C, 72 h	Redonda, crema, con elevación en el centro, brillo	22.35x10 <sup>9</sup>	10.4 (0.10)

<sup>a</sup>Desviación estándar del logaritmo de UFC. Los datos que se presentan son el promedio de al menos dos experimentos.

Para eliminar factores que influyan en la viabilidad como la composición de los medios, se usó la cuenta por gramo de *L. acidophilus*, *B. lactis* y *L. delbrueckii ssp. bulgaricus*, obtenida en el medio MRS pH 5.2, como referencia para posteriormente añadir a las fermentaciones las cantidades equivalentes de los microorganismos a las presentes en el cultivo mixto ABY-1, ya que este medio proporciona una cuenta confiable de microorganismos presentes en los cultivos

**La-5, Bb-12 y YC-380. Por ese motivo se decidió emplear ese medio para la cuenta viable de estos tres microorganismos en las fermentaciones, además de ser el medio de cultivo donde se logró mejor la diferenciación de los lactobacilos y la bifidobacteria, y las cuentas de las UFC casi no varía en comparación con los otros medios probados.**

## 5.2 Fermentaciones

### 5.2.1 Fermentación del Cultivo Mixto YC-380 (*S. thermophilus* y *L. delbrueckii ssp. bulgaricus*)

La fermentación con este cultivo se llevó a cabo con el fin de ser empleada como control, ya que ha sido muy estudiada para la elaboración de yogurt (Goodenough y Kleyn 1975, Tamime 1981, Moreira y col. 2000). Debido a que no contiene los microorganismos probióticos, sirvió como referencia para la comparación de la fermentación con el cultivo mixto ABY-1.

El pH descendió de 6.44 a 4.18 después de 5 horas y la acidez aumentó de 12.12 a 76.51 °D, lo cual sobrepasó el parámetro de acidez establecido para el producto deseado, el cual era de 60 °D. A las cuatro horas se alcanzó

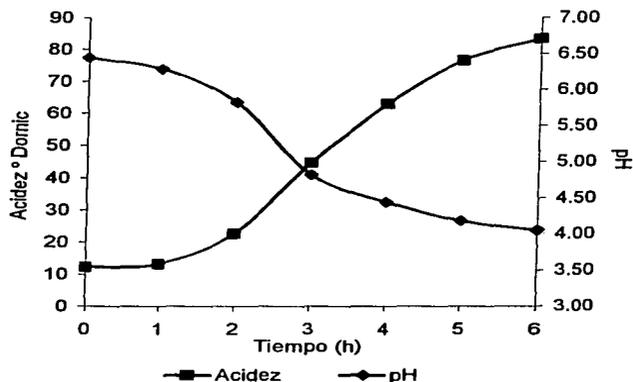


Figura 5.2.1.1. Cambio de pH y acidez (°D) durante la fermentación por el cultivo YC-380.

una acidez de 62.87 °D y un pH de 4.44 (fig. 5.2.1.1), por lo que ese fue el tiempo estimado para obtener el producto deseado fue a las 4 horas.

El crecimiento de los microorganismos *L. delbrueckii ssp. bulgaricus* y *S. thermophilus*, que conforman este cultivo, fue característico de la fermentación en leche (fig. 5.2.1.2). *S. thermophilus* presentó la fase exponencial de crecimiento desde el inicio de la fermentación. Su concentración aumentó de 5.94 a 8.92 log UFC/ml, con un incremento de 2.98 ciclos logarítmicos después de cuatro horas de fermentación. Alcanzó la fase estacionaria de crecimiento a las tres horas, con una concentración de 8.79 log UFC/ml. *L. delbrueckii ssp. bulgaricus* aumentó su concentración de 5.79 a 8.38 log UFC/ml, presentando un incremento de 2.59 ciclos logarítmicos. Su fase exponencial inició al rededor de las dos horas y alcanzó la fase estacionaria a las 4 horas, la concentración permaneció igual hacia la siguiente hora (8.38 log UFC/ml).

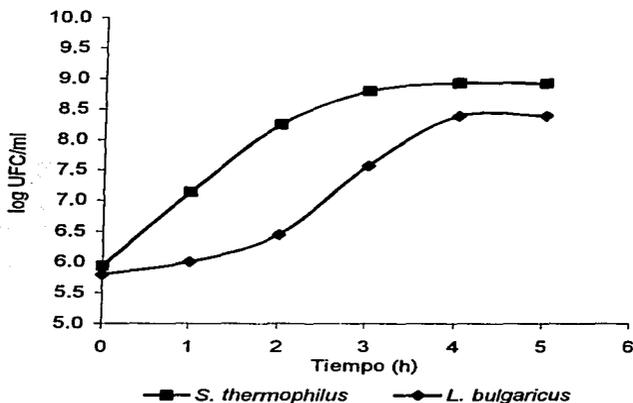


Figura 5.2.1.2. Crecimiento de los microorganismos presentes en el cultivo YC-380 durante la fermentación (rango de dispersión: 0.01 a 0.05).

### Concentración de proteínas

La tabla 5.2.1 muestra el cambio de la concentración de proteínas, de la leche a lo largo de la fermentación. Se muestran los valores estimados, a partir de un factor de corrección para la curva de calibración obtenida (ver apéndice IV), así como el incremento en la concentración de proteína entre cada tiempo.

Tabla 5.2.1 Concentración de proteína durante la fermentación con el cultivo YC-380 (rango de desviación estándar de 0.01a 0.07).

Tiempo (h)	0	1	2	3	4	5
% Proteína estimado	3.80	4.12	4.37	4.86	4.86	4.93
Incremento		0.32	0.57	1.06	1.06	1.13

La concentración relativa de proteínas presente en la base láctea al inicio de la fermentación fue de 3.8%. Desde entonces hubo un incremento en la concentración de proteína en el medio, llegando a una concentración final de 4.93%. El incremento total fue de 1.13%

Al comparar el crecimiento de *S. thermophilus* a lo largo de la fermentación (fig. 5.2.1.2), con el incremento de la concentración de proteína, se puede pensar que están relacionados; ya que el microorganismo sintetiza proteínas que son liberadas al medio. Así mismo, el aumento de proteína entre la segunda y la tercera hora de fermentación (% de proteína de 4.37 a 4.86), coincide también con la fase de crecimiento exponencial de *L. delbrueckii ssp. bulgaricus*. Por otro lado, se sabe que a pH mayor de 5.4 las micelas de caseína mantienen su estado nativo (García-Garibay y col., 1993), en la curva de pH (fig. 5.2.1.1), se puede observar que durante las primeras 2 horas de fermentación el pH se encuentra en valores mas altos. Posteriormente el pH desciende de 6.28 a 4.8, período en el cual podría comenzar la disociación de las submicelas, exponiendo las caseínas y contribuyendo a una lectura más alta de proteínas en el medio; lo anterior debido a que el Milko-scan determina la cantidad de enlaces peptídicos, los cuales por la

disgregación de las micelas posiblemente aumenten su exposición dando una mayor lectura.

Después de las tres horas de fermentación, casi no aumentó la concentración de proteínas (4.92% a las 5 horas). A partir de las tres horas, *S. thermophilus* detiene su crecimiento, y *L. delbrueckii ssp. bulgaricus* deja de crecer a las cuatro horas; por lo que la disminución en la concentración de proteína puede deberse a la disminución de la síntesis de proteínas por los microorganismos. Otra posibilidad, por la cual ya no aumenta el contenido de proteína, es que debido a que el pH se encuentra entre 4.8 y 4.3 las caseínas se reagrupan formando un gel; con lo que se estabilizan las caseínas que estaban disueltas en el medio (García-Garibay y col. 1993, Belitz 1997).

En cuanto a la capacidad de los microorganismos del yogurt para asimilar proteínas, se sabe que el sistema proteolítico de *S. thermophilus* cuenta con proteasas, un sistema de transporte de oligopéptidos y peptidasas; que en conjunto permiten que este microorganismo crezca en leche. Este sistema le permite a *S. thermophilus* asimilar péptidos de 3 a 23 aminoácidos, con una preferencia para los oligopéptidos con características hidrofóbicas (Garault y col 2002). Por otro lado, se sabe que *L. delbrueckii ssp. bulgaricus* actúa sobre la  $\alpha$ -,  $\beta$ - y  $\kappa$ -caseína a una temperatura óptima de 45 °C, y cuando la temperatura es de 40 °C es menor la actividad (Fira y col. 2002); la temperatura utilizada en este caso fue de 43 °C, lo cual pudo disminuir la actividad proteolítica de *L. delbrueckii ssp. bulgaricus*.

Moreira y col. (2000), en una prueba con leches fermentadas con *L. delbrueckii ssp. bulgaricus* y *S. thermophilus* comprobaron el comportamiento cooperativo entre estas cepas debido a los productos de la actividad proteolítica del lactobacilo que se identificaron como factores de crecimiento para el estreptococo, y del mismo modo observaron que el lactobacilo es estimulado

por el CO<sub>2</sub> y el ácido fórmico producidos por el estreptococo (aunque estos dos microorganismos por sí solos crecen bien en leche).

### Consumo de Azúcares

Los resultados obtenidos por HPLC para la determinación de azúcares a lo largo de la fermentación se muestran en la figura 5.2.1.3. Haciendo la suma de los azúcares determinados (lactosa, glucosa y galactosa) se encontró al inicio de la fermentación una concentración de azúcares totales de 5.00% y al final de la misma 3.08%.

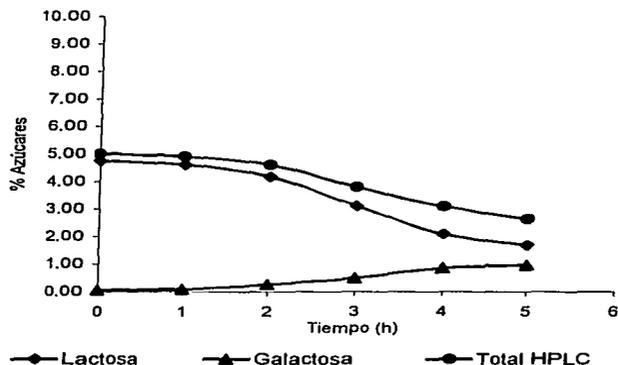


Figura 5.2.1.3. Concentración de azúcares durante la fermentación por el cultivo YC-380.

En la misma figura se puede apreciar que la lactosa disminuyó su concentración de 4.75 a 1.68% ya que fue metabolizada por los microorganismos en glucosa y galactosa. Entre las 2 y las 4 horas hubo un aumento en la velocidad de consumo de lactosa. Este período coincide con el crecimiento de *L. delbrueckii*

*ssp. bulgaricus* en su fase exponencial. La concentración inicial de galactosa fue de 0.06% y al final de la fermentación era de 0.85%, lo que indica que al inicio de la fase estacionaria aún había actividad de la enzima  $\beta$ -galactosidasa.

