



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

“Elaboración de una bebida simbiótica a partir
de un sustrato lácteo”.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICA DE ALIMENTOS

PRESENTA
SANDRA NAVA RAMÍREZ

MÉXICO, D.F. 2012





Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

Jurado asignado:

Presidente: Olga del Carmen Velázquez Madrazo.

Vocal: Gloria Díaz Ruiz.

Secretario: Martha Giles Gómez.

1er suplente: Valentín Gómez García.

2do suplente: María del Carmen Wachter Rodarte.

Sitio donde se desarrollo la tesis:

Laboratorio 324, Departamento de Alimentos y Biotecnología,
Conjunto E, Facultad de Química, UNAM.

Asesor

Gloria Díaz Ruiz

Supervisor técnico:

Ma. Del Carmen Wachter Rodarte

Sustentante:

Nava Ramírez Sandra.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece a Nekutli® S. A. de C. V. y al Ing. Manuel Cruz por su apoyo para la realización de este trabajo y por la beca que me otorgaron.

A la M. en C. Isabel Gracia, que llevó a cabo la administración del proyecto.

A la UNAM por permitirme vivir dentro de sus aulas los mejores años de mi vida.

A la Dra. Gloria Díaz Ruíz por sus valiosos consejos para la realización de este proyecto.

A la Dra. Ma. Del Carmen Wachter Rodarte por permitirme pertenecer a su equipo de trabajo.

A Tere Flores por su apoyo durante mi estancia en el laboratorio.

A David Hernández Pérez por su apoyo en la parte sensorial de este proyecto.

A los miembros del jurado por el tiempo dedicado a la revisión de este trabajo.

DEDICATORIAS

A Dios...

A mis padres, Leticia y Manuel por brindarme su tiempo, amor, cariño, comprensión, consejos y regaños cada día de mi vida, ustedes son la razón más grande que tengo por la cual seguir luchando, los amo.

A mi abuelita Consuelo y a mi tía Carmen por ser mis segundas madres, siempre estaré eternamente agradecida con ustedes.

A mi hermano el oso, a mi tía geo, a mis primos bubu, gaby, poke, fibon y piko por regalarme una hermosa familia.

A mis sobrinos Emmanuel y Diego, por ser las personitas mas adorables del universo.

A mis amig@s de la Facultad:

Roció, por enseñarme a ser una persona más tolerante, por su apoyo incondicional y por creer en mí.

Sara y Manuel, por hacerme reír siempre con sus puntadas.

Angie, por enseñarme a ser una persona responsable y perseverante.

Ahide, por todo el tiempo que compartimos en la Facultad y por apoyarme siempre que lo necesitaba.

Dalia, por soportar mi mal carácter y aún con eso seguir siendo mi amiga.

Denisse, por su amistad y ternura.

Mara, por los buenos momentos que pasamos juntas.

Miriam, por ser como eres.

Víctor, por darme consejos cuando los necesite.

A Oscar González Antonio, por ser mi amigo, maestro y consejero.

A Sus, † porque algún día nos reencontraremos en el camino.

A Cruz, Luisa, Kari, Anabell, Claus, que en algún momento dibujaron una sonrisa en mi rostro.

A mis amigos del CCH, Jaz, Angel, Rox, Magda, Alfredo, Néstor y Diego, tarde pero seguro jeje!!!!

A todos mis compañeros del 324, el mejor de los laboratorios al que pude pertenecer, en especial a Davo, Betty, Gris, Marisol y Luisa gracias por hacer más amena la estancia en el laboratorio, por brindarme su compañerismo y amistad.

A mis amigos de la secundaria Nancy y Galileo, gracias por su amistad.

A mis amigos Lore, Vero, Sofía, Pablo, Jorge, Isabel, Yaz linda, a las Hortalizas (jaja), a las gemelas Vane y Vale, a mis chompis, siempre los llevare en mi corazón.

A todos ustedes gracias por ser parte de mi vida.

ÍNDICE GENERAL

CONTENIDO	PÁGINA
Índice general	
Índice de tablas	
Índice de figuras	
1. ANTECEDENTES	
1.1. Bacterias ácido-lácticas (BAL).....	1
1.1.2. Generalidades de las bacterias ácido lácticas.....	1
1.1.3. Fermentación láctica.....	1
1.1.4. Principales grupos (BAL).....	2
1.1.5. Metabolismo de las BAL.....	3
1.2. El género <i>Lactobacillus</i>.....	5
1.2.1. Caracteres morfológicos.....	5
1.2.2. Características de los cultivos y de las colonias.....	5
1.2.3. Nutrición y condiciones de crecimiento.....	6
1.2.4. Condiciones ecológicas: pH, necesidades de oxígeno y temperatura de crecimiento.....	6
1.3. <i>Lactobacillus casei</i>.....	8
1.3.1. Características generales.....	8
1.3.2. Metabolismo.....	8
1.3.3. Algunos beneficios que se obtienen al consumir <i>Lactobacillus casei</i>	8

1.4. <i>Lactobacillus acidophilus</i>	10
1.5. Probióticos	10
1.5.1. Criterios para la evaluación de los probióticos en alimentos.....	11
1.5.2. Efectos en la microbiota intestinal.....	12
1.5.3. Beneficios que se obtienen al consumir microorganismos probióticos.....	12
1.6. Prebióticos	16
1.6.1. Fructooligosacáridos.....	16
1.6.2. Inulina.....	17
1.6.3. Oligofruktosa.....	18
1.6.4. Fructooligosacáridos de cadena corta.....	18
1.6.5. Aplicaciones generales de los FOS.....	19
1.6.6. La degradación bacteriana de los FOS.....	19
1.6.7. Efectos beneficiosos de los prebióticos en el organismo.....	20
1.7. El agave azul	21
1.7.1 Inulina de agave.....	21
1.8. Suero de leche	23
1.8.1. Definición y composición del suero de leche.....	23
1.8.2. Beneficios que ofrecen los productos elaborados con suero de leche.....	23
1.8.3. Contaminación por suero de leche.....	24
1.9. Alimentos funcionales	24

1.9.1. Aspectos importantes y novedosos en la definición de alimentos funcionales.....	25
1.10. Definición de productos simbióticos.....	25
1.10.1. Efectos beneficiosos de los productos simbióticos.....	26
2. JUSTIFICACIÓN.....	28
3. OBJETIVO.....	30
3.1. Objetivos particulares.....	30
4. MATERIALES.....	31
4.1.1. Cepas probióticas.....	31
4.1.2. Fibra orgánica soluble de agave.....	31
4.1.3. Suero de leche en polvo.....	31
4.1.4. Carbonato ácido de sodio en polvo.....	31
5. MÉTODOS.....	32
5.1. Esquema general de la metodología para la elaboración de las bebidas simbióticas.....	32
5.2. Conservación en glicerol de las cepas liofilizadas.....	33
5.3. Determinación de la cinética de crecimiento de las cepas probióticas en los medios MRS, MRS-inulina y MRS-FOS.....	33

5.4. Determinación de la cinética de crecimiento de las cepas probióticas en los medios MRS, MRS-inulina y MRS-FOS provenientes del mismo medio de cultivo.....	34
5.5. Determinación de la cinética de crecimiento de las cepas probióticas en los medios sueros de leche, suero de leche con inulina, suero de leche con FOS y suero de leche con inulina y FOS.....	34
5.6. Descripción general de la preparación de los componentes: suero de leche, suero de leche concentrado, inulina, FOS y carbonato ácido de sodio para elaborar las bebidas simbióticas.....	35
5.6.1. Dilución de los ingredientes.....	35
5.6.2. Prueba de la esterilidad de los ingredientes.....	36
5.7. Preparación de las formulaciones.....	37
5.7.1. Ajuste del pH de las diferentes formulaciones antes de la fermentación.....	37
5.7.2. Inoculación de las formulaciones.....	38
5.7.3. Fermentación de las diferentes formulaciones.....	38
5.7.4. Ajuste final de las bebidas simbióticas.....	38
5.7.5. Ajuste del pH de las bebidas simbióticas después de la fermentación.....	38
5.8. ANÁLISIS SENSORIAL.....	40
5.8.1. Prueba de preferencia.....	40
5.8.2. Prueba de ordenamiento.....	40
5.8.3. Prueba de aceptación.....	41
5.9. SOBREVIVENCIA.....	43

6. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	44
6.1. Descripción de la materia prima.....	44
6.1.1. Cepas probióticas.....	44
6.1.2. Prebióticos.....	44
6.1.3. Suero de leche.....	44
6.2. Efecto de la de reactivación de las cepas probióticas.....	45
6.2.1. Comportamiento del pH en la reactivación de las cepas probióticas.....	48
6.2.2. Reactivación de cepas en el medio MRS, MRS-inulina y MRS-FOS.....	48
6.3. Desarrollo de las bacterias probióticas <i>Lb. casei</i> y <i>Lb. acidophilus</i> en diferentes medios de cultivo líquidos (Suero de leche, Suero de Leche con inulina, Suero de Leche con FOS y Suero de Leche con Inulina y FOS).....	51
6.4. Comportamiento del pH en las diferentes formulaciones.	54
6.4.1. Descripción del pH.....	55
6.5. Análisis de la metodología.....	56
6.5.1. Estandarización del inóculo mediante el conteo de células viables.....	58
6.5.2 Análisis del pH.....	58
6.6. Análisis sensorial.....	60
6.6.1. El análisis de preferencia.....	60
6.6.2. Prueba de aceptación.....	61
7. SOBREVIVENCIA.....	62

7.1. Estudio de la sobrevivencia de <i>Lactobacillus casei</i> subespecie <i>paracasei</i> LMGP-21380 y <i>Lactobacillus acidophilus</i> LMGP-21381 en medios elaborados con suero de leche, inulina y FOS.....	62
8. DESCRIPCIÓN GENERAL DE LAS BEBIDAS FERMENTADAS.....	67
9. CONCLUSIONES.....	68
10. PERSPECTIVAS DEL TRABAJO.....	69
11. BIBLIOGRAFÍA.....	70

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Hábitats del género *Lactobacillus*.

Tabla 2: Efectos potenciales establecidos de las bacterias probióticas.

Tabla 3: Alimentos simbióticos, características y funciones.

Tabla 4: Ingredientes de las diferentes formulaciones.

Tabla 5: Ingredientes y volúmenes utilizados para elaborar 100mL de las diferentes bebidas simbióticas.

Tabla 6: Bebidas fermentadas a las cuales se les realizó una segunda evaluación sensorial.

Tabla 7: Valores de pH para las cepas de *Lactobacillus casei subespecie paracasei* LMGP-21380 y *Lactobacillus acidophilus* LMGP-21381p

Tabla 8: Valores de pH de las bebidas fermentadas

Tabla 9: Formulaciones finales a las cuáles se les realizó una segunda evaluación sensorial (SL+FOS + Glucosa y SL+I+FOS+Glucosa).

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Rutas mayoritarias de fermentación de la glucosa.

Figura 2. Estructura química de la Inulina.

Figura 3: Estructura de la inulina que se obtiene del Agave variedad azul.

Figura 4: Cuestionario que se realizó para la prueba de preferencia por ordenación.

Figura 5: Cuestionario que se realizó para la prueba de aceptación.

Figura 6: Curvas de crecimiento para la cepa *Lactobacillus casei subespecie paracasei* LMGP-21380 en los medios MRS, MRS-Inulina y MRS-FOS.

Figura 7: Curvas de crecimiento para la cepa *Lactobacillus acidophilus* LMGP-21381 en los medios MRS, MRS-Inulina y MRS-FOS.

Figura 8: Curvas de crecimiento para la cepa *Lactobacillus casei subespecie paracasei* LMGP-21380 reactivada en los medios MRS, MRS+Inulina y MRS+FOS.

Figura 9: Curvas de crecimiento para la cepa *Lactobacillus acidophilus* LMGP-21381.

Figura 10: Crecimiento de *Lactobacillus casei subespecie paracasei* LMGP-21380 en los medios SL, SL + I, SL + FOS y SL + I + FOS.

Figura 11: Desarrollo de *Lactobacillus acidophilus* LMGP-21381 en los medios SL, SL + I, SL + FOS y SL + I + FOS.

Figura 12: Perfil del pH de *Lb. casei* en las formulaciones SL, SL + I, SL + FOS y SL + I + FOS.

Figura 13: Perfil del pH de *Lb. acidophilus* en las formulaciones SL, SL + I, SL + FOS y SL + I + FOS.

Figura 14: Comportamiento de la sobrevivencia de *Lb. casei* en los medios SL + I + FOS y SL + FOS.

Figura 15: Comportamiento de la sobrevivencia de *Lb. acidophilus* en los medios SL + I + FOS y SL + FOS.

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1: Ficha técnica del suero de leche.

Anexo 2: Significancia para pruebas de dos muestras

RESUMEN:

La leche ha sido un alimento esencial en la nutrición y a partir de la obtención de lácteos procesados se han generado más subproductos cuya utilización posterior genera un valor agregado. Uno de los derivados más importantes de la leche es el queso, sin embargo durante el proceso de elaboración se obtiene un desecho altamente contaminante como lo es el suero. Es por este motivo se utilizó este remanente como materia prima en la elaboración de este proyecto.

Por otra parte, los alimentos funcionales producen efectos beneficiosos para la salud, superiores a los de los alimentos tradicionales. Dentro de la gama de alimentos funcionales están los prebióticos, los probióticos y los simbióticos. Los prebióticos son ingredientes no digeribles de la dieta que estimulan el crecimiento o la actividad de uno o más tipos de bacterias en el colon. Los probióticos son microorganismos vivos que al ser agregados como suplemento en la dieta, favorecen el desarrollo de la microbiota intestinal. Los simbióticos combinan en sus formulaciones prebióticos y probióticos, lo que permite aprovechar más los beneficios de esa unión.

Es así como el objetivo de este proyecto fue elaborar una bebida simbiótica a partir de suero de leche, microorganismos probióticos y compuestos prebióticos del agave con características sensoriales agradables al consumidor.

En este trabajo se presenta una metodología para la elaboración de diferentes formulaciones de bebidas fermentadas elaboradas a partir de suero de leche. Debido a las características que éste posee, se utilizó para la elaboración de bebidas fermentadas, las cuáles fueron adicionadas de cultivos iniciadores de cepas probióticas, al igual que con Inulina y fructooligosacáridos (FOS) procedentes del agave. La combinación de estos ingredientes contribuyó a la obtención de bebidas fermentadas con un carácter simbiótico.

Los productos fermentados finales se analizaron para conocer algunas de sus principales características como pH final, el número de UFC/mL para cada una de

las fermentaciones así como la estabilidad del producto después de un mes de almacenamiento.

1. ANTECEDENTES

1.1. Bacterias ácido-lácticas (BAL):

Las bacterias ácido lácticas han sido importantes en los alimentos durante siglos por su considerable contribución al valor de los productos. Debido a varias de sus propiedades metabólicas, éstas desempeñan un papel importante en la industria alimentaria, ya que son responsables de la producción de ciertas características organolépticas como sabor, olor y textura y el valor nutricional de los productos alimentarios. Algunos de los metabolitos producidos por este tipo de bacterias son ácidos orgánicos, polisacáridos, vitaminas, endulzantes, aromas y sabores entre otros (Parra Huertas, 2010).

1.1.2. Generalidades de las bacterias ácido lácticas.

Las bacterias ácido lácticas son un grupo de bacterias Gram (+) con forma de cocos y bacilos; no productoras de esporas. Requieren de medios ricos para crecer, son catalasa-negativas, aunque algunas cepas pueden presentar actividad pseudocatalasa. Por lo general son no móviles, fermentan los carbohidratos produciendo ácido láctico como producto principal de la fermentación, carecen de citocromos y se encuentran en ambientes donde los carbohidratos están disponibles. (Felis y Dellaglio)

Las BAL carecen de proteínas que contengan el grupo hemo, lo que les impide poner en marcha una cadena respiratoria con el oxígeno como aceptor de electrones. Carecen también de la enzima catalasa, sin embargo pueden crecer en presencia de aire (Parra Huertas., 2010).

La mayoría de las bacterias lácticas prefieren un pH inicial de 6 ó 7 para crecer. Son generalmente mesófilas, el mejor crecimiento se da a temperaturas entre 20 y 40°C (Velázquez, 2006).

1.1.3. Fermentación láctica:

La fermentación láctica se refiere al proceso celular por el cual los microorganismos como los lactobacilos, utilizan la glucosa para obtención de energía, donde el producto de la fermentación es el ácido láctico.

El ácido láctico se produce mediante la fermentación láctica. En condiciones de ausencia de oxígeno (anaerobiosis), la fermentación responde a la necesidad de la célula de regenerar la molécula de NAD^+ , que ha sido consumida en el proceso energético de la glucólisis. En la glucólisis la célula transforma y oxida la glucosa en un compuesto de tres átomos de carbono, el ácido pirúvico, obteniendo dos moléculas de ATP; sin embargo, en este proceso se emplean dos moléculas de NAD^+ que actúan como aceptores de electrones y pasan a la forma NADH. Para que tengan lugar las reacciones de la glucólisis que producen energía es necesario restablecer el NAD^+ por otra reacción (De los Monteros, 2005).

El ácido láctico es clasificado como GRAS (generalmente reconocido como seguro), para su empleo como aditivo alimenticio por la FDA (Administración de Drogas y Alimentos) (Parra Huertas, 2010).

Éste es utilizado como acidulante/agente buffer de pH o inhibidor de esporas de bacterias en una amplia variedad de alimentos procesados, como dulces, pan y productos de panadería, bebidas no alcohólicas, sopas, productos lácteos, mermeladas, gelatinas y mayonesas (Devlieghere y col., 2004).

La producción de ácido láctico hace que el ambiente donde se encuentran las bacterias lácticas sea ácido, lo cual inhibe el crecimiento de bacterias dañinas.

1.1.4. Principales grupos (BAL).

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

Las homofermentativas estrictas degradan las hexosas exclusivamente a ácido láctico y no fermentan las pentosas o el gluconato.

Las heterofermentativas estrictas degradan las hexosas a ácido láctico, ácido acético, etanol y CO₂, y las pentosas a ácido láctico y ácido acético.

Las heterofermentativas facultativas fermentan las hexosas a ácido láctico y pueden producir CO₂ a partir del gluconato pero no de la glucosa. Ellas también fermentan las pentosas para producir ácido láctico y acético.

Dentro del grupo de las bacterias ácido-lácticas homofermentativas encontramos algunas especies de *Streptococcus* (*St. thermophilus* y *St. lactis*) y *Pediococcus* (*P. acidilactici*, *P. pentosaceus*). (Larparent, 1995).

Entre las heterofermentativas algunas especies de *Lactobacillus* (*L. brevis* y *L. buchnerii*) y *Leuconostoc* (*L. mesenteroides*, *L. dextranicum* y *L. cremoris*) (Larparent, 1995).

Y entre las heterofermentativas facultativas encontramos a *Lb. plantarum*, *Lb. casei* y *Lb. sake*.

Las bacterias ácido lácticas de importancia en la industria de alimentos pertenecen a los géneros *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Paralactobacillus*, *Pediococcus*, *Streptococcus* y *Weissella* (Lyhs, 2002). El género *Lactobacillus* ha sido usado históricamente de forma segura, especialmente en la industria láctea, y juega un papel principal en la producción de leches fermentadas (Maragkoudakis y col., 2006).

1.1.5. Metabolismo de las BAL:

La diferencia entre el grupo llamado homofermentativo y heterofermentativo está marcada por la presencia o ausencia del enzima aldolasa, la enzima clave de la glucólisis.

El grupo homofermentativo utiliza la ruta Embden-Meyerhoff-Parnas al convertir 1 mol de glucosa en 2 moles de ácido láctico, además que se produce más del 85% de ácido láctico a partir de glucosa. Las bacterias pertenecientes a este grupo poseen las enzimas aldolasa y hexosa isomerasa, pero carecen de la fosfoacetolasa (Figura 1) (Parra Huertas, 2010).

El grupo heterofermentativo produce solamente 50% de ácido láctico. Éstas fermentan 1 mol de glucosa para formar 1 mol de ácido láctico, 1 mol de etanol y 1 mol de CO₂; 1 mol de ATP es generado por 1 mol de glucosa. Éste grupo de bacterias contienen la enzima fosfoacetolasa, pero carecen de la aldolasa y hexosa isomerasa, así que en lugar de seguir la vía EMP, utilizan las vías de la hexosa monofosfato o la de la pentosa (Figura 1).

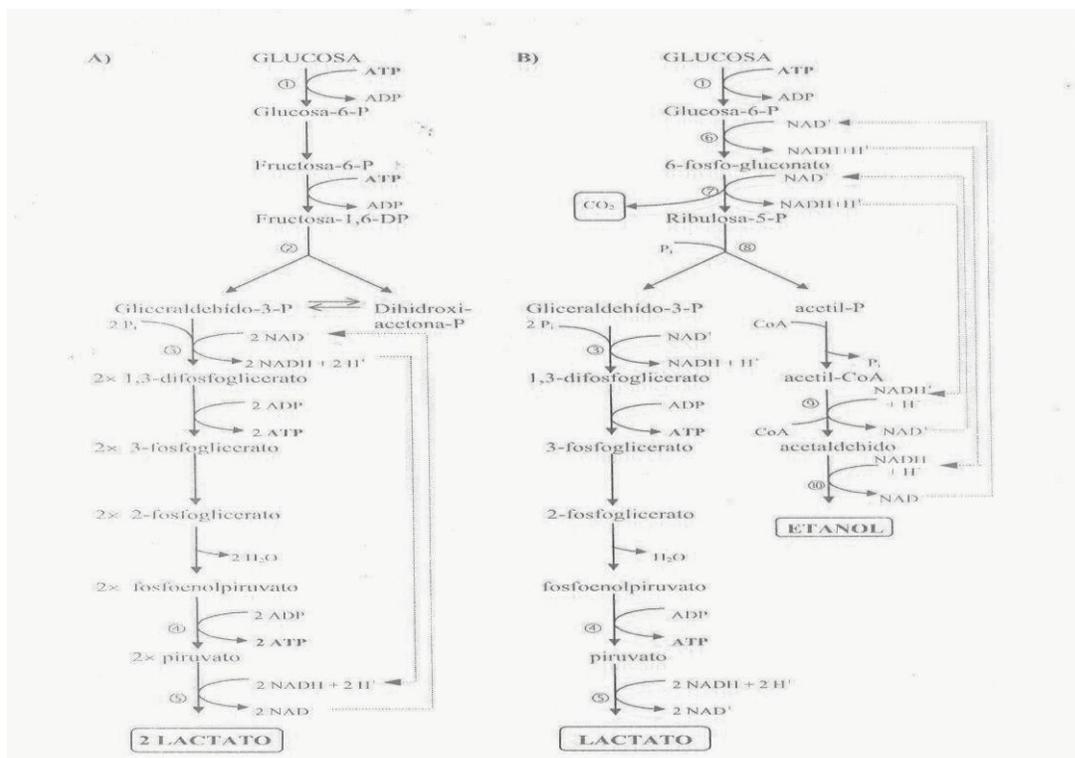


Figura 1: Rutas mayoritarias de fermentación de la glucosa. A) homofermentativa: B) heterofermentativa. Adaptada de Hernández y Jiménez 2010.

La fermentación reduce la cantidad de carbohidratos disponibles y resulta en moléculas orgánicas de bajo peso molecular que presentan actividad antimicrobiana, siendo las más comunes: ácido láctico, acético y propiónico, además de otras sustancias antagonistas, como son el peróxido de hidrógeno y bacteriocinas.

1.2. El género *Lactobacillus*.

1.2.1. Caracteres morfológicos:

El género *Lactobacillus* se caracteriza por presentar células en forma de bacilos largos y extendidos, aunque con frecuencia pueden observarse bacilos cortos o coco-bacilos. Estos bacilos se presentan comúnmente formando cadenas y en general son no móviles pero cuando tienen movilidad es por la presencia de flagelos peritricos. (Samaniego y Sosa, 1998).

La pared celular de los lactobacilos, observada al microscopio electrónico es típicamente Gram-positiva y contiene peptidoglicanos (mureínas) de varios quimiotipos, de ahí que el peptidoglicano del tipo lisina-D-asparagina sea el más ampliamente distribuido. Esta pared también contiene polisacáridos unidos al peptidoglicano mediante enlaces fosfodiéster, pero sólo presenta ácidos teicoicos relacionados a ella en algunas especies. También pueden apreciarse al microscopio electrónico grandes mesosomas que caracterizan a este género. Solo las células muertas pueden dar resultados variables a la tinción de Gram. Además, no esporulan (Samaniego y Sosa, 1998).

1.2.2. Características de los cultivos y de las colonias:

Las colonias de lactobacilos en medios sólidos son pequeñas (2-5 mm), convexas, suaves, con márgenes enteros, opacas y sin pigmentos. Sólo en

algunos casos presentan coloración amarillenta o rojiza. Algunas especies forman colonias rugosas. Otras, como *Lactobacillus confusus*, presentan colonias viscosas por excepción.

Generalmente no presentan actividad proteolítica ni lipolítica que pueda apreciarse mediante halos claros formados en medios sólidos que contengan proteínas o grasas.

Normalmente no reducen los nitratos, pero esta reacción puede ocurrir en algunos casos, cuando el pH está por encima de 6,0. Los lactobacilos no licúan la gelatina ni digieren la caseína, aunque muchas cepas producen pequeñas cantidades de nitrógeno soluble.

Tampoco producen indol ni sulfídrico (H₂S). Son catalasa-negativas, pero algunas cepas producen la enzima pseudocatalasa que descompone el peróxido de hidrógeno. Son citocromo-negativos, por la ausencia de porfirinas; presentan una reacción bencidina negativa.

La producción de pigmentos por estas bacterias es rara y cuando ocurre, éstos pueden ser de color amarillo o naranja hacia un tono ferroso o rojizo.

Su crecimiento en medio líquido se presenta a través de éste, aunque sus células precipitan rápidamente después que el crecimiento cesa; dando lugar a un sedimento suave y homogéneo, sin formación de películas. En raras ocasiones este sedimento es granular o viscoso (Samaniego y Sosa, 1998).

Los lactobacilos no desarrollan olores típicos al crecer en medios comunes, pero contribuyen a modificar el sabor de alimentos fermentados (Samaniego y Sosa, 1998).

1.2.3. Nutrición y condiciones de crecimiento.

Los lactobacilos presentan particularidades para cada especie respecto a los requerimientos nutricionales de los aminoácidos, péptidos, derivados de ácidos

nucleicos, vitaminas, sales, ácidos grasos o ésteres de ácidos grasos y carbohidratos fermentables. Requieren no sólo carbohidratos como fuentes de carbono y energía, sino también: aminoácidos, vitaminas y nucleótidos. Generalmente estos requerimientos variados se encuentran disponibles cuando el medio de cultivo de los lactobacilos contiene carbohidratos fermentables, peptona, extracto de carne y extracto de levadura, la adición con Tween 80, resulta esencial para muchas especies. Por eso, estos compuestos se incluyen en el medio MRS. Existen especies que se adaptan a sustratos muy particulares y necesitan factores de crecimiento especiales (Samaniego y Sosa; 1998).

1.2.4. Condiciones ecológicas:

A) pH:

Los lactobacilos crecen bien en medios ligeramente ácidos con un óptimo de desarrollo entre 5,5 y 6,2. Su crecimiento cesa cuando el pH alcanza valores desde 4 hasta 3,6 en dependencia de especies y cepas y disminuye notablemente en medios neutros o ligeramente alcalinos. Los lactobacilos son capaces de disminuir el pH del sustrato donde se encuentran por debajo del valor 4,0 mediante la formación de ácido láctico. De esta forma evitan o al menos disminuyen considerablemente el crecimiento de casi todos los otros microorganismos competidores, exceptuando el de otras bacterias lácticas y el de las levaduras (Samaniego y Sosa, 1998).

B) Necesidades de oxígeno:

La mayoría de las cepas de lactobacilos son principalmente aerotolerantes; su crecimiento óptimo se alcanza bajo condiciones microaerofílicas o anaeróbicas y se conoce que un incremento de la concentración de CO₂ (de aproximadamente 5% o hasta el 10%) puede estimular el crecimiento, sobre todo en el caso del crecimiento superficial sobre medios sólidos (Samaniego y Sosa, 1998).

C) Temperatura de crecimiento:

La mayor parte de los lactobacilos son mesófilos (30 - 40°C), aunque su rango de temperatura para el crecimiento oscila entre 2 y 53°C, algunos crecen por debajo de 15°C y hay cepas que crecen por debajo de 5°C. Otros crecen a temperaturas bajas, cercanas al punto de congelación (por ejemplo, los que habitan en carnes y pescados congelados). Los llamados lactobacilos “termófilos” pueden tener un límite superior de temperatura de 55°C y no crecen por debajo de 15°C. (Samaniego y Sosa, 1998).

Tabla 1: Hábitats del género *Lactobacillus* (Stiles y Holzapfel, 1996)

Humanos	Cavidad oral Tracto intestinal Vagina
Otros hábitats	Plantas Suelo, aguas residuales y estiércol Alimentos fermentados (Leche, carne y vegetales) Productos de cereales
Desperdicio de alimentos	Cerveza Frutas y purés de cereales Pescado marinado Azúcar procesada Leche Carne y productos cárnicos Bebidas fermentadas

1.3 *Lactobacillus casei*:

1.3.1. Características generales:

Lactobacillus casei es una cepa heterogénea que coloniza varios ecosistemas de alimentos. Este microorganismo se agrega a algunos alimentos, con el fin de

mejorar la calidad de los mismos, y promover la salud humana y la animal (Gobetti, 1999).