Goodenough y Kleyn, (1975), describen que la microflora del yogurt (*S. thermophilus* y *L. delbrueckii ssp. bulgaricus*) hidroliza la lactosa de la leche obteniendo glucosa para su metabolismo, la galactosa es excretada al medio a una velocidad que coincide con la de la hidrólisis de la lactosa, ya que no es metabolizada por éstos microorganismos (excepto en condiciones extremas). Esto mismo se observa en la figura anterior, donde hay un aumento de la concentración de galactosa casi desde el inicio de la fermentación hasta el final de ésta, mientras la lactosa es consumida. También se observa que entre las cuatro y las cinco horas de fermentación hay una disminución de la producción de galactosa y de consumo de lactosa, lo que indica que la galactosa se acumula en el medio.

#### *Producción de ácido láctico*

El porcentaje de ácido láctico determinado por HPLC tiene ligeras variaciones en comparación con la acidez titulable obtenida (fig. 5.2.1.4). Hay una diferencia en cuanto a la concentración inicial de ácido: por HPLC se determinó 0.00% y por acidez titulable 0.12%. Al final de la fermentación las concentraciones determinadas fueron muy similares 0.77% y 0.63% respectivamente.

El comportamiento de la curva de producción de ácido coincidió con el descenso de lactosa en el medio como ya se mencionó en el consumo de azúcares.

Además del ácido láctico, en la leche se encuentran otros ácidos orgánicos como el ácido cítrico (1.8 g/l) que se degrada rápidamente en la leche sin tratar. Otros ácidos presentes en la leche son el ácido orótico (73 mg/ml), y el ácido

úrico, el primero es un producto intermedio de la biosíntesis de los nucleótidos de pirimidina. Los dos últimos ácidos se emplean como indicadores de la fracción láctea en alimentos, en leche desnatada en polvo el ácido orótico debe ser de 66.4 a 58.1 mg/100g (peso seco) y el ácido úrico debe ser de 15.3 mg/100g (Belitz 1997). Estos ácidos reaccionaron con la sosa, por lo cual al inicio de la fermentación ya se presentó cierto grado de acidez.

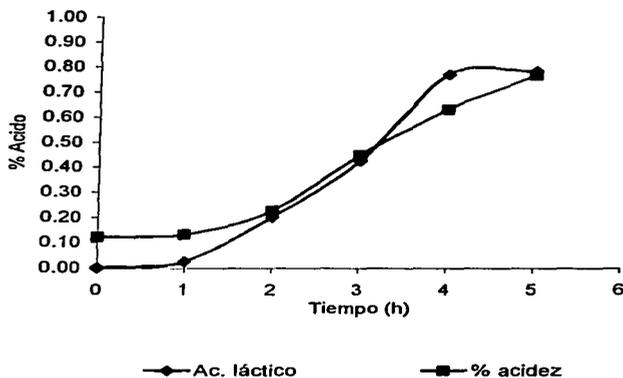


Figura 5.2.1.4. Producción de ácido láctico durante la fermentación del cultivo YC-380.

### **5.2.2 Fermentación del Cultivo Mixto ABY-1 (*S. thermophilus*, *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *B. lactis* y *L. acidophilus*)**

Este cultivo está compuesto por los microorganismos empleados para la elaboración del yogurt y los microorganismos probióticos *B. lactis* y *L. acidophilus*. Al igual que en la fermentación anterior la acidez es el parámetro que se fijó para determinar el fin de la fermentación (60 °D). Como se observa en la figura 5.2.2.1,

al inicio de la fermentación era de 13.34 °D, a las 5 horas llegó a 66.95 ° Dornic, por lo que a este tiempo se dio por terminada la fermentación. Los resultados se presentan hasta las 6 horas, con el fin de observar algún cambio o tendencia en los parámetros estudiados. En la misma figura se observa que el pH descendió de 6.64 a 4.25 hasta las 5 horas y se mantuvo durante la siguiente hora en ese valor, sin embargo, la acidez aumentó.

El producto obtenido fue una leche fermentada con una viscosidad aceptable, sin sinéresis, de aroma y sabor agradables. Es conveniente que el producto no presente sinéresis ya que se elabora como base para preparar una bebida láctea fermentada.

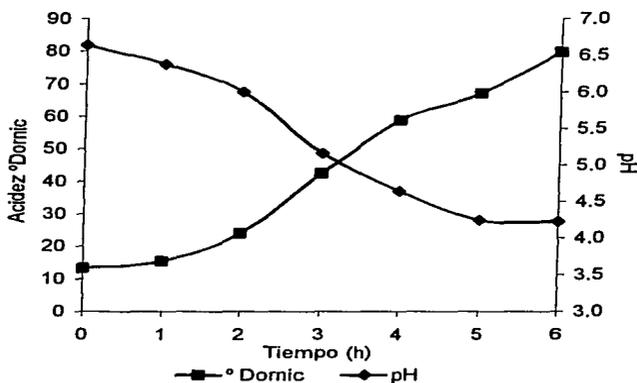


Figura 5.2.2.1. Cambio de pH y acidez durante la fermentación por el cultivo ABY-1.

Con respecto al crecimiento, *S. thermophilus* desde el inicio del período de incubación presentó una fase logarítmica de crecimiento partiendo de una concentración de 5.59 log UFC/ml, lo cual indica que es el microorganismo que

inició la fermentación, además este microorganismo alcanzó rápidamente la fase estacionaria después de dos horas (figura 5.2.2.2). Entre las cuatro y las cinco horas de fermentación mantuvo una concentración de 8.69 log UFC/ml. El incremento total hasta las cinco horas en la cuenta fue de 3.10 log UFC/ml.

El siguiente microorganismo que alcanzó la fase logarítmica fue *L. delbrueckii ssp. bulgaricus* que a pesar de iniciar la fermentación en una concentración similar a la de *S. thermophilus*, 5.64 log UFC/ml, alcanzó esta fase después de la primera hora de incubación. En cuanto a la fase estacionaria se detectó entre las 5 y las 6 horas alcanzando una concentración de 8.24 log UFC/ml y 8.47 log UFC/ml respectivamente, lo cual fue similar a la final de *S. thermophilus* 8.76 log UFC/ml. Su concentración aumentó en total 2.67 log UFC/ml. El comportamiento de estos dos microorganismos es típico de un cultivo mixto para elaborar yogurt que contiene únicamente estos dos microorganismos (Tamime, 1981). Al dejar la fermentación hasta 6 horas (1 h más) se llegó hasta 80 °D que son los requeridos para obtener un producto con las características del yogurt. El producto obtenido en este caso presentó un poco de sinéresis y tiene características sensoriales agradables.

*L. acidophilus* aumentó su concentración de 5.77 a 6.6 log UFC/ml y a comparación de los otros dos microorganismos su crecimiento no alcanzó la fase logarítmica en ese período de incubación. El incremento fue de 0.82 log UFC/ml. Durante este período no presentó fase de crecimiento exponencial.

*B. lactis* incrementó su concentración de 07.01 a 7.27 log UFC/ml. Hubo un descenso en su crecimiento hacia la segunda hora de fermentación. Hacia la tercer hora se observó una recuperación de la viabilidad del microorganismo, que coincide con la fase de crecimiento exponencial de *L. delbrueckii ssp. bulgaricus*. Sin embargo en el transcurso de las 5 horas de fermentación, inclusive en las 6 horas no se desarrolló de manera exponencial en el medio.

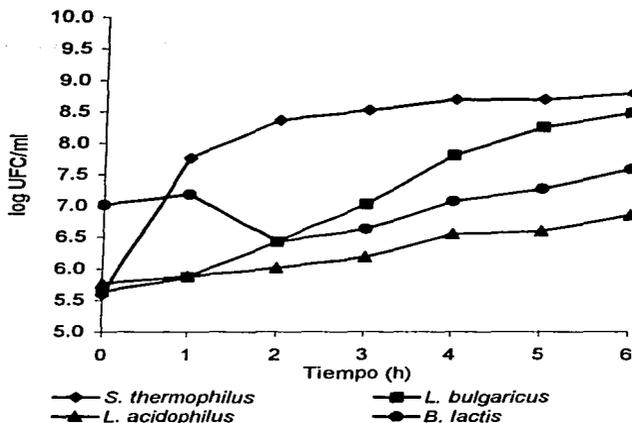


Figura 5.2.2.2. Crecimiento de los microorganismos presentes en el cultivo ABY-1 durante la fermentación (rango de desviación estándar de 0.002 a 0.09).

### Concentración de proteína

En la tabla 5.2.2 se observa el ascenso de la concentración de proteína estimada, a lo largo de la fermentación. De una concentración inicial de 3.89% se llegó al 5.18%. Hay un aumento notable entre las 2 y las 3 horas, de 4.12% a 4.99%, posiblemente la contribución a este aumento se produce por la liberación de proteínas a consecuencia del crecimiento de los microorganismos; ya que en este período, *L. delbrueckii ssp. bulgaricus* se encuentra en la fase exponencial de crecimiento, y *S. thermophilus* entra en la fase estacionaria de crecimiento. Por otro lado, en este periodo de tiempo el pH descendió de 6.00 a 5.16 (fig. 5.2.21). Según García-Garibay y col. (1993) cuando el pH alcanza valores de 5.1, las partículas de caseína sufren disociaciones parciales formando subpartículas;

posiblemente, estas submicelas son también responsables del aumento en el porcentaje de proteínas en el medio.

Tabla 5.2.2. Concentración de proteínas lo largo de la fermentación por el cultivo ABY-1 (rango de desviación estándar de 0.01a 0.07).

Tiempo (h)	1	2	3	4	5	6	7
% Proteínas estimado	3.89	3.90	4.12	4.99	5.04	5.13	5.18
Incremento		0.013	0.23	1.11	1.16	1.24	1.29

Como se explicó anteriormente, la fase exponencial de crecimiento de *L. delbrueckii ssp. bulgaricus* coincidió con el ligero incremento en la población de *B. lactis*. Es posible que los péptidos y aminoácidos obtenidos por la acción de las proteasas y peptidasas de *L. delbrueckii ssp. bulgaricus* y *S. thermophilus* hayan sido asimilados parcialmente por *B. lactis*, aunque aparentemente de forma poco eficiente. Como se mencionó en la sección anterior, *S. thermophilus* posee un sistema de transporte de oligopéptidos que va de 3-23 aminoácidos, que posiblemente pone a *B. lactis* en desventaja en cuanto a la disponibilidad de péptidos pequeños. Gomes y col. (1998) mencionan que *B. lactis* tiene actividad proteolítica baja en leche y este microorganismo requiere de péptidos de menos de 2000 Da y de 500 Da para ser fácilmente asimilables, además de un complejo requerimiento de aminoácidos los cuales la leche no provee en forma libre.