Lactobacillus casei es una bacteria Gram-positiva, no posee movilidad, no esporula y es catalasa-negativa. Las células son bacilos de 0,7 – 1 x 2,0 – 4,0 µm, a menudo con terminaciones cuadradas, y que tienden a formar cadenas (Gobetti, 1999).

Es un microorganismo que se puede aislar normalmente de la leche y otros productos lácteos, el intestino humano y de la vagina. Los medios MRS (Man, Rogosa, Sharpe) y LBS (Lactobacillus Selection Agar) son los más recomendados para la enumeración y el aislamiento. *Lactobacillus casei* se distingue por su habilidad de crecer en sustratos como gluconato, malato y pentioles, que no son usuales en las bacterias lácticas. Su crecimiento ocurre a 15°C, pero no a 45°C. Su temperatura óptima es de 30°C (Gobetti, 1999).

1.3.2. Metabolismo.

Lactobacillus casei se clasifica dentro de los microorganismos heterofermentativos facultativos. Cuando hay ausencia de carbohidratos fermentables, *Lactobacillus casei* utiliza el citrato como fuente de energía; aunque el metabolismo del citrato se inhibe cuando hay pequeñas cantidades de glucosa disponible (Gobetti, 1999).

1.3.3. Algunos beneficios que se obtienen al consumir *Lactobacillus casei*:

Existen evidencias que sugieren que el consumo de *Lb. casei* ayuda a prevenir el estreñimiento, la diarrea, controlar la reproducción de las bacterias nocivas dentro del intestino, modular el sistema de defensa natural del organismo, fortalecer la resistencia a las infecciones y contribuye a evitar el cáncer de colon (Vergara, 2007).

1.4. *Lactobacillus acidophilus*:

Lactobacillus acidophilus es un bacilo Gram-positivo con terminaciones redondeadas, se encuentra agrupado en pares y en empalizadas. Es un microorganismo no flagelado, no móvil y no forma esporas. No tiene citocromos y por lo tanto es bencidina negativa. Es microaerofílico pero puede desarrollarse en la superficie de medios sólidos en condiciones de anaerobiosis. El desarrollo de este microorganismo puede ocurrir a altas temperaturas (45°C), pero su óptimo desarrollo se encuentra entre 35 – 40°C y un pH entre 5.5 – 6.0.

Las reacciones de fermentación son variables, la mayor parte de las cepas producen ácido pero no gas, a partir de glucosa, lactosa, maltosa y sacarosa y coagulan la leche en 48 horas (Mital y Carg, 1992).

Lactobacillus acidophilus tiene requerimientos complejos para su desarrollo. Requiere de baja tensión de oxígeno, carbohidratos fermentables, proteínas y productos como vitaminas del complejo B, derivados de ácidos nucleicos, ácidos grasos insaturados y minerales como magnesio, manganeso y hierro (Gomes y Malcata, 1999).

1.5. Probióticos:

El término probiótico significa “a favor de la vida”. Definiciones más recientes los indican como “ingrediente alimentario microbiano vivo, que al ser ingerido en cantidades suficientes, ejerce efectos benéficos sobre la salud de quien lo consume” (Ashwell, 2005).

En los últimos 20 años la investigación sobre los probióticos ha progresado considerablemente y se han realizado avances notables en la selección y caracterización de cultivos de probióticos concretos y la justificación de las declaraciones de propiedades saludables en relación con su consumo (FAO/OMS, 2003).

El comité de expertos de la FAO/OMS recomienda definir los probióticos como **“microorganismos vivos que, administrados en cantidades adecuadas ejercen un efecto beneficioso sobre la salud del consumidor”**.

Como microorganismos probióticos se utilizan sobre todo, aunque no exclusivamente, bacterias de los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, y el número de alimentos probióticos puestos a disposición de los consumidores es cada vez mayor (FAO/OMS, 2003).

1.5.1. Criterios para la evaluación de los probióticos en alimentos:

Para que un microorganismo sea considerado como probiótico debe demostrar un comportamiento no patógeno, ser GRAS (Generalmente considerados como seguros), resistente a la acidez gástrica y a los ácidos biliares, mostrar adherencia al tejido epitelial del intestino, persistir, aunque durante periodos cortos en el tracto gastrointestinal, producir sustancias antimicrobianas (bacteriocinas), mantener su viabilidad durante el procesamiento y almacenamiento de alimentos, su aplicación debe ser fácil a los productos alimenticios y debe mostrar resistencia a las propiedades fisicoquímicas de los alimentos procesados (Prado y col., 2007).

En cualquier caso, existen importantes excepciones y, además, su comportamiento en el tracto gastrointestinal y sus efectos varían entre las distintas cepas. De hecho muchos son incapaces de colonizar el intestino, ni siquiera temporalmente, y ejercen sus efectos de modo local durante su paso por el sistema gastrointestinal, por lo que deben ser ingeridos regularmente para que persista cualquier propiedad favorable a la salud (FAO/OMS, 2003).

1.5.2. Efectos en la microbiota intestinal:

La microbiota no se puede medir directamente, pero se puede determinar su contenido mediante el recuento de los microorganismos presentes en las heces, al igual que se puede detectar su actividad con marcadores enzimáticos.

Con estos métodos se ha podido ver como *Lactobacillus casei* puede modificar la microbiota intestinal y su actividad. La leche fermentada con *Lb. casei*, además de aumentar la población de lactobacilos en las heces, ha demostrado una disminución en la actividad de las enzimas β -glucuronidasa del colon, acidorreductasa glicólica y nitrorreductasa en adultos sanos.

En otro estudio, esta disminución en las actividades de la β -glucuronidasa y la β -glucosidasa en niños fue mayor tras la ingestión de una leche fermentada con cultivos de yogur y *Lb. casei* (Amores y col., 2004).

Hebuterne (2003), sugiere que la edad afecta a la microbiota intestinal, con una disminución en la población anaerobia y de bifidobacterias y un incremento de enterobacterias. Estos cambios y la reducida inmunidad intestinal pueden favorecer la aparición de infecciones gastrointestinales frecuentes en las personas mayores, por lo que los probióticos pueden ser interesantes por su efecto positivo sobre la función intestinal.

1.6. Beneficios que se obtienen al consumir microorganismos probióticos.

A) Efectos sobre el estreñimiento débil:

El tránsito intestinal lento es un problema común de las personas mayores. Diversos estudios sugieren que los probióticos mejoran parcialmente la motilidad intestinal y reducen la actividad enzimática fecal (Oliveira y González, 2007).

B) Prevención y tratamientos de la diarrea:

Se ha realizado un estudio multicéntrico en Europa, en el cuál se observó que la administración simultánea de una solución hipotónica de rehidratación oral y

Lactobacillus GG, en niños con diarrea aguda, redujo la duración de la diarrea y la estancia en el hospital (Oliveira y González, 2007).

La colonización del estómago por *H. pylori* afecta aproximadamente al 50% de la población en general. A largo plazo, *H. pylori* es la causa principal de úlcera péptica y un factor de riesgo para el cáncer gástrico en humanos. La erradicación de este patógeno se basa actualmente en una terapia con dos o tres antibióticos más un inhibidor de la bomba de protones. En distintos estudios clínicos y modelos in vitro se ha demostrado que la asociación de lactobacilos junto con antibióticos para el tratamiento de *H. pilory* ejerce un efecto antagonista frente a este microorganismo. Más recientemente, en dos estudios doble ciego se observó el efecto favorable sobre la gastritis asociada a *H. pilory* con la única administración de leche fermentada que contenía *Lactobacillus johnsonii* La1, o bien *Lactobacillus gasseri*; con este último se redujo la inflamación gástrica, pero en ninguno de los estudios se pudo confirmar la erradicación de *H. pilory*. (Amores y col., 2004).

Así mismo, se ha descrito el efecto beneficioso de *Lactobacillus* GG en la diarrea del viajero, aunque los resultados no han sido uniformes debido a las diferentes áreas geográficas y las características de las poblaciones estudiadas (Oliveira y González, 2007).

C) Intolerancia a la lactosa:

S. termophilus, especie perteneciente al grupo de *Streptococcus salivarius*, se ha usado mayormente como probiótico por su capacidad de fermentar la lactosa. La aportación de la lactasa a partir de cultivos bacterianos se basa en intentar mejorar la digestión de la lactosa en los pacientes con intolerancia a ésta (Oliveira y González, 2007).

D) Efectos moduladores sobre el sistema inmunitario:

Se ha observado que ciertas cepas bacterianas ácido-lácticas intervienen sobre las reacciones de hipersensibilidad retardada, la producción de anticuerpos y la activación funcional de los macrófagos. Se probó en un grupo de voluntarios sanos una leche fermentada suplementada con *Lb. acidophilus* La1 o *B. bifidum* Bb12, y se midió la actividad fagocítica de los leucocitos en sangre, la cual se vio aumentada en ambos grupos, ocurriendo paralelamente con la colonización fecal por bacterias ácido-lácticas que permanecieron en el intestino durante seis semanas tras la ingestión del producto. Los estudios más recientes aseguran que el mecanismo de fagocitosis se activa e incrementa en los tratamientos con bebidas lácteas enriquecidas con lactobacilos, y que va acompañado de la producción de varias citocinas, como el interferón gamma, la interleucina 12 y la interleucina 10 (Oliveira y González, 2007).

E) Cáncer:

El cáncer colorrectal es una de las principales causas de mortalidad prematura de los europeos adultos. Aunque no existe una demostración experimental directa para la supresión del cáncer en seres humanos como consecuencia del consumo de bacterias ácido-lácticas, hay ciertas pruebas indirectas en determinados estudios que se encuentran en la literatura (Rafter, 2002). Al estudiar el efecto de ciertas leches fermentadas con diferentes cepas de bacterias ácido-lácticas, se ha observado una inhibición sobre el crecimiento de una línea celular de cáncer. Este efecto antiproliferativo puede ser útil en la prevención y el tratamiento de tumores graves (Tabla 2).

F) Infecciones urinarias:

Se han usado varias especies de lactobacilos en la prevención y el tratamiento de infecciones del tracto urinario. La presencia de lactobacilos en la vagina está asociada con un reducido riesgo de vaginosis bacteriana e infecciones del tracto urinario. La administración vaginal de cepas de *Lactobacillus* GR-1 y B-54 o RC-14 reduce el riesgo de infecciones del tracto urinario y mejora el mantenimiento

de una flora normal. Así mismo, la administración por vía digestiva de estos lactobacilos ha mostrado efectos similares sobre la microbiota vaginal (Tabla 2).

G) Reducción del colesterol:

La administración de *Lactobacillus reuteri* CRL 1098 (10^4 UFC/día) a ratones con hipercolesterolemia durante siete días disminuyó el colesterol total en un 38%, originando concentraciones séricas de colesterol similares a las del grupo control. Esta dosis de *Lb. reuteri* causó una reducción de un 40% en los triglicéridos y un aumento del 20% en el cociente LDL/HDL, sin modificar la flora normal del bazo y el hígado (Taranto y col., 1998). En un estudio reciente se ha observado que el consumo diario a largo plazo de 300mg de yogur suplementado con *L. acidophilus* y *B. longum* incrementaba la concentración sérica HDL y conducía a la mejora de la proporción LDL/HDL (Amores y col., 2004).

A continuación se presenta un resumen con los beneficios a la salud que aporta el consumo de microorganismos probióticos; así como el mecanismo de acción en el organismo.

Tabla 2: Efectos potenciales de bacterias probióticas, cuyos mecanismos se han identificado (Adaptada de Sanders y Huis in't Veld, 1999).

Beneficio en la salud	Mecanismo postulado
Ayuda a la digestión de la lactosa	La lactasa bacteriana hidroliza la lactosa
Resistencia a las bacterias patógenas	Alteración de las condiciones intestinales para ser menos favorable para patogenicidad. Influencia en las poblaciones de la microbiota intestinal. Fijación a la mucosa intestinal
Efectos contra el cáncer de colon	Inhibición de productos enzimáticos carcinogénicos de los microorganismos colónicos. Respuesta inmune
Crecimiento de las bacterias del intestino delgado	Influencia en la concentración de sales biliares. Influencia en la actividad de crecimiento de la flora, disminuyendo la producción de metabolitos tóxicos.
Modulación del sistema inmune	Efectos coadyuvantes en respuestas inmunes antígenas específicas.
Alergias	Prevención de la translocación de antígenos dentro del torrente sanguíneo.
Lípidos en la sangre, enfermedades del corazón	Asimilación del colesterol dentro de células bacterianas. Efectos antioxidativos.
Infecciones urogenitales	Fijación a las células del tracto urinario y vaginal.
Infecciones causadas por <i>Helicobacter pylori</i>	Producción de inhibidores de <i>H. pylori</i> (ácido láctico y otros).

1.6. Prebióticos:

El término prebiótico se refiere a un **“ingrediente alimentario no digerible que afecta beneficiosamente al huésped mediante la estimulación selectiva del crecimiento y/o actividad de una o un número limitado de bacterias en el colon”** (Oliveros y Moreno, 2006).

La eficacia de los prebióticos está ligada a su capacidad de resistir la digestión en el intestino delgado y alcanzar el intestino grueso, donde serán utilizados selectivamente por un restringido grupo de microorganismos, fundamentalmente bifidobacterias y lactobacilos.

Los prebióticos están constituidos por macromoléculas no digeribles, debido a que las enzimas del intestino humano no pueden hidrolizarlas. Para que una sustancia (o grupo de sustancias) pueda ser definida como tal debe cumplir los siguientes requisitos: Formar parte de un conjunto muy heterogéneo de moléculas complejas, no ser digerida por las enzimas digestivas y ser parcialmente fermentadas por las bacterias colónicas (Oliveros y Moreno, 2006).

Algunos ejemplos de prebióticos son los oligosacáridos de soya, galactooligosacáridos, inulina, lactulosa, sorbitol, xilitol, isomaltosa y oligosacáridos

1.6.1. Fructooligosacáridos:

Los FOS son los oligosacáridos no digeribles más extensamente estudiados en términos de sus propiedades prebióticas. Son carbohidratos de reserva que se encuentran en alimentos tales como la cebolla, espárragos, alcachofas, ajo, trigo, tomates, plátano y miel. Su estructura química consiste en una cadena de unidades de fructosa con una unidad de glucosa terminal unidas por enlace glucosídico β (2→1), característica que los define como oligosacáridos no digeribles (NDO), que hace que no puedan ser degradados por las enzimas

digestivas humanas que son específicas para uniones α -glucosídicas. La longitud de la cadena de estos FOS puede variar entre 2 y 60 unidades (Sabater, 2008).

Existen tres categorías de FOS que tienen diferencias estructurales:

1.6.2. Inulina:

Es un fructano polidisperso, cuyas unidades de fructosa en la mezcla de polímeros lineales y oligómeros se encuentran unidos por enlaces β (2-1). El aspecto esencial de la estructura de la inulina son sus enlaces β (2-1), ya que éstos son responsables de que no sea digerida como un hidrato de carbono típico.

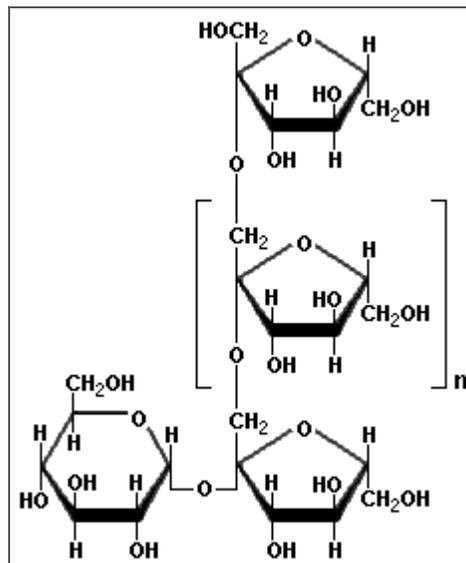


Figura 2: Estructura química de la Inulina (n = número de unidades de fructosa (inulina, n = 2-60; oligofructosa, n = 2-20, Murphy, 2001).

Por sus propiedades químicas es considerada como fibra dietética porque se encuentra dentro de la definición empleada por la AOAC, quien la define como: “remanentes de células de las plantas resistentes a la hidrólisis por las enzimas que actúan en la alimentación humana”.

La inulina es fermentada en el colon por bifidobacterias; dando lugar a productos de degradación tales como ácidos grasos de cadena corta, dióxido de carbono y otros metabolitos (Madrigal y Sangronis, 2007).

1.6.3. Oligofruktosa:

La oligofruktosa es definida como una fracción de oligosacáridos con grado de polimerización menor de 20, aunque los productos comerciales suelen tener un valor medio de nueve. Es producida por hidrólisis enzimática de la inulina y consiste en una mezcla de cadenas de fructosil, con glucosa y fructosa terminales (Madrigal y Sangronis, 2007).

1.6.4. Fructooligosacáridos de cadena corta:

Están específicamente definidos como una mezcla de cadenas de fructosil con una unidad terminal de glucosa con un máximo de 5 unidades.

Los FOS de cadena corta constan estructuralmente de una molécula de sacarosa a la que se pueden unir por enlaces glicosídicos β (2→1) de 1 a 3 moléculas de fructosa dando lugar respectivamente a los fructooligosacáridos: 1 kestosa (GF2), nistosa (GF3) y 1-fructofuranosil-nistosa (GF4) (Roberfroid y Delzenne, 1998).

Los FOS pueden ser obtenidos por dos procesos diferentes dando lugar a productos finales ligeramente diferentes:

En el primer método, los FOS se producen a partir de la sacarosa usando la actividad de transfructosilación de la enzima β -fructofuranosidasa y el fructooligosacárido formado tiene entre 2 y 4 unidades fructosil β (2→1) unidas a un residuo terminal de α -D-glucosa. El segundo método, usado para la producción de FOS, es la hidrólisis enzimática controlada de la inulina. En este caso no todas las cadenas fructosil β (2→1) acaban en una glucosa terminal y la mezcla de oligosacáridos producida contiene cadenas de fructo-oligómeros más

largas que las producidas por el proceso de transfructosilación de la sacarosa (Crittenden y Playne, 1996).

1.6.5. Aplicaciones generales de los FOS:

Los FOS tienen numerosas propiedades interesantes: Baja intensidad edulcorante. Esta propiedad es usada en gran variedad de alimentos donde el uso de la sacarosa está restringido por su alto dulzor (Yun, 1996). No aportan calorías, es decir, el cuerpo humano carece de las enzimas necesarias para hidrolizar las uniones beta, por lo que no pueden ser hidrolizados por las enzimas digestivas. Así pues, estas sustancias no se pueden utilizar como fuente de energía para el cuerpo, por lo que son saludables para diabéticos y personas en regímenes de adelgazamiento (Yun, 1996).

No son cariogénicos, ya que no son usados por *Streptococcus mutans* para formar ácidos y β -glucanos insolubles, que son los principales causantes de la caries dental (Yun, 1996).

1.6.6. La degradación bacteriana de los FOS:

La degradación bacteriana de los FOS ocurre en dos etapas:

En la primera etapa los polímeros son hidrolizados por β -hidrolasas bacterianas. En la segunda, los monómeros liberados son fermentados anaeróbicamente produciendo ácidos grasos volátiles de cadena corta (tales como acetato, propionato y butirato) y gases (H_2 , CH_4 y CO_2).

La inulina y la oligofructosa están oficialmente reconocidos como ingredientes naturales (no como aditivos) de los alimentos y son clasificados como fibra de la dieta en la mayoría de los países europeos. Pueden ser usados sin limitaciones específicas como ingredientes en comidas y bebidas.

Actualmente la inulina y los FOS están siendo incluidos en numerosos productos alimentarios humanos y animales por su efecto positivo como prebióticos estimulantes del crecimiento de la flora intestinal no patógena (Fernández, 2003).

1.6.7. Efectos beneficiosos de los prebióticos en el organismo:

El efecto prebiótico incluye la resistencia a la acidez gástrica, a la hidrólisis por las enzimas intestinales humanas y a la absorción intestinal, así como el ser fermentados por la microbiota intestinal y el hecho de que estimulen de forma selectiva el crecimiento y/o la actividad de las bacterias que contribuyen al bienestar y a la salud del hospedero, confieren a los FOS su propiedad de prebióticos.

Los productos finales de la fermentación de los FOS por las bacterias colon, como los ácidos grasos de cadena corta, son absorbidos y utilizados por las células del epitelio colónico humano, estimulando su crecimiento así como la absorción de sales y agua, lo que da lugar a un incremento de la humedad del bolo cecal a través de la presión osmótica, con la consecuencia del aumento de la motilidad intestinal dando lugar así al alivio del estreñimiento. El incremento del bolo cecal estimula el paso a través del colon, dando como resultado un tiempo de tránsito más corto y una reducción del tiempo disponible para la reabsorción del agua. Todos estos factores dan lugar a un incremento del peso de las heces con una composición más suave (Hernández y Jiménez, 2010).

Recientes investigaciones sugieren que los FOS pueden inhibir el proceso de desarrollar cáncer de colon, principalmente por el aumento de bacterias beneficiosas y los ácidos grasos de cadena corta producidos durante la fermentación de los FOS en el colon. Las bacterias que promueven la salud inhiben el crecimiento de bacterias patógenas y disminuye así la producción de sustancias carcinógenas y enzimas bacterianas que desempeñan un papel en la carcinogénesis del colon. Al mismo tiempo, el crecimiento bacteriano incrementa la biomasa y el bolo cecal acelerando el tiempo de transito colónico.

Consecuentemente, el tiempo de exposición de la microbiota colónica a los potenciales agentes carcinógenos disminuye.

Los FOS son metabolizados selectivamente por las bifidobacterias; esta fermentación selectiva produce un medio ácido debido a la presencia de ácido láctico, propionico y butírico; estos compuestos inhiben el crecimiento de especies de bacterias patógenas.

La presencia de FOS se asocia a un mejor aprovechamiento por parte del organismo de los minerales calcio y magnesio, los cuáles son componentes fundamentales de huesos y dientes (Araya y Lutz, 2003).

1.7. El agave azul:

Agave tequilana Weber variedad azul, es la materia prima para la elaboración del Tequila, símbolo de identidad mexicana y reconocida fuente de importante entrada económica para varios estados de nuestro país (Martinez y col., 2008).

La industria tequilera procesa alrededor de un millón de toneladas anuales de El Agave tequilana Weber variedad azul. Las pencas de agave son un residuo de la producción de tequila, éstas se dejan en el campo de cultivo generando focos de contaminación y tienen poca aplicación industrial. Las pencas contienen carbohidratos como inulina, pectina y xilanos, que podrían usarse como fuente de carbono para la producción de enzimas microbianas de interés industrial (Gutierrez y col., 2010).

1.7.1. Inulina de agave:

En los últimos años, en México, el Agave tequilana Weber variedad azul se ha utilizado como una fuente de inulina. Los fructanos de Agave tequilana consisten en una compleja mezcla de fructooligosacáridos conteniendo principalmente

enlaces $\beta(1-2)$ así como también $\beta(2-6)$. En 2003, López y colaboradores, describen que se han determinado moléculas ramificadas en la estructura de estos polímeros, lo cual se observa en la figura 3.

Debido a la configuración β del C_2 anomérico en sus monómeros de fructosa, los fructanos del tipo de la inulina, resisten la hidrólisis de las enzimas digestivas del intestino delgado de los humanos, las cuáles reconocen de manera específica los enlaces α -glucosídicos. Sin embargo, estas moléculas son fermentadas en el colon. Por lo anterior han sido clasificadas como oligosacáridos no digeribles e indudablemente son parte de la fibra dietética (Lopez y col., 2003).

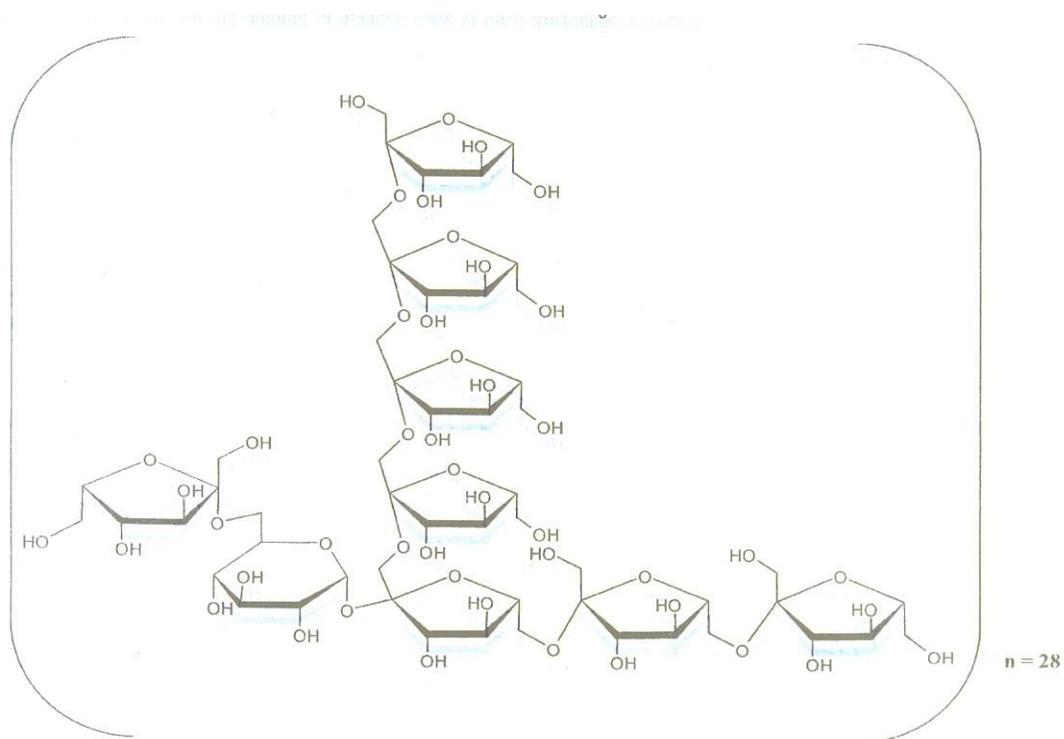


Figura 3: Estructura de la inulina que se obtiene del Agave variedad azul (Lopez y cols., 2003).

1.8. Suero de leche:

1.8.1. Definición y composición del suero de leche:

El lactosuero, suero lácteo o suero de queso es el líquido que se separa de la leche cuando ésta se coagula para la obtención del queso, son todos los componentes de la leche que no se integran en la coagulación de la caseína. Su composición varía dependiendo del origen de la leche y el tipo de queso elaborado, pero en general el contenido aproximado es de 93.1% de agua, 4.9% de lactosa, 0.9% de proteína cruda, 0.6% de cenizas (minerales), 0.3% de grasa, 0.2% de ácido láctico y vitaminas hidrosolubles. Cerca del 70% de la proteína cruda que se encuentra en el suero corresponde a proteínas con un valor nutritivo superior al de la caseína, como son β -lactoglobulina, α -lactoglobulina, inmunoglobulinas, proteosa-peptonas y enzimas nativas. De acuerdo a su acidez, el suero se divide en dulce (pH mayor de 8), medio ácido (pH 5-5.8) y ácido (pH menor a 5) (Early, 2004).

La fracción proteica es el componente más importante de los sólidos, representando el 20% del total de las proteínas lácteas. Siendo la β -lactoglobulina la más abundante (50%) es rica en lisina, leucina, ácido glutámico y ácido aspártico además de la cisteína. La α -lactoalbúmina (25%) es otra de las proteínas importantes del suero, debido, a que es rica en triptófano y cisteína. Estas dos proteínas forman del 70 – 80% del contenido proteico.

Las proteínas bioactivas más importantes del suero son la β -lactoglobulina, la α -lactoalbúmina y la lactoferrina (Hugunin, 2008).

1.8.2. Beneficios que ofrecen los productos elaborados con suero de leche:

Los productos de suero de leche ofrecen beneficios funcionales múltiples que pueden ayudar a los formuladores a reemplazar ingredientes menos deseables.

Proporcionan sólidos de leche sin grasa en muchas fórmulas de yogurt además que no solo permiten que el procesador reduzca los costos del ingrediente, también ofrecen propiedades funcionales únicas y una fuente concentrada de nutrientes de leche (proteínas y calcio altamente nutricionales) (Hugunin, 2008).

1.8.3. Contaminación por suero de leche:

El suero de leche, representa del 80 al 90 por ciento del volumen lácteo transformado por la industria lechera y que para su tratamiento biológico demanda una elevada cantidad de oxígeno. La producción de suero en México es cerca de 1 millón de toneladas y contiene 50 mil toneladas de lactosa potencialmente transformable y 9 mil toneladas de proteína potencialmente recuperable. A pesar de esta riqueza nutricional, potencialmente utilizable, el 47% de lactosuero es descargado al drenaje y llega a ríos y suelos, causando un problema serio de contaminación (Carrillo, 2002).

1.9. Alimentos funcionales:

Los alimentos funcionales son definidos como aquellos que, además de satisfacer las necesidades nutricionales básicas, proporcionan beneficios para la salud o reducen el riesgo de sufrir enfermedades.

Un alimento puede considerarse “funcional” si se demuestra satisfactoriamente, que, además de sus efectos nutritivos, afecta beneficiosamente a una o más funciones del organismo de modo que mejora el estado de salud o bienestar o reduce el riesgo de enfermedad (Diplock y col., 1999).

1.9.1. Aspectos importantes y novedosos en la definición de Alimentos Funcionales:

El efecto funcional es distinto al nutritivo, debe demostrarse satisfactoriamente este efecto y consiste en la mejoría de funciones fisiológicas (incluyendo funciones psicológicas como el bienestar) o en reducción de riesgo de desarrollar un proceso patológico (Diplock y col., 1999).