### Consumo de azúcares

Se determinó un total de azúcares inicial de 5.37% y al final de la fermentación 3.82% lo cual indicó un descenso del 1.55% de azúcares totales (figura 5.2.2.3).

El consumo de lactosa fue de 5.13 a 3.15%. Este siguió el mismo comportamiento que el aumento de la acidez y descenso de pH, los cuales después de la primera hora de fermentación aumentaron su velocidad. Durante

este período hubo un aumento en la concentración de galactosa en el medio, de 0.01 a 0.67%, que es uno de los productos de hidrólisis de la lactosa. De los cuatro microorganismos presentes en el cultivo ABY-1 únicamente *B. lactis* es capaz de metabolizar galactosa; se sabe que los lactobacilos y *S. thermophilus* no consumen la galactosa (Johnson y Steele 1997, Marshall 1992). Se puede observar que en la curva de crecimiento de *B. lactis* hubo un aumento en la cuenta de este microorganismo que coincidió con la aparición de galactosa, lo que sugiere que además de haber sido posiblemente beneficiado por los productos casiolíticos que generan los otros microorganismos, fue beneficiado por la disponibilidad de azúcares que se generaron en el medio.

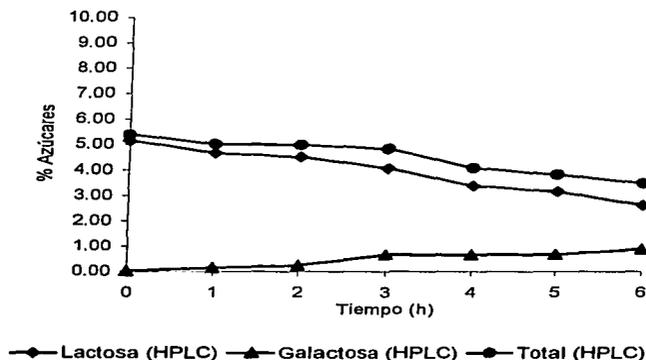


Figura 5.2.2.3. Cambio en la concentración de azúcares, durante la fermentación por el cultivo ABY-1.

### Producción de ácidos

En la figura 5.2.2.4 se observa que la acidez titulable que se determinó al inicio de la fermentación fue de 0.13% y al final de la fermentación fue de 0.67%.

Mientras por HPLC no se detectó la presencia de ninguno de los dos ácidos en cuestión al inicio de la fermentación y se obtuvo al final de la fermentación un porcentaje de ácido láctico de 0.61% y 0.02% de ácido acético.

La baja concentración de ácido acético, en comparación con la cantidad de ácido láctico producido, se debió al escaso desarrollo de *B. lactis* a lo largo de la fermentación.

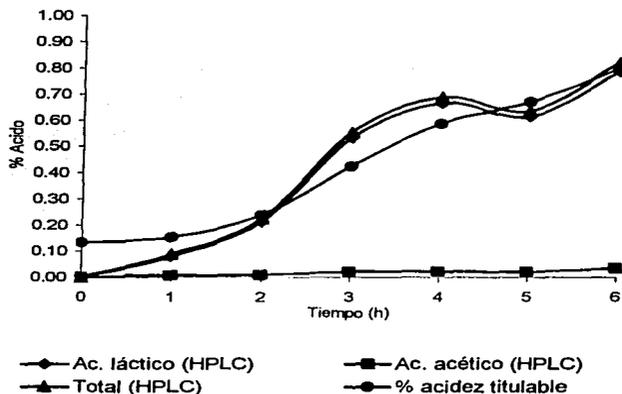


Figura 5.2.2.4. Producción de ácido láctico y ácido acético durante la fermentación por cultivo ABY-1, se muestran los resultados obtenidos por acidez titulable y HPLC.

Al final de la fermentación la acidez titulable fue un poco menor al total de ácidos determinados por HPLC, 0.67% y 0.64% respectivamente. Esto se puede explicar por la sensibilidad del método, ya que el segundo es más sensible que el primero y puede detectar cantidades más pequeñas con mayor precisión.

### 5.2.3 Comparación de las fermentaciones por los cultivos ABY-1 y YC-380

Comparando la fermentación por el cultivo ABY-1 con la fermentación con el YC-380, se encontró que esta última finalizó una hora antes. En la figura 5.2.3.1 se aprecia que a las 5 horas de fermentación el cultivo ABY-1 alcanzó un pH de 4.25 y acidez de 66.45 °D mientras que el cultivo YC-380 a las 4 horas alcanzó un pH de 4.44 y acidez de 62.88%, a las 5 horas de fermentación de este último cultivo el pH descendió hasta 4.18 y la acidez llegó a 76.51%, lo cual sobrepasa los parámetros establecidos para el final de la fermentación.

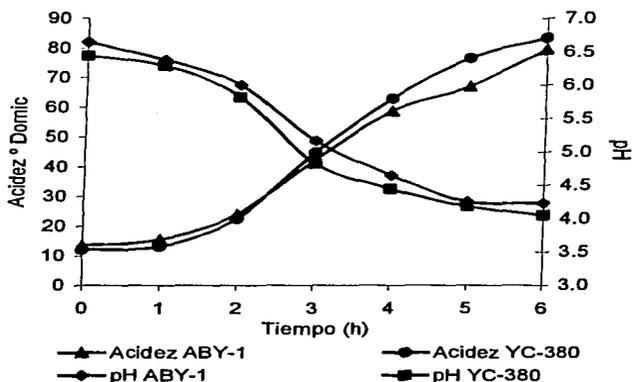


Figura 5.2.3.1. Descenso de pH y cambio en la acidez durante las fermentaciones por los cultivos ABY-1 y YC-380.

En la fermentación con el cultivo ABY-1, desde el inicio, fue notable para *L. delbrueckii ssp. bulgaricus* la fase logarítmica y con el YC-380 comenzó entre la primera y la segunda hora (fig. 5.2.3.3). A pesar de eso se llegó a una concentración muy similar de UFC/ml: 8.24 log UFC/ml con el cultivo ABY-1 y con

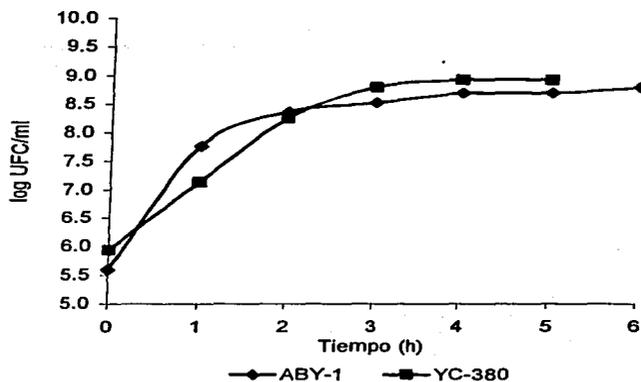


Figura 5.2.3.2. Crecimiento de *S. thermophilus* durante las fermentaciones por los cultivos ABY-1 y YC-380.

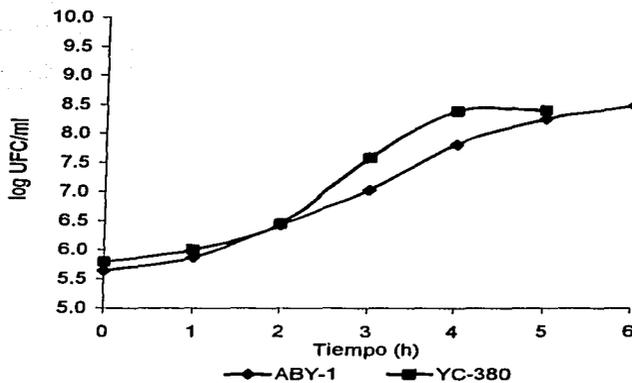


Figura 5.2.3.3. Crecimiento de *L. delbrueckii ssp. bulgaricus* durante las fermentaciones por los cultivos ABY-1 y YC-380.

el cultivo YC-380 8.39 log UFC/ml. *S. thermophilus* creció hasta 8.69 log UFC/ml con el cultivo ABY-1 y con el YC-380 hasta 8.92 log UFC/ml, presentó la fase exponencial de crecimiento desde el inicio de ambas fermentaciones (figura 5.2.3.2). El incremento para *L. delbrueckii ssp. bulgaricus* en las fermentaciones con los cultivos ABY-1 y YC-380, fue de 2.6 y 2.5 ciclos log, respectivamente. El incremento para *S. thermophilus* en estos cultivos fue de 3.1 y 2.99 ciclos log, respectivamente.

Como se observa en la figura 5.2.3.1, la acidez es muy similar a las 3 horas de fermentación para entre ambos cultivos, lo que difiere es el pH. Entre la segunda y la tercera hora de fermentación es mayor el descenso de pH con el cultivo YC-380 (6.3-4.8) que en con el ABY-1 (6-5.16). Sin embargo, en la tabla 5.2.3 se observa que entre estos dos tiempos, el aumento en la proteína fue mayor durante la fermentación con el cultivo ABY-1 que con el YC-380.

Tabla 5.2.3. Incremento de la concentración de proteínas durante la fermentación de los cultivos ABY-1 y YC-380.

Tiempo (h)	1	2	3	4	5	6
Incremento por el cultivo ABY-1 (%)	0.01	0.23	1.11	1.16	1.24	1.29
Incremento por el cultivo YC-380 (%)	0.32	1.06	1.06	1.06	1.13	

A pesar de haber sido ligeramente menor el crecimiento de los cultivos iniciadores del yogurt en la fermentación por el cultivo YC-380, que con el ABY-1, el consumo de lactosa (figura 5.2.3.4) y la producción de ácido (figura 5.2.3.5) fue mayor para el cultivo que no contenía los microorganismos probióticos.

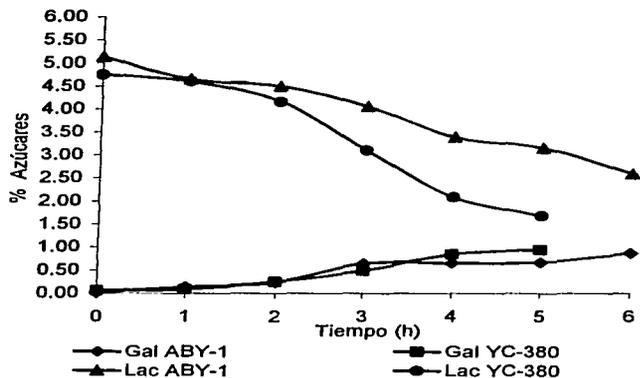


Figura 5.2.3.4. Consumo de lactosa y producción de galactosa, durante las fermentaciones con los cultivos ABY-1 y YC-380.