Otra serie de características adicionales que son compatibles con el concepto son: un alimento funcional siempre debe ser un alimento (se excluyen explícitamente píldoras y cápsulas), pero puede ser un alimento natural o también un alimento transformado tecnológicamente para retirar o modificar alguno de sus componentes o añadir un nuevo elemento. Estas transformaciones no confieren necesariamente el carácter de alimento funcional, sino que el efecto funcional debe demostrarse expresamente en cada caso (Diplock y col., 1999).

1.10. Definición de productos simbióticos:

Se ha definido como simbiótico a la combinación de prebióticos con probióticos, donde los primeros constituyen un sustrato fermentable por los microorganismos probióticos, favoreciendo y estimulando su desarrollo y permanencia en el intestino lo cual beneficia al huésped mediante el aumento de la sobrevivencia e implantación de los microorganismos vivos de los suplementos dietéticos en el sistema gastrointestinal (Van Loo, 1995).

La ingestión de suplementos microbióticos vivos (probióticos), de ingredientes alimentarios que estimulan la acción bacteriana (prebióticos) o de ambos asociados (simbióticos) mejora sensiblemente el funcionamiento intestinal, manteniendo el equilibrio de este complicado ecosistema (Peña, 2007).

1.10.1. Efectos beneficiosos de los productos simbióticos.

Entre los efectos beneficiosos de los simbióticos se puede decir que evitan o disminuyen el estreñimiento funcional, colaboran en la defensa natural contra las infecciones entéricas actuando como análogos del receptor impidiendo la adhesión de los patógenos al epitelio intestinal, interactúan mediante un mecanismo inmunológico; o indirectamente modificando la microbiota intestinal, inhibiendo los coliformes y manteniendo el trofismo de la mucosa, potenciando el efecto de las bacterias benéficas, manteniendo la flora bacteriana intestinal local, que actúa como mecanismo defensivo del huésped e impidiendo la translocación bacteriana (paso de gérmenes intestinales a través de la pared a órganos que normalmente son estériles, como el hígado, bazo, pulmón y páncreas). En la tabla 3 se presentan algunos alimentos simbióticos, así como sus principales características y funciones.

Tabla 3: Alimentos simbióticos, características y funciones.

Producto alimenticio	Probióticos/ Prebióticos	Concentración		Conclusiones Investigación Científica
Nutribén® Simbiotic (1)	<i>Bifidobacterium longum</i> <i>Streptococcus thermophilus</i> Oligosacáridos	10 ⁷ UFC/g 10 ⁶ UFC/g	Nutribén® Simbiotic tiene efecto Simbiótico, que surge de la combinación de probióticos y prebióticos en un mismo producto	Refuerza las defensas naturales del bebé. Favorece las funciones intestinales. Facilita la digestión de nutrientes como la lactosa. Normaliza el tránsito intestinal.
PediaSure Plus (2)	Adicionado con Simbióticos (No disponibles en bibliografía).	No disponibles en bibliografía	Pediasure Plus es el único suplemento alimenticio infantil con formula balanceada que apoya la nutrición de los niños cuando no comen bien.	Ayuda al desarrollo mental. Fortalece el sistema inmune. Contribuye en el desarrollo físico con músculos y huesos fuertes.
Sancor Bio (3)	<i>Lactobacillus casei</i> Sancor CRL 431+ <i>Lactobacillus acidophilus</i> Sancor CRL 730 (<i>johnsonii</i>) Fructanos naturales (Inulina, FOS)	No disponible en bibliografía	“Sancor Bio mucho más que <i>L – casei</i> ”.	Disminuye tiempo de duración de diarreas persistentes. Prevención de enfermedades respiratorias. Ayuda a prevenir la osteoporosis. Modula balance de linfocitos Th1 y Th2. <i>L. casei</i> SanCor CRL431 puede proteger contra la infección por <i>Salmonella</i> . Disminuye síntomas de intolerancia a la lactosa. Estimulación del sistema inmune.
Acti Regularis (4)	<i>Bifidobacterium animalis</i> DN 173010 + Prebiótico FOS (inulina)	10 ⁸ UFC/mL	“Ayuda a regularizar el tránsito enlentecido”.	Ayuda al equilibrio de la flora, reduciendo el tiempo de tránsito intestinal.

Fuente: Elaboración propia.

- 1.- www.nutriben.es, último acceso, 11/10/2012.
- 2.- www.abbottmama.com.mx, último acceso, 11/10/2012.
- 3.- www.sancor.com, último acceso, 11/10/2012.
- 4.- www.yoguractivia.com, último acceso, 11/10/2012.

2. JUSTIFICACIÓN:

Actualmente las tendencias de consumo de alimentos en los países desarrollados y en muchos de los países en desarrollo, están orientadas a la adquisición de alimentos cuyo consumo genere beneficios adicionales a la nutrición básica (Sarmiento, 2008). El desarrollo de alimentos que promuevan la salud en general y el bienestar han sido una prioridad de investigación para la industria alimentaria, los alimentos con compuestos saludables como los probióticos y los prebióticos son en efecto más y más extensos (Rodrigues y col., 2010).

La demanda del mercado nacional e internacional de alimentos que promuevan la salud ha impulsado en los últimos años una nueva línea de alimentos funcionales probióticos, productos alimenticios que, además de su valor nutritivo intrínseco, ayudan a mantener el estado de salud general del organismo y a la vez pueden tener un efecto benéfico adicional, terapéutico o preventivo en el huésped (Taranto y col., 2005).

Los profesionales de la salud están reconociendo cada vez más los efectos beneficiosos de los probióticos sobre la salud y la nutrición humana paralelamente, aumentó considerablemente el número y tipo de los alimentos y bebidas probióticas disponibles a los consumidores (Consulta de Expertos FAO/OMS, 2003).

El sector de bebidas es un segmento del mercado especialmente abierto a introducir conceptos de productos funcionales. Las bebidas lácteas siempre han sido consideradas beneficiosas para la salud, pero con la caída en los niveles de consumo de la leche existen grandes oportunidades de innovación en este sector.

Las leches bebibles fermentadas probióticas han conquistado los mercados de Europa y han contribuido a que los consumidores sean cada vez más conscientes de la importancia de una buena salud digestiva. Probablemente el desarrollo más interesante para buscar en el futuro en el sector de bebidas lácteas es la combinación de los beneficios de cultivos probióticos e ingredientes prebióticos (Inulina y FOS) para formular productos simbióticos (Wouters, 2006).

Por otra parte, algunos efluentes de la industria lechera forman parte de los contaminantes más severos que existen, tal es el caso del suero de leche, un subproducto de la manufactura de quesos, caseína, caseinatos y mantequilla

Existen muchos beneficios resultantes de la adición de suero de leche a ciertos productos alimenticios como las bebidas fermentadas, ya que no solo permite que se reduzca el costo de los ingredientes, también ofrece propiedades funcionales únicas y una fuente concentrada de nutrientes de leche (proteínas y calcio).

Existe una empresa mexicana formada por organizaciones campesinas e indígenas que promueven el cultivo orgánico. La misión de esta empresa es promover el desarrollo respetando a las culturas indígenas, con políticas socialmente responsables ambientalmente sustentables y economías factibles para todos; sus principales objetivos son promover la salud de quienes consumen y producen sus productos, la ecología respetando al medio ambiente, que los productos cuenten con la más alta calidad, garantizar un precio justo a los consumidores así como el desarrollo de la comunidad. Esta empresa produce fibras dietéticas orgánicas de una fuente de origen mexicano: El agave azul, cosechado en los campos del estado de Jalisco.

La elaboración de una bebida fermentada con ingredientes como el suero de leche, inulina, FOS y microorganismos probióticos traerá como resultado la obtención de un producto alimenticio simbiótico de buena calidad y seguro para el consumo humano.

HIPÓTESIS:

Ya que las bebidas obtenidas por fermentación láctica son agradables al consumo humano, se logrará obtener una bebida fermentada a base de suero de leche, que tenga un beneficio adicional al nutrimental, con presencia de bacterias probióticas y con los prebióticos inulina y/o FOS.

3. OBJETIVO:

Elaborar una bebida simbiótica a partir de suero de leche, microorganismos probióticos y compuestos prebióticos del agave con características sensoriales agradables al consumidor.

3.1. Objetivos particulares.

- Determinar la cinética de crecimiento de las cepas probióticas en medios MRS-Inulina y MRS-FOS.
- Determinar la cinética de crecimiento en medios elaborados con suero de leche, inulina y FOS.
- Determinar la sobrevivencia de las bacterias probióticas durante un mes de almacenamiento a 4°C.
- Realizar una evaluación sensorial para determinar el grado de aceptación de las bebidas simbióticas.

4. MATERIALES

4.1. Cepas probióticas:

Las cepas liofilizadas *Lactobacillus casei* subespecie *paracasei* LMGP-21380 y *Lactobacillus acidophilus* LMGP-21381, se adquirieron de ALCE S.R.L. (Novara, Italia). Estas cepas estaban empaquetadas en bolsas flexibles de aluminio que contenían 50 gramos de cepa liofilizada y se mantuvieron en refrigeración a una temperatura de 4°C para su conservación.

4.1.2. Fibra orgánica soluble de agave:

La inulina y los FOS proporcionados para realizar este proyecto son fibras dietéticas orgánicas de una fuente de origen mexicano: El Agave Azul, cosechado en los campos del estado de Jalisco. La estructura ramificada (β (2-1) y β (2-6) levógiro), hace que estas fibras orgánicas sean muy solubles en agua fría (por encima del 15% a 4°C). Estas fibras orgánicas también ofrecen una única ventaja: ya que están orgánicamente certificados, siendo una de las pocas fibras dietéticas solubles orgánicas en el mercado a la fecha.

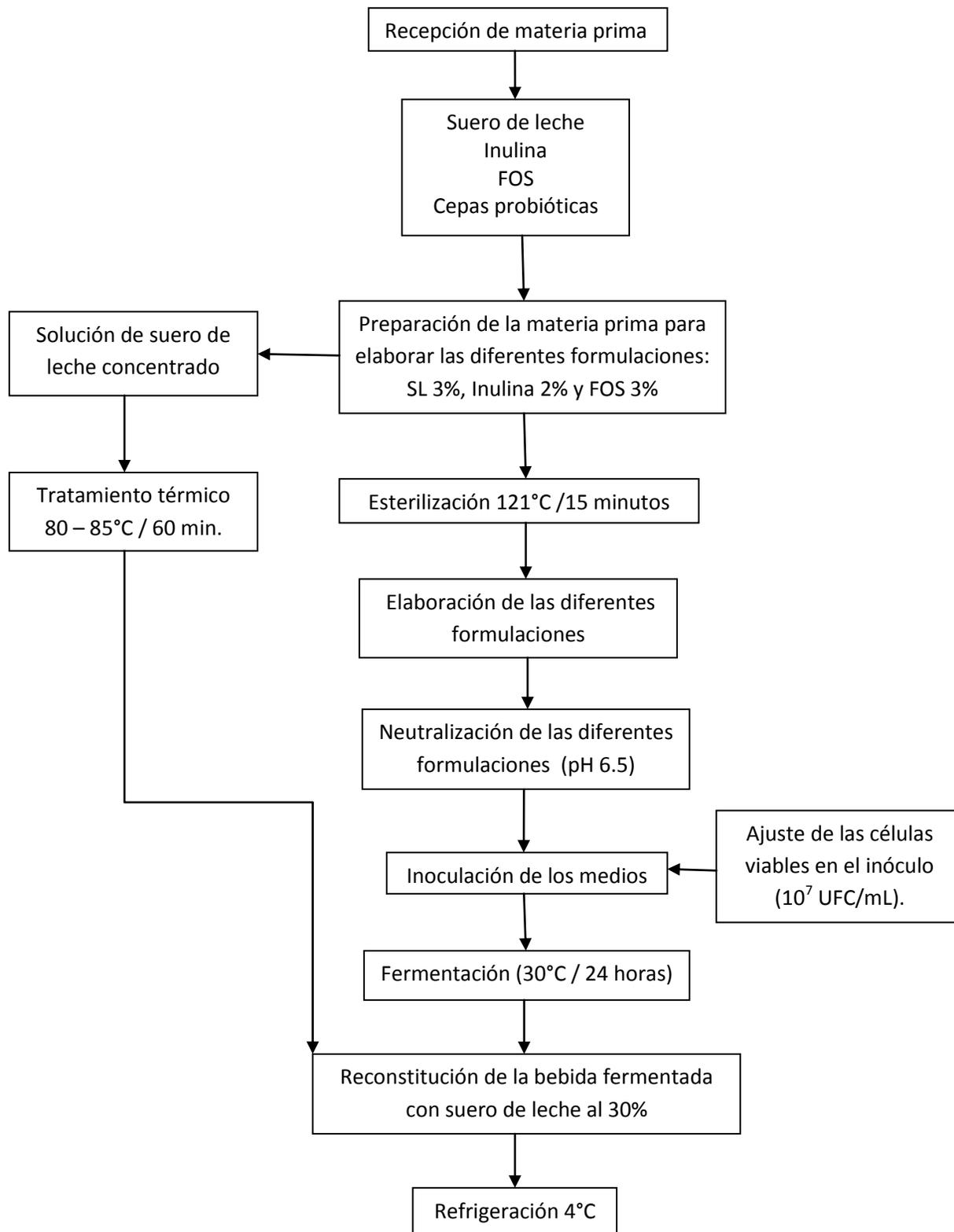
4.1.3. Suero de leche en polvo:

El suero de leche que se usó para la elaboración de este producto estaba contenido en sacos de 25 kilogramos de papel kraft sellados, del cual solo se compró la cantidad de 3 kilogramos, en el anexo 1 se presentan sus especificaciones comerciales.

4.1.4. Carbonato ácido de sodio en polvo.

Es un regulador de acidez, antiaglutinante y leudante. Puede utilizarse en productos elaborados con suero de leche en polvo. Podrá ser usado para neutralizar el suero en polvo y productos a base de suero en polvo, excluidos los quesos de suero.

5. MÉTODOS: A continuación se presenta un esquema general para la elaboración de las bebidas simbióticas.



Esquema general de la metodología para la elaboración de las diferentes bebidas simbióticas.

5.2. Conservación en glicerol de las cepas liofilizadas:

De las células deshidratadas comerciales para cada cepa se tomó una cantidad de ella con la punta de una espátula y se colocaron en 100mL de caldo MRS, se incubó a una temperatura de 30°C por 24 horas, posteriormente y en condiciones de asepsia se tomó 1mL de cada medio inoculado con las diferentes cepas probióticas y se vaciaron a tubos criogénicos estériles que contenían 0.5mL de glicerol, se homogeneizó el medio con el glicerol y se congelaron estos tubos a una temperatura de -65°C hasta su posterior uso. Esto se utilizó para generar el inóculo, el cual se describe en los siguientes incisos.