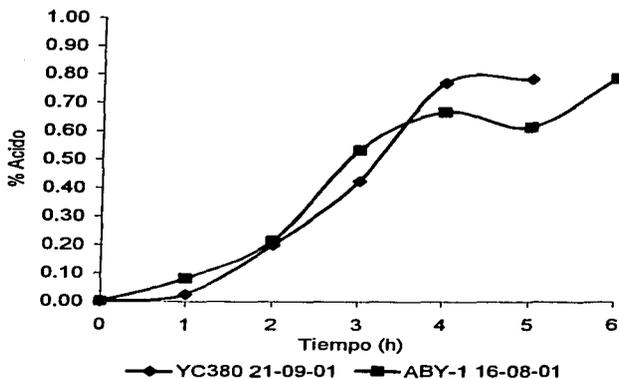


Figura 5.2.3.5. Producción de ácido láctico, determinado por HPLC, durante las fermentaciones con los cultivos ABY-1 y YC-380.

El hecho de haber sido más corta la fermentación para el cultivo YC-380, que solamente contenía *S. thermophilus* y *L. delbrueckii ssp. bulgaricus*, que la fermentación del cultivo ABY-1 que contenía además de estos dos microorganismos *L. acidophilus* y *B. lactis* indica que existe un posible efecto negativo de las cepas probióticas sobre las primeras, posiblemente sea competencia o quizá se deba a la presencia de ácido acético.

#### **5.2.4 Fermentación del cultivo Bb-12**

La fermentación de este cultivo se llevó a cabo durante 6 horas para observar las tendencias durante una hora más de incubación, aunque se considera terminada a las 5 horas al igual que el caso del cultivo ABY-1.

Durante las 5 horas de fermentación el pH disminuyó de 6.57 a 6.08 y la acidez cambió de 11.11 a 15.15 °Dornic. Ambos parámetros son muy bajos en comparación a los obtenidos en la fermentación del cultivo ABY-1, lo cual comprobó la baja capacidad fermentativa de *B. lactis* en leche (figura 5.2.4.1). La poca producción de ácido y cambio de pH en el medio se debió al escaso desarrollo de este microorganismo en la leche. Así mismo, esto se reflejó en el bajo consumo de azúcares.

*B. lactis* creció de 7.36 a 7.64 log UFC durante la fermentación del cultivo Bb-12. Como se observa en la figura 5.2.4.2 el número de células permaneció casi constante. En la misma figura también se observa que mientras hubo un ligero descenso de la población de *B. lactis* en el cultivo ABY-1 (de 7.01 a 6.42 log UFC) a las 2 horas de iniciada la fermentación, en el cultivo individual no se presentó este comportamiento. El incremento en la fermentación del cultivo Bb-12 fue de 0.28 ciclos logarítmicos, ligeramente mayor al obtenido en el cultivo ABY-1 (0.25

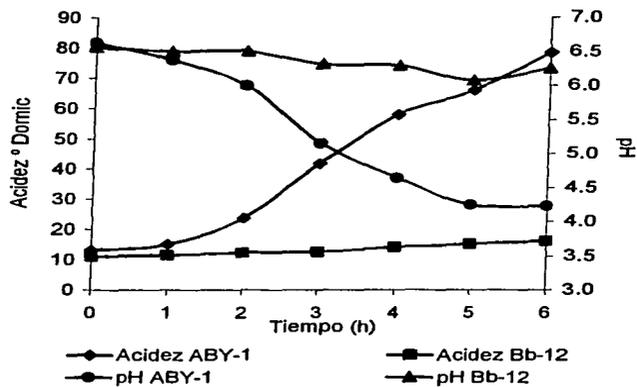


Figura 5.2.4.1 Cambio de pH y acidez durante la fermentación por el cultivo Bb-12 y la fermentación por el cultivo ABY-1.

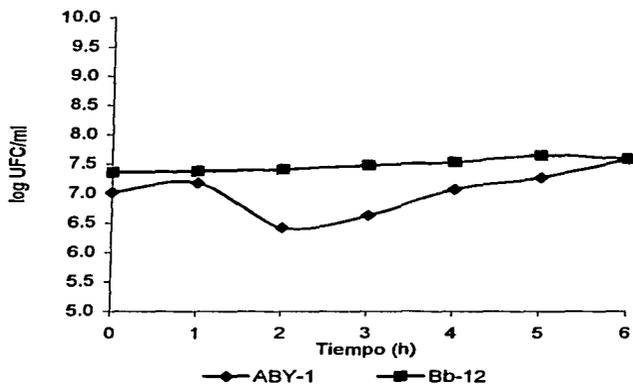


Figura 5.2.4.2. Crecimiento de *B. lactis* durante la fermentación por el cultivo Bb-12 y durante la fermentación por el cultivo ABY-1.

ciclos logarítmicos). En el cultivo mixto considerando el incremento a partir de la segunda hora de fermentación, donde se registró el descenso de la población, y hasta el final de la fermentación, el incremento resultó ser de 0.85 log UFC.

En comparación con el caso del cultivo mixto ABY-1, como se puede observar en la tabla 5.2.4, *B. lactis* presentó un cambio muy pequeño en la concentración de proteína, durante el periodo de incubación establecido en este ensayo (de 3.32% a 3.77%).

Tabla 5.2.4. Cambio de la concentración de proteínas durante las fermentaciones con los cultivos ABY-1 y Bb-12.

Tiempo (h)	% Proteínas ABY-1	Incremento	% Proteínas Bb-12	Incremento
0	3.89		3.32	
1	3.90	0.01	3.60	0.28
2	4.12	0.23	3.69	0.36
3	4.99	1.11	3.67	0.35
4	5.04	1.16	3.62	0.30
5	5.13	1.24	3.76	0.44
6	5.18	1.29	3.77	0.45

Durante la fermentación con el cultivo Bb-12, la acidez casi no cambió y el pH se mantuvo en el orden de 6, teóricamente a este pH no hay modificaciones de las caseínas. Por otro lado, el crecimiento de *B. lactis* durante la fermentación en leche por el cultivo Bb-12 (fig. 5.2.4.2), se mantuvo constante; lo anterior indica que la tasa de crecimiento de este microorganismo es la misma que la de mortandad, como suele suceder en la fase estacionaria de los microorganismos

Se han realizado diversos estudios acerca del crecimiento del género *Bifidobacterium* en leche, encontrándose que su desarrollo en este medio es escaso. Samona y col. 1996, reportaron que varias cepas de *B. bifidum*, *B. longum* y *B. adolescenti*) durante su fermentación en leche a 37 °C, disminuyeron su población durante las primeras 6 horas, posteriormente hubo un aumento en la

concentración de las células, pero a las 24 horas que realizaron las fermentaciones no se logró recuperar la concentración inicial de células para ninguna de las cepas probadas.

Gomes y col. 1998, realizaron un ensayo en leche, enriqueciéndola dos tipos de hidrolizados de caseína para el crecimiento de *B. lactis*. Uno se obtuvo por la enzima neutrasa de *Bacillus subtilis* (MHN) y el otro hidrolizado se preparó con la una proteasa de *Aspergillus sp.* (MHP). Encontraron que en la leche adicionada con los hidrolizados *B. lactis* presentó un aumento de biomasa y de producción de ácido en comparación con los obtenidos en la leche normal, sugiriendo que el bajo crecimiento de *B. lactis* en leches se debe parcialmente a la carencia de péptidos pequeños y aminoácidos libres en el medio.

En otro estudio por Dave y Shah (1998) sobre la viabilidad de *Bifidobacterium* (no especifican la especie) durante su fermentación en un cultivo mixto (*L. delbrueckii ssp. bulgaricus*, *L. acidophilus* y *Bifidobacterium*, Christian-Hansen) en leche, por un período de 24 horas a 37 °C, se encontró que *Bifidobacterium* aumenta su viabilidad durante las primeras 6 horas de incubación de 6.65 a 6.92 log UFC, pero a las 24 descendió hasta 4.10 log UFC. Sugieren que los péptidos y aminoácido mejoran la viabilidad de bifidobacteria en el yogurt elaborado con el cultivo compuesto de estos tres microorganismos.

Por otro lado, Baron y col. (2000) concluyen que el aumento del contenido de proteínas en la leche no mejora el crecimiento de las cepas de *B. bifidum*, *B. breve*, *B. infantis*, y *B. longum*. Además observaron que la temperatura es un factor que afecta el crecimiento de estos microorganismos en leche (mejor crecimiento a 35 °C que a 30 °C).

Aunque son pocos los estudios realizados referentes a la actividad proteolítica de *Bifidobacterium* en leche, se ha encontrado que algunas especies de

bifidobacterias como *B. infantis*, *B. longum* y *B. adolescentis* presentan aminopeptidasas, dipeptidasas y tripeptidasas, así como actividad de carboxipeptidasas (Abu-Tarboush 1998), pero no se encontró información referente al sistema de transporte.

Por los estudios realizados anteriormente, se puede decir que una vez activas las enzimas proteolíticas de *L. delbrueckii ssp. bulgaricus* y *S. thermophilus* durante la fermentación por el cultivo ABY-1, posiblemente *B. lactis* se ve beneficiado por los productos de la hidrólisis que se liberan al medio (péptidos y aminoácidos), aunque por el escaso crecimiento de las bifidobacterias no es suficiente la presencia de estos productos en el medio para que *B. lactis* tenga un desarrollo óptimo.

En una fermentación que se realizó con el cultivo Bb-12 en anaerobiosis (no se muestran resultados), se encontró que en 10 horas de fermentación en la base láctea se obtuvo un incremento de 7.21 a 8.92 log de UFC, pero después hubo un descenso hacia las 24 horas hasta 7.85 log UFC/ml, mientras que en otra fermentación realizada en aerobiosis a las doce horas se había incrementado la concentración de 6.89 a 7.00 log de UFC/ml, después de este tiempo presentó una ligera fase logarítmica donde a las 18 horas se presentó un incrementó máximo en la población de 7.83 log UFC; hacia las 21 horas comenzó el descenso de la población. Debido a que el incremento fue mayor en la fermentación en anaerobiosis, así como menor el tiempo de la fase estacionaria, el crecimiento de *B. lactis* en leche es mejor en condiciones anaerobias, es probable que durante la fermentación con el cultivo mixto el CO<sub>2</sub> producido por *S. thermophilus* propicie la anaerobiosis en el medio y promueva el desarrollo de las bifidobacterias.

En la figura 5.2.4.3, se aprecia que la lactosa presentó un ligero aumento, que quizá se deba a la presencia de glucosa, que es el componente inmediato a la

lactosa en ser separado en la columna y determinado por el detector; por lo que la cantidad de lactosa pudo haber sido sobrestimada. También se puede observar un descenso de la concentración de galactosa a lo largo de la fermentación. La concentración inicial era de 0.56% y la final de 0.07%, lo cual posiblemente indica que este azúcar fue metabolizado por el microorganismo. Comparando estos resultados con los obtenidos en el cultivo mixto ABY-1, se aprecia que la fermentación de lactosa por este microorganismo en leche es muy baja, lo cual se debe a su escasa capacidad de crecimiento en este medio.

Las cantidades de ácidos producidos por *B. lactis* en leche, determinadas por HPLC, son bajas debido al bajo desarrollo del microorganismo en la leche. Durante la fermentación por el cultivo Bb-12, el ácido láctico se encontraba en un concentración inicial de 0.02% y llegó al final de la fermentación a 0.03%. El ácido acético se produjo en cantidades mayores: de 0.01% a 0.05%. El porcentaje obtenido por el método de acidez titulable fue de 0.11% a 0.15%, mucho mayor a la cantidad de ácidos determinados por HPLC: 0.03% a 0.08%.

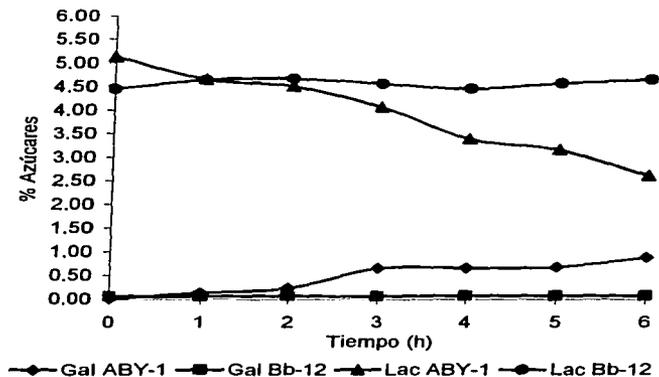


Figura 5.2.4.3. Consumo de lactosa y producción de galactosa, durante las fermentaciones con los cultivos Bb-12 y ABY-1 .

La producción de ácido láctico y acético no fue constante durante la fermentación con el cultivo Bb-12. Samona y col. (1996), señalan que no hay una relación entre el crecimiento y la producción de ácidos para diferentes cepas de bifidobacterias durante su fermentación en leche (48 horas).

En las figuras 5.2.4.4 y 5.2.4.5 se puede observar que no existe una relación entre la producción de ácido y el crecimiento en el cultivo individual de *B. lactis*. En la fermentación con el cultivo ABY-1 la producción de ácido acético estuvo más relacionada con el crecimiento. En la fermentación con el cultivo Bb-12, el ácido láctico se produjo en cantidades demasiado pequeñas. Se sabe que el género *Bifidobacterium* produce 3 moles de ácido acético y 2 de ácido láctico por dos moles de glucosa (Ballongue 1996), por lo que su contribución en la acidificación de la leche en el caso de la fermentación por el cultivo mixto no es de ninguna manera significativa.

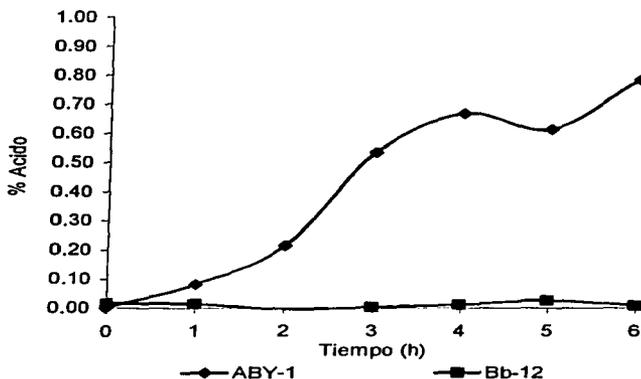


Figura 5.2.4.4. Producción de ácido láctico durante la fermentación por el cultivo Bb-12 y durante la fermentación por el cultivo ABY-1, determinado por HPLC.

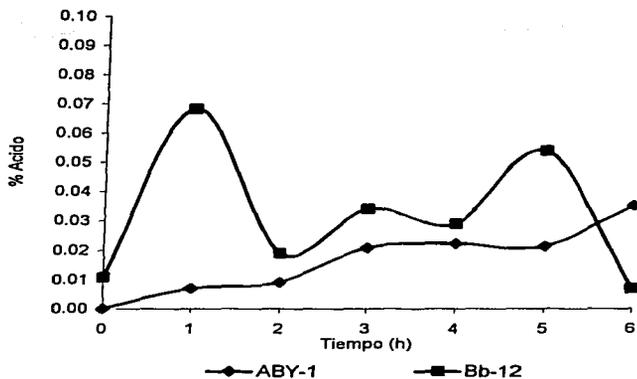


Figura 5.2.4.5. Producción de ácido acético durante la fermentación por el cultivo Bb-12 y durante la fermentación por el cultivo ABY-1, determinado por HPLC.

La baja capacidad fermentativa de *B. lactis* en leche se debió en parte al bajo desarrollo del microorganismo en ésta, lo cual va ligado a su poca capacidad para hidrolizar las proteínas de la leche. Por lo que su viabilidad se mantuvo por el consumo de carbohidratos, el cual era insuficiente para llevar a cabo la fermentación en las 5 horas que se establecieron para la fermentación con el cultivo mixto ABY-1.

### 5.2.5 Fermentación del cultivo La-5

En la figura 5.2.5.1 se observa que la cantidad de ácido producida en el cultivo La-5 fue de 12.62 a 14.64 °D, lo cual es muy poco en comparación con lo obtenido al final de la fermentación en el cultivo ABY-1 (65.9 °D). En la misma figura se observa que el descenso de pH también fue muy bajo, 6.64 a 6.49. Por

lo que en ese período de tiempo y en esas condiciones no es posible que *L. acidophilus* lleve a cabo la fermentación.

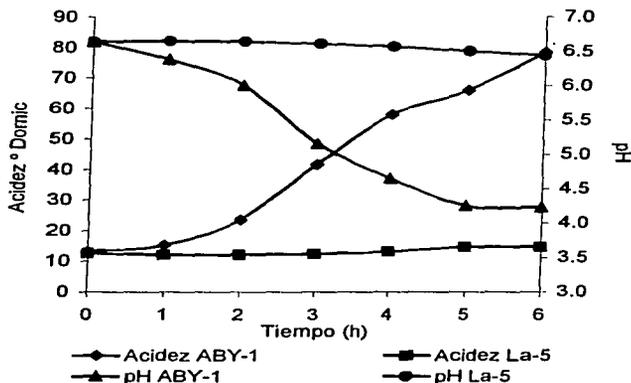


Figura 5.2.5.1. Cambio de pH y acidez durante la fermentación con el cultivo La-5 y la fermentación con el cultivo ABY-1.

Durante la fermentación con el cultivo puro (La-5), *L. acidophilus* creció de 6.52 a 7.08 log UFC en 5 horas, el incremento es de 0.56 ciclos logarítmicos. Al parecer se encontraba todavía en la fase de adaptación al medio, porque como se observa en la figura 5.2.5.2, no hubo un cambio significativo de la pendiente. Mientras, como se puede observar en la misma figura, la población de *L. acidophilus* del cultivo ABY-1 se incrementó 0.82 ciclos logarítmicos, indicando que el desarrollo de *L. acidophilus* se vio favorecido ligeramente en la fermentación del cultivo mixto.

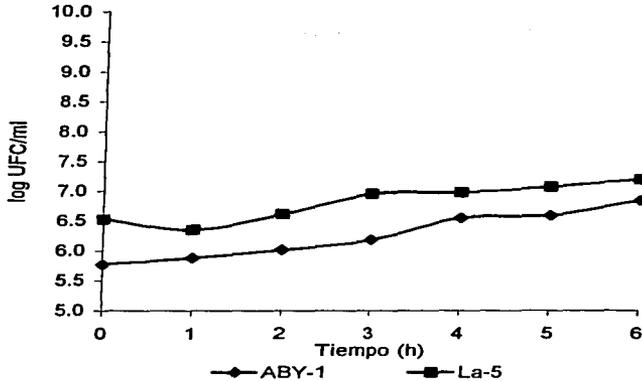


Figura 5.2.5.2. Crecimiento de *L. acidophilus* durante la fermentación con el cultivo La-5 y la fermentación con el cultivo ABY-1.

Con el cultivo La-5, la concentración de proteínas en el medio se mantuvo casi constante, aunque después de la primer hora descendió de 3.86 a 3.74%. A las 6 horas la concentración aumentó a 3.84%.

Gomes y col. (1998) realizaron pruebas añadiendo a la leche hidrolizados de caseína en la leche (igual que en el caso de *B. lactis*). Encontraron que tanto el crecimiento como la velocidad de acidificación de *L. acidophilus* no fueron mejorados significativamente por la adición de los hidrolizados de leche, el crecimiento fue lento. Mencionan que al parecer la presencia de péptidos pequeños y aminoácidos libres causan un desequilibrio en el medio lácteo y en el sistema de transferencia, consecuentemente se suprime el crecimiento. Al realizar el estudio en leche de cabra y leche de oveja, Gomes y Malcata (1998), encontraron que no hay gran diferencia entre el crecimiento en leche de cabra u oveja sin tratar con el hidrolizado y la leche añadida con éste.

Dave y Shah (1998) encontraron que *L. acidophilus* aumenta ligeramente su velocidad de crecimiento cuando la leche se complementa con hidrolizado ácido de caseína y triptona, aunque comparando con el control prácticamente no hay influencia, creció 2 ciclos log en estos dos medios y en el control aproximadamente 1.9 ciclos en 24 horas.

Debido a que posiblemente los péptidos y aminoácidos, presentes en el medio por la actividad de los demás microorganismos que contiene el cultivo mixto, no tengan mucha influencia sobre el crecimiento de *L. acidophilus* en leche, probablemente exista otro factor dentro del cultivo mixto que favoreció su desarrollo.

Se realizó también una fermentación con *L. acidophilus* en anaerobiosis, con el mismo tamaño de inóculo empleado para la fermentación del cultivo La-5, para probar si estas condiciones favorecían su crecimiento (no se muestran resultados). A las 4 horas de fermentación ya había aumentado 1.1 ciclos log su concentración. Por lo tanto es posible que *S. thermophilus* propicie un ambiente de anaerobiosis que favorecen el desarrollo de *L. acidophilus* en la fermentación por el cultivo ABY-1.

Por otro lado, Fira y col. 2001 han encontrado que a 40 °C las proteasas de este microorganismo hidrolizan la  $\alpha$ -caseína y la  $\beta$ -caseína, y en menor cantidad la  $\kappa$ -caseína, siendo el pH óptimo a esta temperatura 6.5, aunque la temperatura óptima es realmente de 50°C.

Con toda esta evidencia se concluye que *L. acidophilus* si puede hidrolizar caseína, sin embargo, su crecimiento es lento en leche comparado con el de *L. delbrueckii ssp. bulgaricus*, lo cual se deba probablemente a que su sistema proteolítico es más lento, además de la temperatura de incubación, que es próxima a la óptima de las proteasas de *L. delbrueckii ssp. bulgaricus* (45°C).