5.3. Determinación de la cinética de crecimiento de las cepas probióticas en los medios MRS, MRS-inulina y MRS-FOS.

Las cepas *Lactobacillus casei* subespecie *paracasei* LMGP-21380 y *Lactobacillus acidophilus* LMGP-21381 se reactivaron en viales que contenían 4.5mL de caldo MRS-glucosa, inoculando 100µL de cada una de las cepas que se encontraban conservadas en glicerol (inciso 5.2). Posteriormente se incubaron a una temperatura de 30°C por 24 horas. Transcurrido este tiempo se tomó 1mL de estos cultivos y se inocularon en matraces que contenían 100mL de medio MRS, MRS-Inulina y MRS-FOS, se construyeron curvas de desarrollo para cada microorganismo, monitoreando el crecimiento de cada una de las cepas cada tres horas, durante las primeras 12 horas, también se realizaron las mediciones a las 24 y 48 horas. En cada etapa, se determinaron la densidad óptica (600nm) y el pH.

5.4. Determinación de la cinética de crecimiento de las cepas probióticas en los medios MRS, MRS-inulina y MRS-FOS provenientes del mismo medio de cultivo.

Para observar si el desarrollo de las cepas *Lactobacillus casei* subespecie *paracasei* LMGP-21380 y *Lactobacillus acidophilus* LMGP-21381 se optimizaba cuando las cepas provenían del mismo medio, se realizó lo siguiente, en viales que contenían 4.5mL de caldo MRS-glucosa, MRS-inulina y MRS-FOS respectivamente, se inocularon 100µL de cada una de las cepas que se encontraban conservadas en glicerol (inciso 5.2) y posteriormente se incubaron a una temperatura de 30°C por 24 horas. Transcurrido este tiempo se tomó 1mL de estos cultivos y se inocularon en matraces que contenían 100mL de medio MRS, MRS-Inulina y MRS-FOS, correspondientes a los viales de los cuáles provenían. Por último se construyeron curvas de desarrollo para cada microorganismo, monitoreando el crecimiento de cada una de las cepas cada tres horas, durante las primeras 12 horas, también se realizaron las mediciones a las 24 y 48 horas. En cada etapa, se determinaron la densidad óptica (600nm) y el pH.

5.5. Determinación de la cinética de crecimiento de las cepas probióticas en los medios sueros de leche, suero de leche con inulina, suero de leche con FOS y suero de leche con inulina y FOS.

Las cepas probióticas se reactivaron a partir de los cultivos conservados en glicerol (inciso 5.2) tomando 100µL de cada cepa y se inocularon en viales que contenían 4.5mL de caldo MRS a una temperatura de 30°C por 24 horas. Como los medios que contenían suero de leche no eran traslúcidos no fue posible determinar la densidad óptica para el seguimiento del crecimiento de las cepas, así que, se procedió a realizar un conteo de células viables de la siguiente forma: se realizaron las diluciones seriadas necesarias en solución salina al 0.85%, y se inóculo por duplicado 0.1mL de las diluciones en placas con agar MRS mediante extensión por superficie en placas de agar usando una asa metálica. Estas placas

se incubaron por 48 horas a una temperatura de 30°C en aerobiosis y transcurrido este tiempo se realizó el conteo de colonias; considerando solo las cajas que tenían de 10 a 300 colonias características (forma circular y pequeña, elevación convexa, margen entero, color blanco y textura lisa).

5.6. Descripción general de la preparación de los componentes: suero de leche, suero de leche concentrado, inulina, FOS y carbonato ácido de sodio para elaborar las bebidas simbióticas.

Se solubilizaron en agua y por separado los ingredientes suero de leche, inulina y FOS. Se mezclaron y se añadieron en cantidades previamente recomendadas para elaborar las diferentes formulaciones de la bebida. Se fermentaron las diferentes formulaciones con las dos cepas probióticas hasta alcanzar el pH deseado y una vez finalizado el proceso de fermentación, se agrega 20% de suero preparado al 30% como se indica en el diagrama principal, finalmente se hicieron los análisis microbiológicos, químicos y sensoriales. A continuación se explica más detalladamente cada uno de los pasos anteriores.

5.6.1. Dilución de los ingredientes:

A) Suero de leche:

El medio suero de leche se preparó a una concentración de 3% en peso en agua, se esterilizó a una temperatura de 121°C por 15 minutos. El medio presentó un color blanco, turbio y se observaron algunas partículas pequeñas en el medio.

B) Inulina:

La inulina se preparó a una concentración de 2% en peso en agua, se esterilizó a una temperatura de 121°C por 15 minutos. El medio se presentó traslúcido, viscoso, brillante y presentaba la formación de algunas burbujas pequeñas.

C) FOS:

La solución de FOS se preparó a una concentración de 3% en peso en agua, se esterilizó a una temperatura de 121°C por 15 minutos. El medio se presentó turbio, ligeramente amarillo, brillante, se observaron unas partículas pequeñas en el medio.

D) Carbonato ácido de sodio:

Se preparó una solución al 1% en agua (p/v) pH 7, se esterilizó a una temperatura de 121°C por 15 minutos, dando como resultado una solución traslúcida.

E) Suero de leche concentrado 30%:

Este medio se preparó a una concentración de 30% en p/v y se diluyó en agua, posteriormente se sometió a un tratamiento térmico a una temperatura de 80 – 85°C por 60 minutos.

Después del tratamiento que recibió cada ingrediente, se observó que todos son solubles en agua a las proporciones a las cuáles fueron preparados, por tal motivo, al final de la esterilización de cada ingrediente obtuvimos componentes líquidos y viscosos en el caso de la Inulina y los FOS, lo que facilitó la elaboración de las formulaciones, cada uno de los ingredientes fue almacenado máximo dos días en refrigeración (4°C) para su posterior uso.

5.6.2. Prueba de la esterilidad de los ingredientes:

Se comprobó la eficiencia de la esterilización y del tratamiento térmico que recibieron los ingredientes inoculando en superficie 0.1mL de cada ingrediente en

placas con agar cuenta en placa, se incubaron a una temperatura de 30°C por 48 horas; la eficiencia de esterilización de estos tratamientos térmicos fue evidenciada por la ausencia de colonias en la superficie del agar después del tiempo de incubación.

5.7. Preparación de las formulaciones.

Se diseñaron 8 diferentes formulaciones independientes, las cuales se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 4: Ingredientes de las diferentes formulaciones.

Formulación/ Ingredientes	Suero de leche (3%)	Inulina (2 %)	FOS (3 %)	<i>Lb.</i> <i>casei</i>	<i>Lb.</i> <i>acidophilus</i>
1	+	+	+	+	-
2	+	+	+	+	-
3	+	-	+	+	-
4	+	-	+	+	-
5	+	+	+	-	+
6	+	+	+	-	+
7	+	-	+	-	+
8	+	-	+	-	+

(+): Presencia del ingrediente.

(-): Ausencia del ingrediente.

5.7.1. Ajuste del pH de las diferentes formulaciones antes de la fermentación.

Al medir el pH inicial de los medios, se observó que este era muy ácido, por lo cual se tuvo que ajustar con una solución de NaHCO₃ al 1% P/V con pH 7, agregando la cantidad necesaria hasta alcanzar un pH de 6.5 para cada medio.

5.7.2. Inoculación de las formulaciones.

Las cepas probióticas *Lb. casei* y *Lb. acidophilus* que se encontraban conservadas en glicerol se reactivaron tomando 100µL de cada cepa y se inocularon en viales que contenían 5mL de suero de leche estéril al 3%, se incubaron a una temperatura de 30°C por un periodo de 24 horas. Cada una de las diferentes formulaciones fueron inoculadas con las respectivas cepas reactivadas en suero de leche, inoculando 2% (p/v) de las cepas.

5.7.3. Fermentación de las diferentes formulaciones:

Estas formulaciones se fermentaron a una temperatura de 30°C durante 24 horas, posteriormente se realizaron ajustes a cada una de las bebidas fermentadas, las cuáles brindaron mejoras a las características sensoriales de las mismas; se mencionan a continuación.

5.7.4. Ajuste final de las bebidas simbióticas:

Al final de la fermentación de cada una de las formulaciones, se agregaron las concentraciones de 3%(p/v) de sacarosa por cada 100mL de formulación, así como, 3%(p/v) de fructosa por cada 100mL, según se requirió para cada formulación. El objetivo principal de estas adiciones de carbohidratos al final de la fermentación fue brindar dulzor a las bebidas fermentadas.

5.7.5. Ajuste del pH de las bebidas simbióticas después de la fermentación:

Al final de la fermentación de cada formulación se determinó el pH con un potenciómetro (Jenway 3020 pH meter). En condiciones de asepsia, se adicionaron 20mL del medio suero de leche concentrado al 30% con pH 6 por cada 100mL de las formulaciones, alcanzando un pH aproximado de 4.5, que es el recomendado para las bebidas fermentadas. El agregar este medio concentrado a

las bebidas fermentadas aportó una mayor viscosidad y coloración a las bebidas, lo que mejoró las características sensoriales del producto fermentado.

Al final del ajuste anterior de cada una de las bebidas fermentadas y después de 24 horas de refrigeración a una temperatura de 4°C, se realizó una evaluación sensorial previa con solo con tres jueces sin entrenamiento, en la cual se decidió que solo se evaluarían posteriormente las bebidas fermentadas que habían sido endulzadas con sacarosa, es decir las formulaciones que corresponden a los números 1, 3, 5, y 7 de la tabla 5.

Tabla 5: Ingredientes y volúmenes utilizados para elaborar 100mL de las diferentes bebidas simbióticas.

Formulación / Ingredientes	Suero de leche 3% (mL)	Inulina (mL)	FOS (mL)	Sacarosa (g)	Fructosa (g)	<i>Lb.</i> <i>casei</i> (mL)	<i>Lb.</i> <i>acidophilus</i> (mL)	Suero de leche 30% (mL)
1.SL+i+FOS+ <i>Lb. casei</i> + glucosa	50	10	20	3	-	2	-	20
2.SL+i+FOS+ <i>Lb. casei</i> + fructosa	50	10	20	-	3	2	-	20
3.SL+FOS+ <i>Lb.casei</i> + glucosa	60	-	20	3	-	2	-	20
4.SL+FOS+ <i>Lb.casei</i> + fructosa	60	-	20	-	3	2	-	20
5.SL+i+FOS+ <i>Lb.acidophilus</i> + glucosa	50	10	20	3	-	-	2	20
6.SL+i+FOS+ <i>Lb.acidophilus</i> + fructosa	50	10	20	-	3	-	2	20
7.SL+FOS+ <i>Lb.acidophilus</i> + glucosa	60	-	20	3	-	-	2	20
8.SL+FOS+ <i>Lb acidophilus</i> + fructosa	60	-	20	-	3	-	2	20

(-) Ausencia del ingrediente.

5.8. Análisis sensorial.

Para realizar un análisis sensorial preliminar de las bebidas simbióticas se realizaron pruebas afectivas. En estas pruebas el panelista expresa el nivel de agrado, aceptación y preferencia de un producto alimenticio. Se utilizan escalas de calificación de las muestras. De las pruebas afectivas se originaron las pruebas de preferencia y aceptación a las que fueron sometidas las 4 formulaciones de la bebida simbiótica.

5.8.1. Prueba de preferencia:

El objetivo de esta prueba fue definir el grado de aceptación y preferencia de un producto determinado por parte del consumidor. Para llevar a cabo esta prueba de preferencia se realizó una prueba de ordenamiento como se menciona a continuación.

5.8.2. Prueba de ordenamiento:

En esta prueba se especifica la preferencia y aceptación de un producto. Esta prueba se utilizó principalmente para determinar qué formulación tendría un nivel de aceptación mayor, aplicando el cuestionario No. 1 (Figura 4).

Cuestionario No. 1

Nombre _____

Fecha _____

Prueba de preferencia por ordenación.

Pruebe las muestras de izquierda a derecha y ordénelas según su preferencia, otorgándole el 1er lugar a la muestra más preferida el 2° a la siguiente y así sucesivamente. No se permiten empates.

342 _____

785 _____

943 _____

168 _____

Gracias!!

Figura 4: Cuestionario que se realizó para la prueba de preferencia por ordenación.

5.8.3. Prueba de aceptación:

Permite medir el grado de preferencia, la actitud del panelista o catador hacia un producto alimenticio, es decir se le pregunta al consumidor si estaría dispuesto a adquirirlo y por ende su gusto o disgusto frente al producto catado. Esta prueba se aplicó para saber si el producto era aceptado o no por una población aplicando el cuestionario No. 2 (Figura 5).

Cuestionario No. 2

Nombre _____

Fecha _____

Prueba de aceptación:

A continuación señale con una X cuál de las muestras estaría dispuesto a comprar.

Muestra	La compraría	
342	si	no
785	si	no
943	si	no
168	si	no

Gracias!!

Figura 5: Cuestionario que se realizó para la prueba de aceptación.

Las bebidas fermentadas a las que se realizó la evaluación sensorial fueron las siguientes:

Tabla 6: Bebidas fermentadas a las cuáles se les realizó una segunda evaluación sensorial.

Formulación/ Ingredientes	Suero de leche (3%)	Inulina (2 %)	FOS (3%)	Sacarosa (3%)	<i>Lb.</i> <i>casei</i>	<i>Lb.</i> <i>acidophilus</i>	Suero de leche [30%]
1	+	+	+	+	+	-	+
3	+	-	+	+	+	-	+
5	+	+	+	+	-	+	+
7	+	-	+	+	-	+	+

*Todas las bebidas fueron fermentadas durante 24 horas a una temperatura de 28°C.

5.9. Sobrevivencia:

A partir de las bebidas fermentadas endulzadas con sacarosa al 3%, que en la primera evaluación sensorial resultaron ser las formulaciones con un mayor grado de aceptación y a las cuáles se les realizó una segunda evaluación sensorial (muestras 1,3,5 y 7 de la tabla 5), se realizaron las pruebas de estabilidad microbiológica.

Para evaluar la sobrevivencia de los microorganismos en las bebidas fermentadas, se tomaron muestras de 25mL de cada una y se refrigeraron a una temperatura de 4°C. La sobrevivencia de los microorganismos se evaluó por un periodo de un mes como se menciona a continuación:

Cada semana se tomó una muestra de 4mL de cada bebida fermentada a las cuales se les realizó la técnica de cuenta en placa así como la medición del pH. En el primer caso, se prepararon diluciones seriadas, se inoculó por duplicado 0.1mL de la dilución correspondiente en cajas Petri que contenían agar MRS, posteriormente se incubaron a una temperatura de 30°C por un periodo de 48 horas en aerobiosis. Al término del tiempo de incubación se procedió a realizar el conteo de colonias bacterianas, donde se esperaba encontrar un número entre 10 y 300 colonias bacterianas y se recopilaron los resultados obtenidos.

6. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS.