En cuanto a los azúcares, la concentración de lactosa aumentó ligeramente durante la fermentación con el cultivo La-5, hubo un aumento en la concentración de los azúcares totales de 4.82% a 5.06% (fig. 5.2.5.3). Posiblemente se deba a la sobrestimación de lactosa por la presencia de glucosa, aunque el incremento es muy pequeño, por lo que también se puede deber a un error experimental. El aumento de la concentración de galactosa es de 0.05% a 0.15%, lo cual indica que la lactosa si se está hidrolizando. Comparando con la hidrólisis que se presenta en el cultivo mixto, se ve que la capacidad fermentativa de *L. acidophilus* en leche es baja.

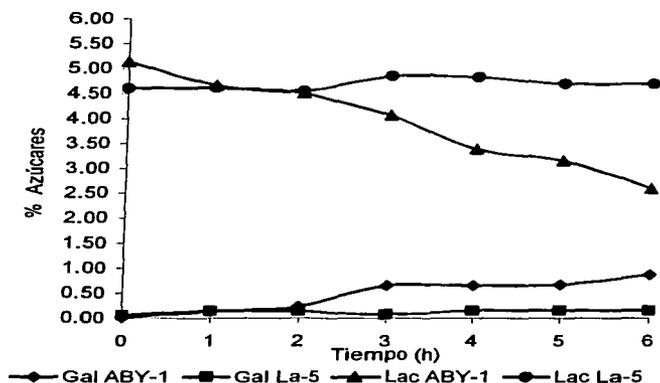


Figura 5.2.5.3. Consumo de lactosa y producción de galactosa, determinados por HPLC, durante las fermentaciones de los cultivos La-5 y ABY-1.

En la figura 5.2.5.4, se observa que la acidez titulable aumentó de 0.13% a 0.15%, sin embargo por HPLC al inicio de la fermentación no se detectó la presencia de ácido láctico, la concentración final fue de 0.04%, lo cual está muy

por debajo de la acidez titulable. La acidez del medio se debe a la presencia de otros compuestos presentes en la base láctea que se neutralizan con el NaOH.

En la misma figura comparando con la fermentación por el cultivo ABY-1 se puede observar que tanto la producción de ácido láctico como el consumo de lactosa y producción de galactosa son muy pequeños. Por lo anterior en el período de fermentación de 5 horas con el cultivo ABY-1, prácticamente no hay participación de este microorganismo en la producción de metabolitos.

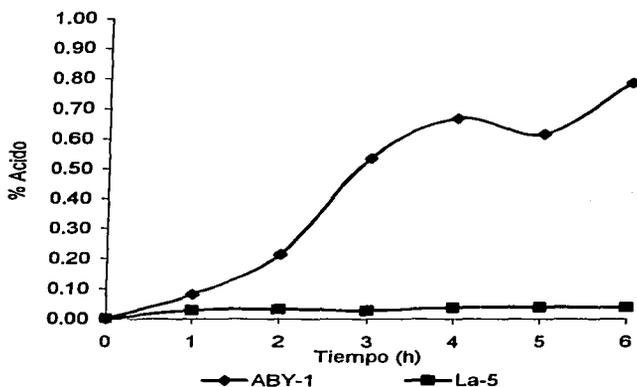


Figura 5.2.5.4. Producción de ácido láctico durante la fermentación con el cultivo La-5 y la fermentación con el cultivo ABY-1.

La fermentación en leche por este microorganismo es lenta. La elaboración de la leche acidófila que contiene únicamente este microorganismo dura 24 horas, se realiza entre 37 y 38 °C, y se obtiene una acidez final de 0.6 al 1%, se recomienda no excederse de 0.65% de ácido láctico para mantener una alta población viable en el producto (García-Garibay y col. 1993). Se hizo una prueba

dejando la fermentación 24 horas a 43 °C y la acidez llegó en ese tiempo a 0.29%, el pH descendió de 6.63 a 4.79. Los resultados anteriores indican una probable interferencia en el crecimiento de *L. acidophilus* debido a la temperatura o probablemente se requiera un mayor tamaño del inóculo.

**ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA**

## 6. CONCLUSIONES

- El medio MRS-pH 5.2 en condiciones de anaerobiosis, 37 ° C con incubación por 96 horas, resultó ser el más adecuado para diferenciar las colonias de *B. lactis*, *L. acidophilus* y *L. delbrueckii ssp. bulgaricus*, obteniéndose una buena recuperación de células viables, cuando interactúan estos microorganismos en un cultivo mixto.
- En cuanto al medio MRS modificado (anaerobiosis, 37°C), se recomienda su uso únicamente como diferencial entre *L. acidophilus* y *B. lactis* cuando se encuentran en un mismo cultivo sin la presencia de *L. delbrueckii ssp. bulgaricus*.
- El uso del medio MRS-NNL selectivo para *B. lactis*, con la concentración de antibióticos reportada (5g/100 ml) disminuye la viabilidad de las células. Se observó sin embargo, que al ser empleados los antibióticos diluidos 10 veces se pierde esta selectividad.
- Las condiciones más adecuadas para la diferenciación específica de *L. delbrueckii ssp. bulgaricus* resultó ser en el medio MRS con incubación anaeróbica a 45 °C, ya que el crecimiento tanto de *B. lactis* como de *L. acidophilus* se ve afectado por la temperatura, no así las células de *L. delbrueckii ssp. bulgaricus*.
- Para la cuenta de *Streptococcus thermophilus* se confirmó que el medio más adecuado es el M17.
- *B. lactis* y *L. acidophilus* no son capaces de crecer durante la fermentación en leche, a pesar de ser un medio rico en nutrimentos, especialmente por el

contenido de proteínas. Como se ha visto en otros estudios, el sistema proteolítico *B. lactis* no tiene mucha afinidad por las caseínas y este microorganismos requieren de pequeños péptidos y aminoácidos libres para su desarrollo. Mientras que en el caso de *L. acidophilus* se sabe que el tiempo requerido por este microorganismo para fermentar leche es de 24 horas.

- Los microorganismos probióticos presentes en el cultivo mixto ABY-1 contribuyen de manera mínima en la fermentación de la leche, por lo que no hay interferencias sobre las características de ésta, como la acidez y la concentración de ácido láctico, que son dos de los principales factores que contribuyen a las propiedades organolépticas del producto.
- La viabilidad de los microorganismos probióticos al final de la fermentación, para *L. acidophilus* fue del orden de  $10^6$  ufc/ml, mientras que para *B. lactis* estuvo en el orden de  $10^7$  ufc/ml, lo cual cubre la cantidad requerida de células viables para que cumplan con la acción de probióticos.
- En cuanto al crecimiento de *L. acidophilus* y *B. lactis* en el cocultivo con *S. thermophilus* y *L. delbrueckii ssp. bulgaricus*, existe un efecto benéfico mínimo sobre la viabilidad de los microorganismos probióticos. La diferencia del crecimiento de ambos probióticos, en cultivos individuales en comparación con el mixto, fue ligeramente mayor; posiblemente se deba a la contribución de los productos de la proteólisis de la caseína por parte de *L. delbrueckii ssp. bulgaricus*, además *S. thermophilus* propicia un ambiente microaerofílico al formar CO<sub>2</sub>.
- El yogurt es una opción de vehículo para los microorganismos probióticos siempre y cuando el inóculo sea alto ya que no hay desarrollo de estos microorganismos a lo largo de la fermentación pero si mantienen su viabilidad durante ésta.

## 7. RECOMENDACIONES

- Es conveniente hacer un estudio de la viabilidad de los microorganismos probióticos durante el periodo de almacenamiento, aproximadamente un mes, que es el tiempo estimado de vida del yogurt. Esto con el fin de observar el efecto de la refrigeración sobre la viabilidad de los microorganismos probióticos y el efecto de las transformaciones post-fermentativas que sufre la leche durante este periodo, principalmente la acidificación. Aunque en un estudio por Samona y col. (1996) se determinó que durante el almacenamiento los microorganismos probióticos al parecer previenen la post-adificación que se da comúnmente durante el almacenamiento del yogurt.
- Se recomienda además, en el caso de *L. acidophilus* hacer pruebas de fermentación de este microorganismo con *L. delbrueckii ssp. bulgaricus* y *S. thermophilus* (cada uno por separado) para ver que tanto beneficia la actividad proteolítica de estos microorganismos a *L. acidophilus*.
- Realizar más estudios sobre las actividad de las proteasas que presenta *B. lactis*.
- Estudiar la viabilidad de los probióticos al ser añadidos en diferentes tiempos a lo largo de la fermentación y durante el periodo de almacenamiento.
- Hacer un estudio de fermentaciones individuales variando el tamaño de los inóculos de *L. acidophilus* y *B. lactis*, así como la temperatura de fermentación.

## 8. APENDICES

### APENDICE I. Preparación de los medios de cultivo.

- *MRS agar* (Oxoid). Se preparó según las recomendaciones del fabricante
- *Agar Columbia* + ácido propiónico (Oxoid). Se preparó según las recomendaciones del fabricante y se añadió ácido propiónico en una concentración de 5 ml/L de medio.
- *MRS agar + NNL* (Con modificación al medio de Marlita y Bufford, 1989). Se preparó el medio *MRS* (Oxoid) de acuerdo a las recomendaciones del fabricante antes de verter en las cajas se añadieron 5 ml/L de la solución estéril de **NNL**: ácido nalidíxico (Sigma) 15 mg/L, sulfato de neomicina (Sigma) 100 mg/L, cloruro de litio (Baker) 3g/L.
- *MRS modificado*. *MRS* (Oxoid) 52 g/L, cisteína (Sigma) 0.5 g/L,  $\text{Na}_2\text{CO}$  (Baker) 0.2 g/L,  $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (Baker) 0.1 g/L.
- *M17* (Oxoid). Se preparó de acuerdo a las recomendaciones del fabricante.
- *MRS pH 5.2*. Se preparó el medio según las recomendaciones del fabricante, acidificando antes de la esterilización con HCl 2N.
- *MRS Galactosa*. Se preparó el medio según la formulación de Oxoid sustituyendo la glucosa por galactosa en la misma concentración (20 g/L).
- *MRS Sacarosa*. Se preparó el medio según la formulación de Oxoid sustituyendo la glucosa por sacarosa en la misma concentración (20 g/L).

- **PDA. (Oxoid)** Se preparó según las recomendaciones del fabricante.
- **Bellincker.** (Según la formulación del laboratorio de Biotecnología, Depto. de Alimentos y Biotecnología, Facultad de Química) Triptona 20 g/L (Oxoid), Extracto de levadura 5 g/L (Bioxon), Extractos de carne 10 g/L (Bioxon), Acetato de sodio 1.5 g/L (J.T. Baker), Lactosa 20 g/L (Oxoid), Agar 15 g/L (Oxoid).