6.1. Descripción de la materia prima.

6.1.1. Cepas probióticas:

Las cepas probióticas que se usaron para realizar este ensayo se describen a continuación:

Lactobacillus casei subespecie paracasei LMGP-21380: Son probióticos liofilizados que presentaron una consistencia fina y granular, un tono marfil. Presentaron una morfología de bacilos cortos, Gram-positivo.

Lactobacillus acidophilus LMGP-21381: Son probióticos liofilizados que presentaron una consistencia fina, granular y un tono marfil. Presentaron una morfología de bacilos cortos, Gram-positivo.

6.1.2. Prebióticos:

Inulina: Polvo fino, color blanco, opaco, sin aroma característico que se adhiere fácilmente a las superficies por su alta higroscopicidad, soluble en agua formando una solución viscosa, brillante y traslúcida al contacto con ésta.

FOS: Polvo fino, color marfil, opaco, sin aroma característico que se adhiere fácilmente a las superficies y presenta una mayor higroscopicidad que la inulina, es soluble en agua y forma una solución viscosa ligeramente turbia al contacto con ésta.

6.1.3. Suero de leche:

Polvo fino granular, opaco, olor característico a leche, ligeramente amarillo, soluble en agua, al contacto con ésta forma una solución turbia, opaca, de color

blanco. Este suero de leche se eligió por las características fisicoquímicas y microbiológicas que garantiza el proveedor (Anexo 1).

*Estos ingredientes se conservaron en un lugar fresco y seco a temperatura ambiente.

6.2. Efecto de la de reactivación de las cepas probióticas:

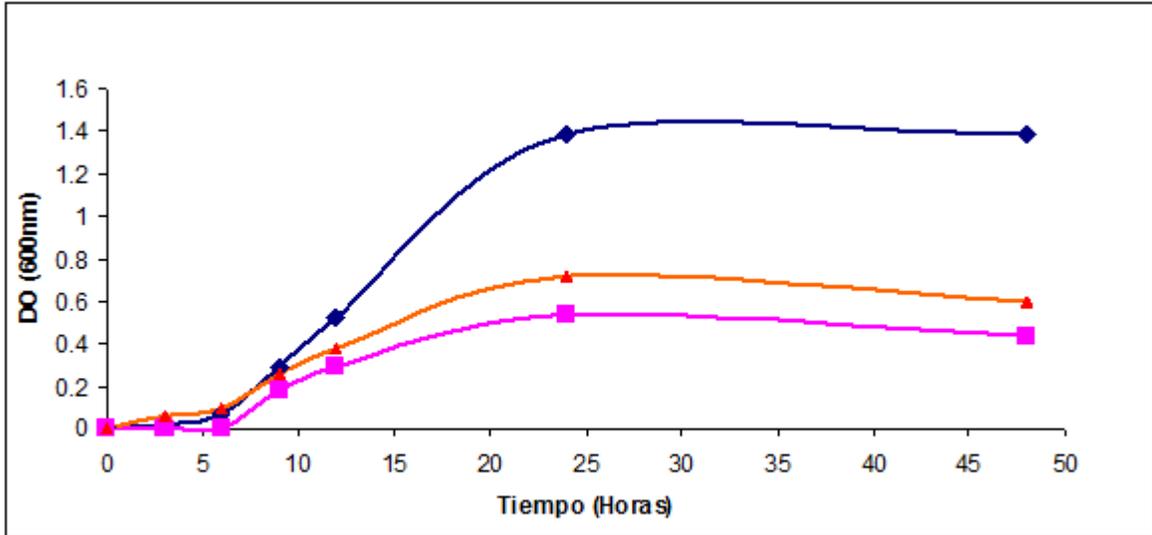
El crecimiento fue seguido desde la fase de inicio hasta el final de la fase exponencial y comienzo de la fase estacionaria (Deraz y col., 2005). Cada 3 horas hasta las 12 horas así como los puntos 24 y 48 horas se midió la densidad óptica (600nm) y el pH; a continuación se observa el comportamiento que tuvo cada cepa en los diferentes medios (Figuras 6 y 7).

En general en los medios MRS-glucosa, los microorganismos *Lb. casei* y *Lb. acidophilus* presentaron un comportamiento similar, ambos microorganismos exhibieron una fase lag aproximada de 6 horas tiempo que coincidió con el inicio de la fase exponencial; el desarrolló máximo de las cepas se observó alrededor de las 24 horas; la fase estacionaria se observó entre las 24 y 48 horas. Un comportamiento similar se presentó en un estudio de bacterias probióticas utilizadas en la fermentación de productos lácteos, donde la fase lag de las cepas *Lb. acidophilus* A3 y *Lb. casei* A14 fue aproximada de 4 horas y 4 horas y media respectivamente, dando así al inicio de la fase exponencial, ambas cepas mostraron su desarrollo máximo a las 24 horas de incubación a una temperatura de 37°C (Vinderola y Reinheimer, 2003).

Se observó que ambas cepas probióticas se desarrollaron de una forma similar en los medios MRS-Inulina y MRS-FOS, presentando una fase lag de 6 horas con el consecuente comienzo de la fase exponencial y mostrando un desarrollo máximo a las 24 horas, por lo cual señalamos que estos microorganismos fermentaron la Inulina y los FOS. Esta capacidad de fermentar diferentes fuentes prebióticas le confiere a los microorganismos la posibilidad de ser utilizados en la obtención de

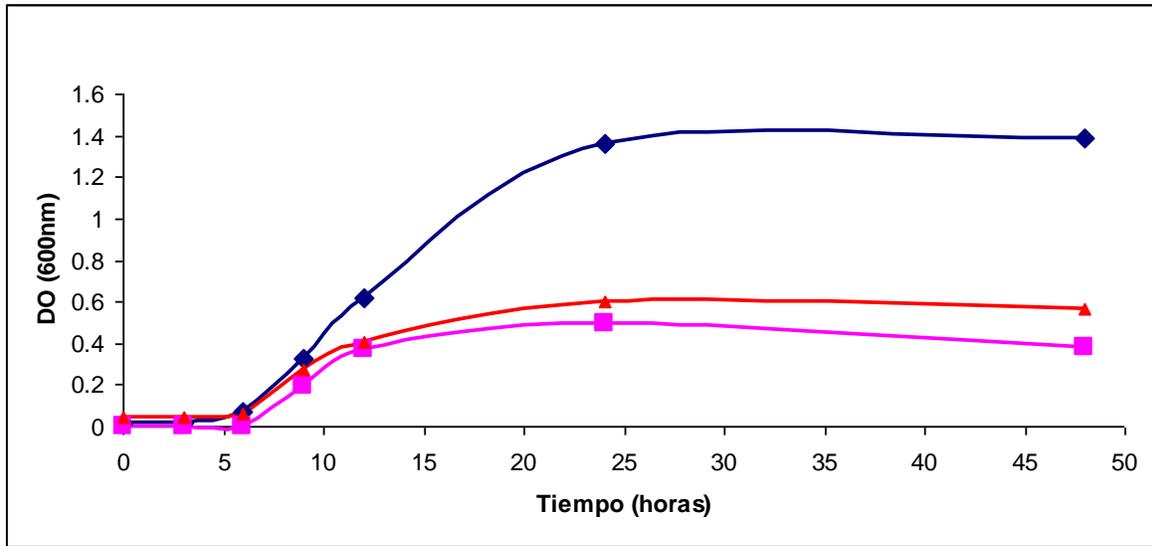
un producto simbiótico (García y col., 2007). El comportamiento anterior ya se ha reportado en anteriores investigaciones, que indican que diferentes especies de *Lactobacillus*, *Streptococcus* y *Bifidobacterium* son capaces de metabolizar fructooligosacáridos e inulina (Kaplan y Hutkins, 2003). En otro estudio Kaplan y Hutkins (2000), compararon la capacidad de fermentar oligofruktanos entre diferentes bacterias ácido lácticas y encontraron que la mayoría de las especies del genero *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* crecían en presencia del prebiótico.

Es importante mencionar que las cepas tuvieron un mejor desarrollo en el medio MRS, seguido por el medio MRS-FOS y por ultimo MRS-Inulina, este comportamiento pudo deberse a que el medio MRS es específico para el desarrollo de lactobacilos, así que contiene todos los nutrientes necesarios para estos microorganismos, por otro lado el desarrollo de los microorganismos fue mejor en el medio modificado con FOS que en el medio modificado con inulina, este comportamiento pudo deberse a que los FOS se encontraban en mayor cantidad (3%) que la inulina (2%); esta conducta ya se ha reportado anteriormente por Miñana (2007), quien realizó un estudio donde evaluó diferentes concentraciones de FOS y encontró que el crecimiento de lactobacilos y bifidobacterias es directamente proporcional a la concentración de prebióticos en el medio. Por otro lado este comportamiento ya ha sido reportado, pero basándose en la complejidad del sustrato, donde se menciona que la inulina de agave presenta un grado de polimerización de 6-50 unidades de fructosa con enlaces $\beta(1-2)$ en cadenas ramificadas, en investigaciones realizadas, se ha observada que los fructooligosacáridos generados en la hidrólisis de inulina de achicoria, son aprovechados y metabolizados rápidamente por bacterias lácticas y que las tasas de metabolización para la inulina son similares, sin embargo la fermentación es lenta cuando el grado de polimerización es mayor a 10 (Roberfroid y col., 1998).



—◆— MRS —■— MRS-Inulina —▲— MRS-FOS

Figura 6: Curvas de crecimiento para la cepa *Lactobacillus casei subespecie paracasei* LMGP-21380 en los medios MRS, MRS-Inulina y MRS-FOS.



—◆— MRS —■— MRS-Inulina —▲— MRS-FOS

Figura 7: Curvas de crecimiento para la cepa *Lactobacillus acidophilus* LMGP-21381 en los medios MRS, MRS-Inulina y MRS-FOS.

Tabla 7: Valores de pH para las cepas de *Lactobacillus casei subespecie paracasei* LMGP-21380 y *Lactobacillus acidophilus* LMGP-21381.

Medio/ Microorganismo <i>Lb. casei</i>	MRS	MRS- inulina	MRS- FOS	Medio/ Microorganismo <i>Lb. acidophilus</i>	MRS	MRS- Inulina	MRS- FOS
Tiempo (horas)	pH	pH	pH	Tiempo (horas)	pH	pH	pH
0	6.69	6.61	6.71	0	6.69	6.62	6.72
3	6.69	6.61	6.71	3	6.67	6.90	6.71
6	6.61	6.86	6.66	6	6.59	6.83	6.65
9	6.32	6.90	6.49	9	6.19	6.80	6.45
12	5.88	6.61	6.22	12	5.67	6.42	6.15
24	4.20	5.89	5.44	24	4.20	5.91	5.55

6.2.1. Comportamiento del pH en la reactivación de las cepas probióticas.

En esta fase experimental se observó que el valor final del pH fue menor en el medio MRS para ambas cepas, seguido por el medio MRS- modificado con FOS y por último el medio MRS-modificado con Inulina (Tabla 7). El indicador de pH fue de gran importancia en este estudio durante la fermentación en los medios MRS modificados donde la fuente original de carbono fue la inulina y los FOS, ya que la disminución del pH reveló la producción de ácido láctico, lo que evidenció que las bacterias probióticas fueron capaces de utilizar los prebióticos como fuente energética.

6.2.2. Reactivación de cepas en el medio MRS, MRS-inulina y MRS-FOS.

Con base en los resultados anteriores, se procedió a reactivar las cepas probióticas en caldo MRS modificado con inulina y MRS modificado con FOS para así observar si el desarrollo de las cepas se optimizaba cuando éstas procedían del mismo medio al que serían inoculadas, es decir, observar el comportamiento de éstas cuando crecían dos veces en el mismo sustrato. Los cultivos se

incubaron a una temperatura de 30°C y se siguió una cinética de crecimiento para cada microorganismo en los tres diferentes medios, esta cinética fue medida cada 3 horas hasta las 12 horas así como los puntos 24 y 48 horas. Se determinó la Densidad Óptica (600nm) y el pH en cada punto. A continuación se observa el comportamiento que tuvo cada cepa en los 3 diferentes medios de cultivo (figuras 8 y 9).

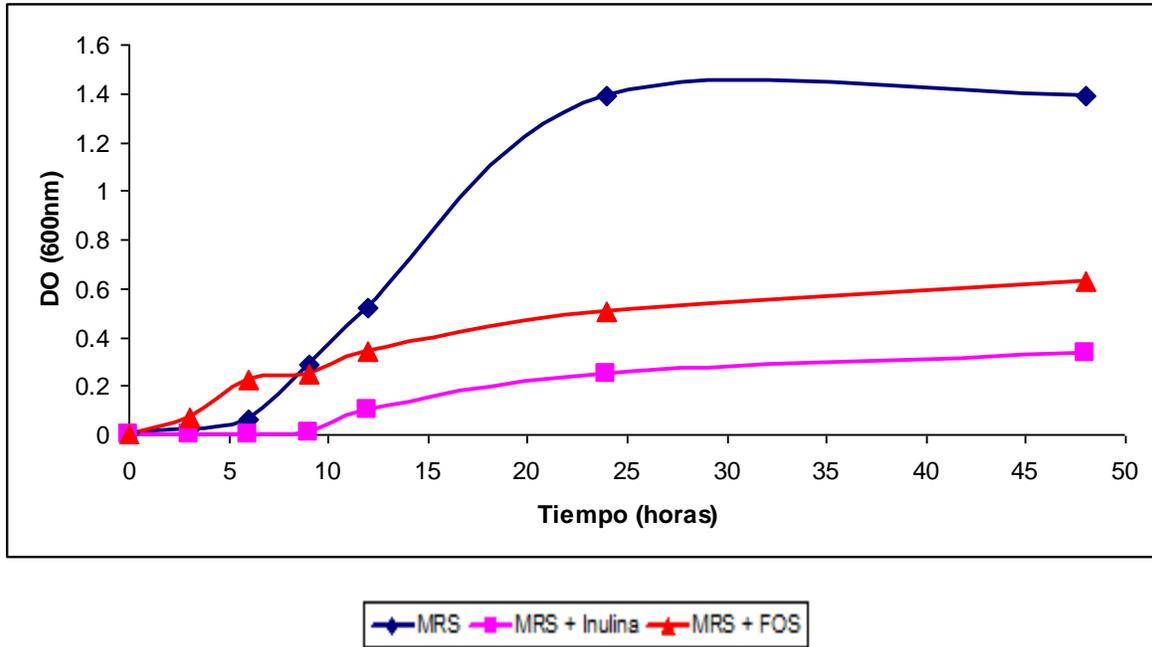


Figura 8: Curvas de crecimiento para la cepa *Lactobacillus casei subespecie paracasei* LMGP-21380 reactivada en los medios MRS, MRS+Inulina y MRS+FOS.