## **APENDICE II. Determinación de la acidez titulable y °Dornic.**

La acidez titulable se determina por la titulación con NaOH 0.1N usando fenolftaleína en solución alcohólica como indicador y el resultado se expresa como ml de NaOH 0.1N requeridos para neutralizar 100 ml de leche, siendo en el caso de la leche el ácido láctico el que reacciona con la leche, por lo cual se expresa como porcentaje de ácido láctico.

$$\% \text{ ácido láctico} = \frac{\text{ml NaOH} \times \text{N} \times \text{meq del ácido láctico}}{\text{ml de muestra}} \times 100$$

donde: ml NaOH son los ml de sosa que se gastan para neutralizar la muestra

N es la normalidad de la solución de NaOH

meq son los miliequivalentes de ácido láctico, cuyo valor es de 0.09

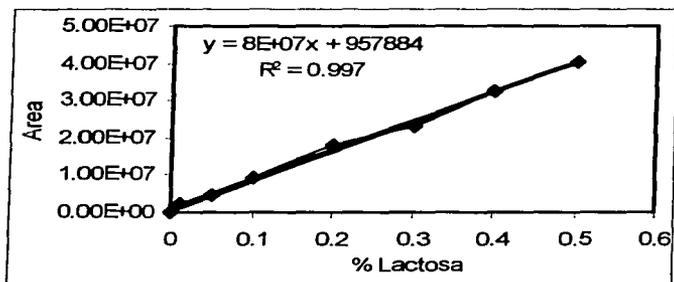
ml de muestra es la cantidad de muestra a determinar.

Los °Dornic son otra manera de expresar la acidez en la leche, corresponden a los ml de NaOH 9N por 100ml de muestra. Se puede hacer una conversión de % de ácido láctico a °Dornic en base a la siguiente relación:

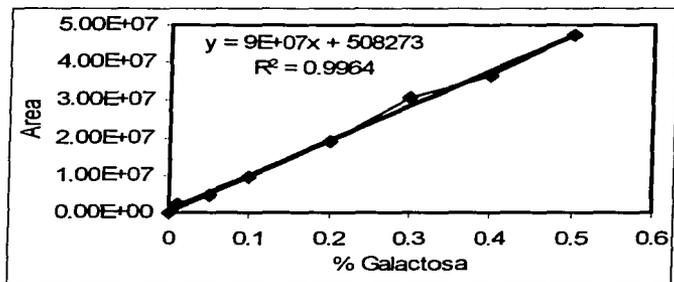
$$\text{ml de NaOH 0.1N empleados para 100 ml de muestra} = 1.1 \text{ °D.}$$

### APENDICE III. Curvas de calibración de estándares para HPLC

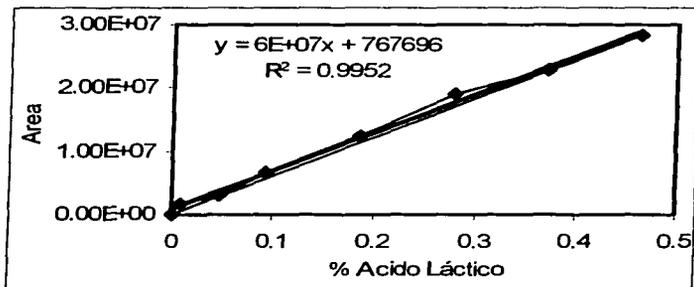
**Lactosa.** Tiempo de retención en la columna 8.12 minutos.



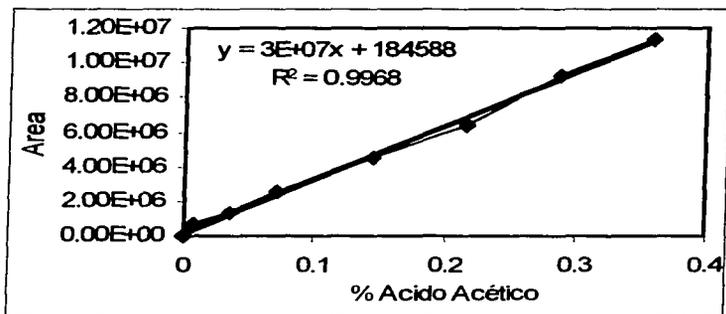
**Galactosa.** Tiempo de retención en la columna 9.75 minutos.



**Acido Láctico.** Tiempo de retención en la columna 13.28 minutos.



**Acido Acético.** Tiempo de retención en la columna 16.07 minutos.



#### **APENDICE IV. Corrección de la curva de calibración para determinar proteínas con el Milko-Scan**

Los resultados obtenidos para la concentración de proteína (%), se encontraban sobrestimados a comparación del valor teórico de proteína que debe contener la base láctea preparada al 8% (2.72%). En la tabla 8.1 se muestran los resultados obtenidos por el Milko-Scan para las diferentes fermentaciones

Tabla 8.1. Resultados de la concentración de proteína a lo largo de la fermentación, obtenidos por el Milko-Scan.

Tiempo	YC-380 (%)	ABY-1 (%)	Bb-12 (%)	La-5 (%)
0	5.6925	5.8200	4.9750	5.7817
1	6.1664	5.8400	5.3883	5.6050
2	6.5418	6.1617	5.5183	5.6650
3	7.2847	7.4769	5.4917	5.6117
4	7.2790	7.5505	5.4250	5.6417
5	7.3804	7.6753	5.6367	5.6383
6		7.7519	5.6433	5.7517

Se encontró que la pendiente y la ordenada al origen de la curva para la determinación de proteínas, en el programa para yogurt, eran de 2.5308 y -1.12 respectivamente. Estos valores se obtienen al realizar una corrección de pendiente y ordenada al origen, que ordena el fabricante sobre los valores cuando la relación entre la desviación estándar y la media de los resultados es mayor de 0.1. El valor original de la desviación estándar era de 1.569, este valor se multiplicó por un nuevo valor, 1.6127, que se obtuvo al hacer un análisis de regresión lineal de la curva de proteína; obteniéndose un mejor coeficiente de correlación entre el milko y el kjeldhal (mejor ajuste). De la nueva curva se obtuvo como ordenada al origen -0.5292, este valor se agrega al antiguo -0.6.

Para corregir los resultados se introdujeron los datos de mejor ajuste, ordenada al origen y pendiente, al programa. Se determinó con esos datos, en diez repeticiones, la concentración de proteína en la base láctea al 8%, que tenía el

mismo tratamiento que la base empleada para la fermentación. Después a esas mismas muestras se les determinó la concentración de proteína con los datos de la curva que tenía, con los cuales se determinó la concentración de proteínas a las muestras de la fermentación. En la tabla 8.2 se muestran los resultados obtenidos.

Tabla 8.2. Resultados obtenidos para la determinación de proteínas en la base láctea (8%) por el Milko-Scan con los diferentes datos de pendiente y ordenada al origen.

Curva de calibración (mejor ajuste) m=1.6127, o.o.=-0.53	Curva de calibración (programa) m=2.5308, o.o.=-1.12
3.77	5.63
3.78	5.64
3.76	5.63
3.78	5.63
3.74	5.65
3.76	5.64
3.76	5.65
3.78	5.67
3.77	5.64
3.79	5.65

Entre la curva del programa y la de mejor ajuste se encontró una relación de 2.1312. Este valor fue considerado como el factor de corrección para los datos obtenidos durante la fermentación, así que se dividieron los datos obtenidos para las fermentaciones entre este valor. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 8.3

Tabla 8.4. Resultados corregidos de la determinación de proteína por el Milko-Scan.

Tiempo	YC-380	ABY-1	Bb-12	La-5
0	3.8021	3.8872	3.3229	3.8617
1	4.1186	3.9006	3.5989	3.7437
2	4.3694	4.1155	3.6858	3.7837
3	4.8655	4.9939	3.6680	3.7481
4	4.8617	5.0431	3.6234	3.7681
5	4.9295	5.1264	3.7648	3.7659
6		5.1776	3.7693	3.8416

## 9. BIBLIOGRAFÍA

- Abu-Tarboush H.M. 1996. Comparison of associative growth and proteolytic activity of yogurt starters in whole milk from camels and cows. *J. Dairy Sci.* 79 (3):366-371.
- Abu-Tarboush H.M., M.M. Al-Dagal, M.A. Al-Royli. 1998. Growth, viability, and proteolytic activity of bifidobacteria in whole camel milk. *J. Dairy Sci.* 81(2):354-361.
- Agnet Y. Fourier transform infrared spectrometry, a new concept for milk and milk product analysis. *Bulletin of the IDF* 332.
- AOAC, *Official Methods of Analysis* (1990). 15<sup>ta</sup> Edición, Arlington, VA. Pag. 816.
- Ballongue J. "Bifidobacteria and Probiotic Action" en *Lactic Acid Bacteria*, Ed. S. Salminen y A. Von Wright. Marcer Dekker Inc. USA, 1993. Pags. 357-387.
- Baron M., D. Roy, J.C. Vuilleumard. 2000. Biochemical characteristics of fermented milk produced by mixed cultures of lactic starters and bifidobacteria. *Lait*, 80:465-478.
- Beerens H. 1990. An elective and selective isolation medium for *Bifidobacterium* spp. *Letf. Appl. Microbiol.* 11:155-157.
- Belitz, H.D., W. Grosch. *Química de los Alimentos*, 2<sup>a</sup> Edición, Edit. Acribia, S.A., Zaragoza España, 1997. Pags. 537-586.
- Braverman J.B.S. *Introducción a la Bioquímica de los Alimentos*. 2<sup>a</sup> Edición. Edit. El manual moderno, S.A. de C.V. México, 1980.
- Breed. R.S., E.D.G. Murray, N.R. Smith *Bergeys' Manual of Determinative Bacteriology*. 7<sup>a</sup> Ed., 1957.
- Bulletin of the IDF 340. Guideline for the enumeration of bifidobacteria in fermented dairy products. IDF Group E104-Lactic acid bacteria and starters. Pags. 19-23.
- Cichoke A. 1997. Probiotics balance digestion and improve overall health. [http://www.nutritionsciencenews.com/nsn\\_backs/aug\\_97/probiotics.html](http://www.nutritionsciencenews.com/nsn_backs/aug_97/probiotics.html).

- Dave R.I., N.P. Shah. 1996. Evaluation of media for selective enumeration of *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus* and Bifidobacteria. *J. Dairy Sci.* 79(9):1529-1536.
- Dave R.I., N.P. Shah. 1998. Ingredient supplementation effects on viability of probiotic bacteria in yogurt. *J. Dairy Sci.* 81(11):2804-2816.
- Desjardins M, D. Roy, C. Toupin. 1990. Uncoupling of growth and acids production in *Bifidobacterium* ssp. *J. Dairy Sci.* 73(6):1478-1484 .
- Deutsch S. M., D. Molle, V. Gagnaire, M. Piot, D. Atlan, S. Lortal. 2000. Hydrolysis of sequenced  $\beta$ -casein peptides provides New insight into peptidase activity from thermophilic lactic acid bacteria and highlights intrinsic resistance of phosphopeptides. *Appl. Environ. Microbiol.* 66(12):5360-5367.
- *Encyclopaedia of Food Science, Food Technology and nutrition*. Vol. 7. R. Marce, R.K. Robinson, M.H. Sadler (Editores). Academic Press. London, 1993. Pags. 4391-4399.
- Fernandez-Espla M.D., P. Garault, V. Monet, F. Rul. 2000. *Streptococcus thermophilus* cell wall-anchored proteinase: release, purification and biochemical characterization. *Appl. Environ. Microbiol.* 66(11):4772-4778.
- Fira D., M. Kojic, A. Banina, I. Spasojevic, I. Strahicnic, L. Topisirovic. 2001. Characterization of cell envelope-associated proteinases of thermophilic lactobacilli. *J. Appl. Microbiol.* 90(1):123-130.
- Frank, J.F. Milk and Dairy Products en *Food Microbiology, Fundamentals and Frontiers*, ASM Press Washington D.C. 1997. Pags. 101-116.
- Frazier, W.C, D. C. Weesthoff. *Microbiología de los Alimentos*, 4ª Edición. Edit. Acribia, España, 1993. Pags. 431-442.
- Garault P., D. Le Bars, C. Besset, V. Monnet. 2002. Three oligopeptide-binding proteins are involved in the oligopeptide transport of *Streptococcus thermophilus*. *J. Biol. Chem.* 277(4):32-39.
- García-Garibay M., S. Revah, L. Gómez-Ruíz. "Productos Lacteos", en *Bioteconología Alimentaria*. García-Garibay M., Quintero R., López-Munguía A. (Editores). Edit. Limusa, México, 1993. Pags. 163-177.
- Garro, M.S., G.F. de Valdéz, G. Oliver, G. Goiri. 1999. Starter culture activity in refrigerated fermented soy milk. *J. Food Prot.* 62(7):808-810.
- Gilliland S.E. 1989. Acidophilus milk products: A review of potential benefits to consumers. *J. Dairy Sci.* 72:2483-2494.

- Gomes A.M.P., F.X. Malacata. 1998. Use of small ruminants' milk supplemented with available nitrogen as growth media for *Bifidobacterium lactis* and *Lactobacillus acidophilus*. *J. Appl. Microbiol.* 85:839-848.
- Gomes A.M.P., Marlacata F.X., F.A.M. Klaver. 1998. Growth enhancement of *Bifidobacterium lactis* Bo and *Lactobacillus acidophilus* Ki by Milk Hydrolyzates. *J. Dairy Sci.* 81(11): 2817-2825.
- González R.M., A. Azaola. 1996. *Bifidobacterium* como probiótico. Memorias del 1er Simposium Mexicano Sobre Probióticos. Pags. 99-108.
- Goodenough E.R., D.H. Kleyn. 1975. Qualitative and quantitative changes in carbohydrates during the Manufacture of Yogurt. *J. Dairy Sci.* 59(1):45-47.
- Hewavitharana A.K., van Brakel B. 1997. Fourier transform infrared spectrometric method for the rapid determination of casein in raw milk. *Anallyst*, 122:701-704.
- Hirayama K., J. Rafter. 2000. The role of probiotic bacteria in cancer prevention. *Microb. and Infect.* 2:681-686.
- Holzapfel W.H, P. Haberer, J. Snel, U. Schillinger, Huis in't Veld J.H.J., 1998. Overview of gut flora and probiotics. *Int. J. Food Microbiol.* 45:85-101.
- Johnson, M. E., J.L. Steele, Fermented Dairy Products en Food Microbiology, Fundamentals and Frontiers Capt. 31. ASM Press Washington D.C. 1997. Pags. 581,594.
- Kim H.S. 1998. Characterization of lactobacilli and bifidobacteria as applied to dietary adjuncts. *Cult. Dairy Prod. J.* 23(3):6-9.
- Kociubinski G., P. Pérez, G. de Antoni. 1999. Screening of bile resistance and bile precipitation in lactic acid bacteria and bifidobacteria. *J. Food Prot.* 62(8):905-912.
- Kunji E.R.S., I. Mierau, A. Hagting, B. Poolman, W.N. Konings. 1996. The proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Anthony van Leeuwenhoek*, 70:187-221.
- Lapierre, L., P. Undeland, L.J. Cox. 1992. Lithium chloride-sodium propionate agar for the enumeration of *Bifidobacteria* in Fermented Dairy Products. *J. Dairy Sci.* 75(5):1192-1196.

- Lee Y.K., Wong S.F. *Stability of lactic acid bacteria in fermented milk* en "Lactic Acid Bacteria", Ed. S. Salminen y A. Von Wright. Marcer Deker Inc. USA, 1993. Pags. 97-109.
- Letort C., M. Nardi, P. Garault, V. Monnet, V. Juillard. 2002. Casein Utilization by *Streptococcus thermophilus* results in a diauxic growth in milk. *Appl. Environ. Microbiol.* 68(6): 3162-3165.
- Lim, K.S., C.S.Huh, Y.J. Beak. 1995. A Selective Enumeration medium for bifidobacteria in fermented dairy products. *J. Dairy Sci.* 78(10):2108-2112.
- Luinge H.J., E. Hop, E.T.G. Lutz, J.A. van Hemert, E.A.M. de Jong. 1993. Determination of the fat, protein and lactose content of milk using Fourier transform infrared spectrometry. *Anal. Chim. Acta.* 284:419-433.
- Marlita, Burford. 1989. Enumeration of *L. acidophilus* and *Bifidobacterium* in milk using oxigen reducing membrane fraction. *Cultured Dairy Prod. J.* 24(4):21-23.
- Marshall V.M. 1992. Inoculated ecosystems in a milk environment *J. Appl. Bacteriol. Symp. Suppl.* 73:127S-135S.
- Martini, M. C., E.C. Lerebours, W.J. Lin, S. K. Harlander, N.M. Berrada, J.M. Antoine, D.A. Savaiano. 1991. Strains and species of lactic acid bacteria in fermented milks (yogurts): effect in vivo lactose digestion. *Am. J. Clin. Nutr.* 54:1041-1046.
- Moreira M., A. Araham, G. de Antoni. 2000. Technological properties of milks fermented with thermophilic lactic acid bacteria at suboptimal temperature. *J. Dairy Sci.* 83(3):395-400.
- Nakazama Y., A. Hasano. *Functions of fermented milk, Challenges for the health sciences.* Elsevier Applied Science, 1998. 257-266.
- Ono J., T. Goto, S. Okonogi. *Metabolism and propagation rates in lactic acid bacteria* en "Functions of fermented milk, Challenges for the health Science". Ed. Y. Nakazama, A. Hasano. Elsevier Applied Science. 1998. Pags. 165-190.
- Ouwehand A.C., E. Isolauri, P.V. Kirjaveinen, S.J. Salminen. 1999. Adhesion of four Bifidobacterium strains to human intestinal mucus from subjects in different age groups. *FEMS Microbiol. Lett.* 172:61-64.
- Pelzcar M.J., R.D. Reid, E.C.S. Chan. *Microbiology.* 4ª Edición, McGraw-Hill Co., N.Y., 1997.

- Perdigón, G., E. Vintini, S. Alvarez, M. Medina, M. Medici. 1999. Study of the possible mechanisms involved in the mucosal immune system activation by lactic acid bacteria. *J. Dairy Sci.* 82( 6):1108-1114.
- Robinson R.K., A.Y. Tamime. *Microbiología de las leches fermentadas en Microbiología lactológica, Microbiología de los productos lácteos, Vol II* R.K. Robinson (Ed.), Editorial Acribia, España, 1987. Pags. 223-251.
- Rodríguez-Otero J.L., M. Hermida. 1996. Analysis of fermented milk products by near-infrared reflectance spectroscopy. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 79(3):817-821.
- Roissart H. De, F.M. Luquet. *Bactéries Lactiques, Aspects, fondamentaux et technologiques* Vol. 1. Edit. Loriga, Francia, 1994. Pags. 244, 246.
- Saarela M., G. Mogensen, R. Fondén, J. Mättö. 2000. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *J. Biotechnol.* 84:197-215.
- Samona A., R.K. Robinson, S. Marakis. 1996. Acid production by bifidobacteria and yoghurt bacteria during fermentation and storage of milk. *Food Microbiol.* 13:327-280.
- Sanders M.E., D.C. Walker, K.M. Walker, K. Aoyama, T.R. Klaenhammer. 1996. Performance of comercial cultures in fluid milk applications. *J. Dairy Sci.* 79(6):943-955.
- Shin, H.S., S.J. Lee, J.J. Pestka, Z. Ustunol. 2000. Viability of bifidobacteria in commercial dairy products during refrigerated storage. *J. Food Prot.* 63(3):327-331.
- Shuler, M.L., F. Kaige. *Mixed Cultures en Bioprocess Engineering, Basic Concepts.* Prentice Hall, New Jersey, 1992. Pags. 363-367.
- Sodini, I., E. Latrille, G. Corrieu. 2000. Identification of interacting mixed cultures of lactic acid bacteria by their exclusion from model predicting the acidifying activity of non-interacting mixed cultures. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 54:715-718.
- Tamime, A.Y., R.K. Robinson. *Yogurt Ciencia y Tecnología.* Editorial Acribia. España, 1981. Pags. 235-241.
- van de Voort F.R., A.A. Elkashef, B.L. Mills. 1990. Dry calibration milks for infrared milk analysers. *J. Assoc Off. Anal. Chem.* 73(5):688-692.

- van de Voort F.R., J. Sedman, G. Emo, A. A. Ismail. 1992. Assessment of Fourier transform infrared analysis of milk. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 75(5):780-785.
- Varnam, A.H., J.P. Sutherland. *Leche y Productos Lácteos, Tecnología, Química y Microbiología*. Serie Alimentos Básicos. Editorial Acribia, España, 1995. Pags. 365-406.
- Ventura M., R. Reniero, R. Zink. 2001. Specific identification and targeted characterization of *Bifidobacterium lactis* from different environmental isolates by a combined multiplex-PCR approach. *Appl. Environ. Microbiol.* 67(6):2760-2765.
- Yasui H., Hiyoshima J. y Usijima H. 1995. Passive protection against rotavirus-induced diarrhea of mouse pups born to and nursed by dams fed *Bifidobacterium breve* YIT4064. *J. Infect. Dis.* 172:403-9.