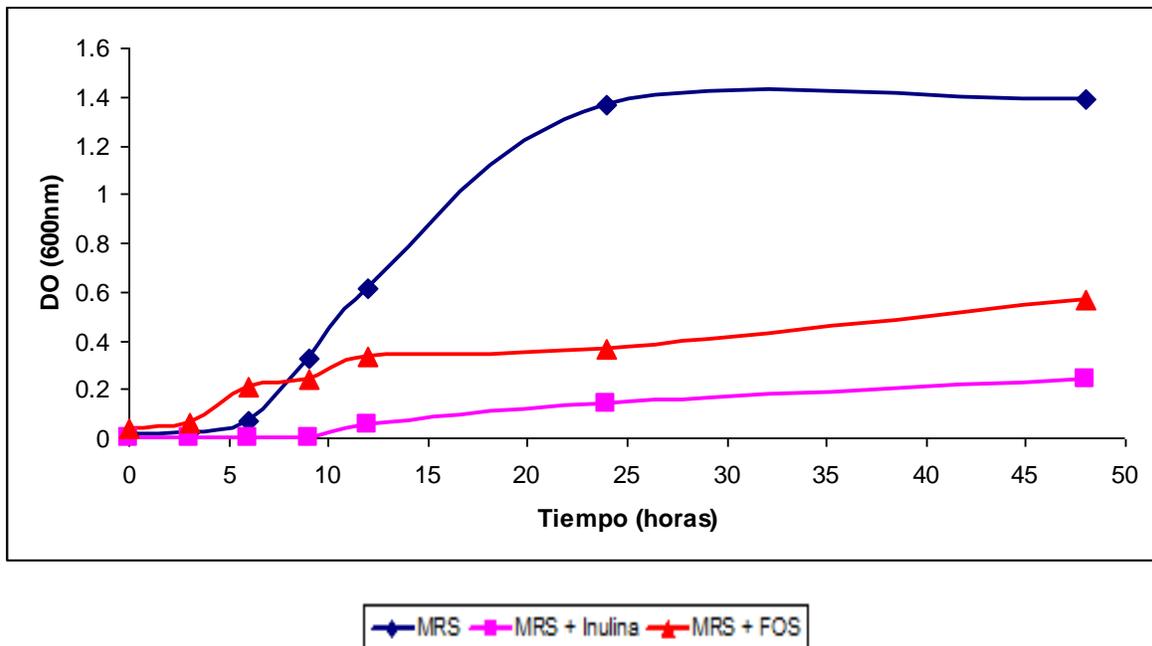


Figura 9: Curvas de crecimiento para la cepa *Lactobacillus acidophilus* LMGP-21381 reactivada en los medios MRS, MRS+Inulina y MRS+FOS.

El reactivar las cepa de *Lb casei* en el medio MRS modificado con inulina (Figura 8), no optimizó el desarrollo de la cepa, por el caso contrario prolongó la fase lag hasta aproximadamente 9 horas, no se observaron claramente la fase exponencial ni la fase estacionaria, a las 48 horas se observó un ligero aumento en la D.O. En el caso del caldo MRS modificado con FOS (Figura 8) se observó ligeramente un mejor desarrollo de la cepa probiótica, con una fase lag cercana a las 3 horas, el inicio de la fase exponencial así como el inicio de su fase estacionaria no se observaron con claridad, al finalizar el tiempo de fermentación (48 horas) la cepa mostró una D.O. mayor que en el medio modificado con inulina.

Igual que en el caso de *Lb. casei*, reactivar la cepa de *Lb acidophilus* (Figura 9) en el medio MRS modificado con inulina no optimizó el desarrollo de la cepa, también prolongo su fase lag hasta aproximadamente 9 horas, no se observó la fase exponencial ni la fase estacionaria, a las 48 horas se observó un ligero aumento en la D.O; con el caldo MRS modificado con FOS (Figura 9) se observó ligeramente un mejor desarrollo de la cepa probiótica, con una fase lag cercana a las 3 horas, no se observó el inicio de la fase exponencial ni el inicio de su fase estacionaria, al finalizar el tiempo de fermentación (48 horas), al igual que *Lb. casei* la cepa mostró una D.O. mayor que en el medio modificado con inulina.

El comportamiento anterior pone de manifiesto que los FOS son un mejor sustrato que la inulina para el desarrollo de las cepas probióticas con las cuáles se trabajo, como ya se mencionó anteriormente.

6.3. Desarrollo de las bacterias probióticas *Lb. casei* y *Lb. acidophilus* en diferentes medios de cultivo líquidos (suero de leche, suero de leche con inulina, suero de leche con FOS y suero de leche con Inulina y FOS).

Una vez evaluado el efecto de la reactivación de las cepas probióticas, se evaluó el desarrollo de las mismas en las diferentes formulaciones que se mencionan a continuación: suero de leche, suero de leche con inulina, suero de leche con FOS y suero de leche con inulina y FOS (Figuras 10 y 11).

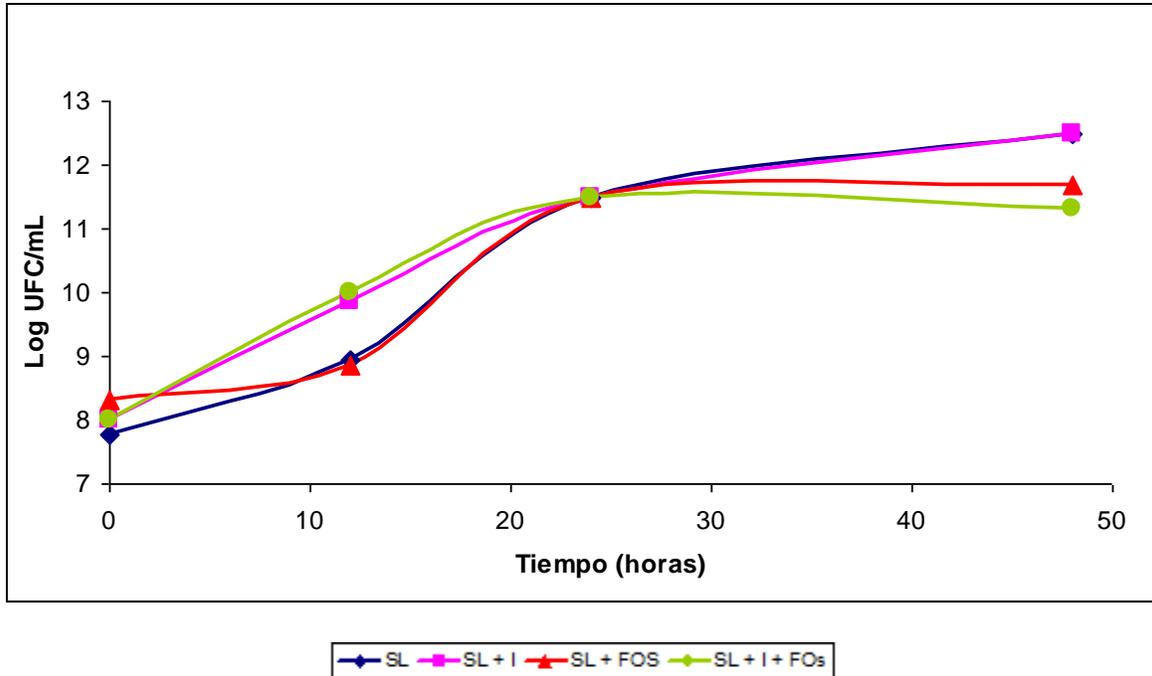


Figura 10: Crecimiento de *Lactobacillus casei subespecie paracasei* LMGP-21380 en los medios SL, SL + I, SL + FOS y SL + I + FOS.

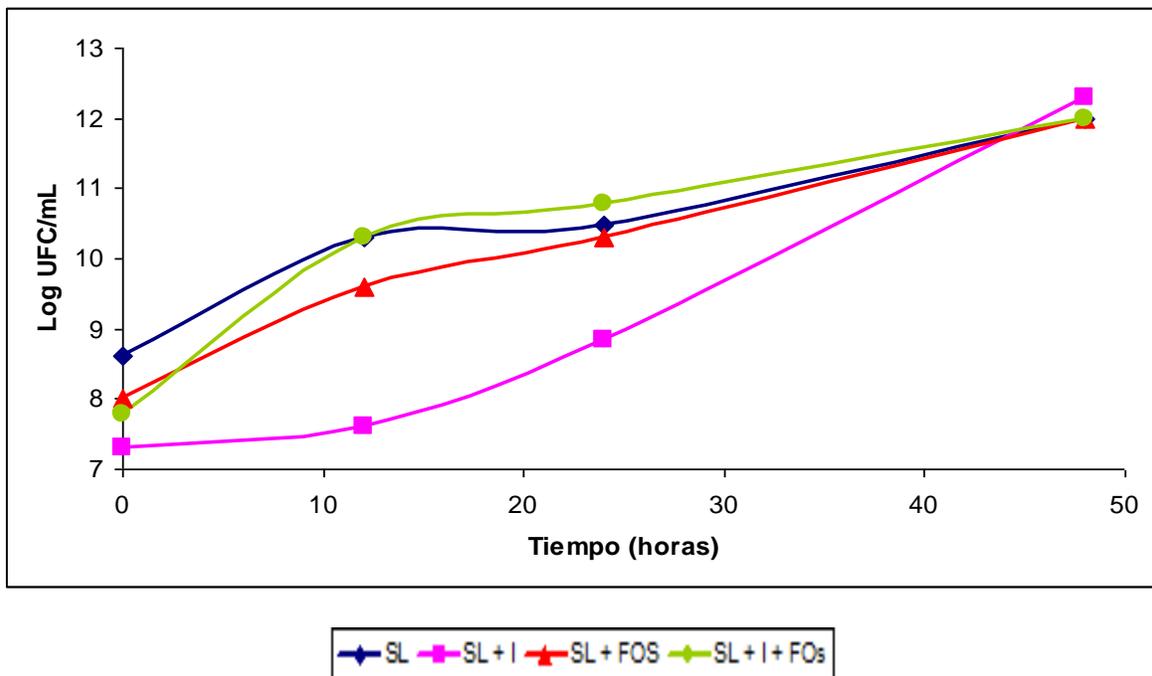


Figura 11: Crecimiento de *Lactobacillus acidophilus* LMGP-21381 en los medios SL, SL + I, SL + FOS y SL + I + FOS.

Solo se observó con claridad la fase lag de *Lb. casei* en el medio SL + FOS, con una duración de aproximadamente 10 horas, por el contrario, en las otras formulaciones (SL + SL+I y SL+I+FOS) a las 10 horas ya se observaba su crecimiento exponencial y la ausencia de la fase lag; se observó el desarrollo máximo de los microorganismos a las 24 horas (Figura 10) en las formulaciones SL+ FOS y SL+ I + FOS y posteriormente el comienzo de la fase estacionaria. Por otro lado, el desarrollo máximo de *Lb. casei* se presentó a las 48 horas de incubación en los medios SL y SL + I, lo cual indicó que el desarrollo en los medios con inulina fue más lento que en los medios que contienen FOS. Arellano y Soriano (2007), observaron el desarrollo de *Lb. casei* en un medio hecho con suero de leche, donde a una temperatura de 32°C el microorganismo tuvo una fase lag de 10 horas y presentó su desarrollo máximo hasta las 15 horas.

En el caso de *Lb. acidophilus* (Figura 11) se observó un desarrollo variable en las 4 diferentes formulaciones, la bacteria creció más rápido en los medios SL, SL+FOS y SL+I+FOS, con la consecuente ausencia de la fase lag. En el medio SL+I, si se observó la fase lag de *Lb. acidophilus*, con un tiempo de duración de aproximadamente 10 horas. A las 48 horas de incubación se equilibro el desarrollo de la cepa en todas las formulaciones con un valor aproximado de 10^{12} UFC/mL, así como la formulación SL+I que a pesar que fue la que presentó una mayor variabilidad entre las 4 al término de la fermentación su desarrollo fue el mismo que en las otras formulaciones. Una vez más se evidenció que el desarrollo de este microorganismo fue más lento en la formulación que contenía inulina, ya que la fase lag tuvo una duración de 10 horas con el consecuente inicio de la fase exponencial.

La determinación de la cinética de crecimiento de estos microorganismos en las diferentes formulaciones fue de gran importancia para determinar así cuáles serían los medios más apropiados para un mejor desarrollo de las cepas evaluadas y obtener así altas concentraciones de microorganismos que garantizaran concentraciones mayores a 10^6 UFC/ml, que es un requisito indispensable para que estas bebidas puedan ser consideradas como simbióticas.

6.4. Comportamiento del pH en las diferentes formulaciones:

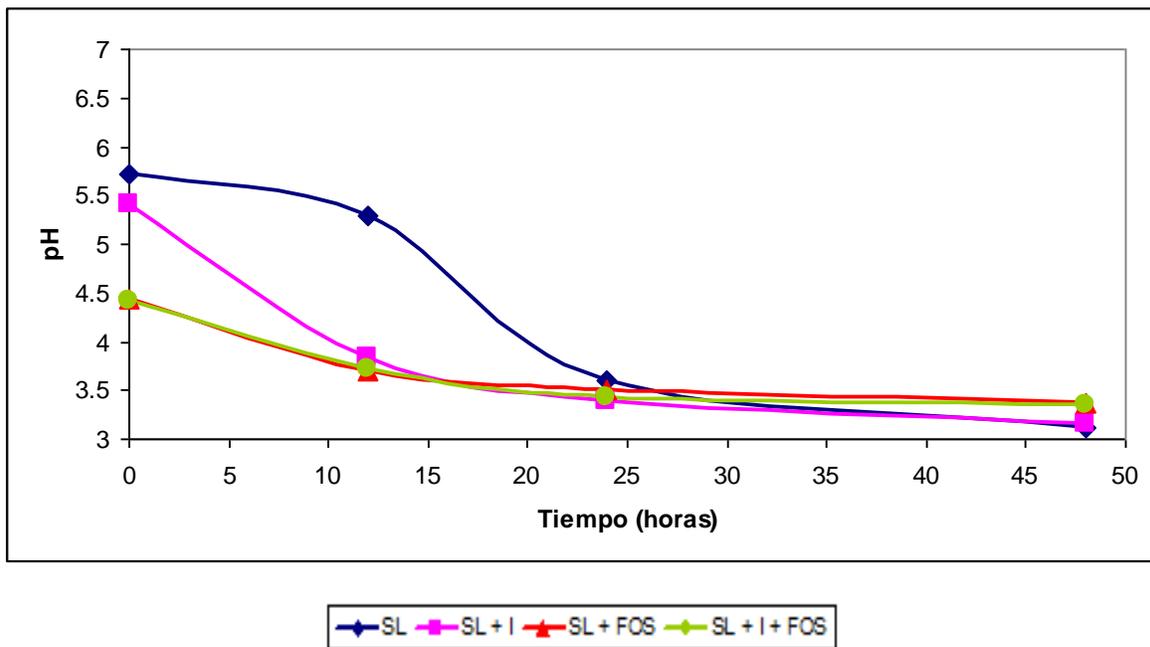


Figura 12: Perfil del pH de *Lb. casei* en las formulaciones SL, SL + I, SL + FOS y SL + I + FOS

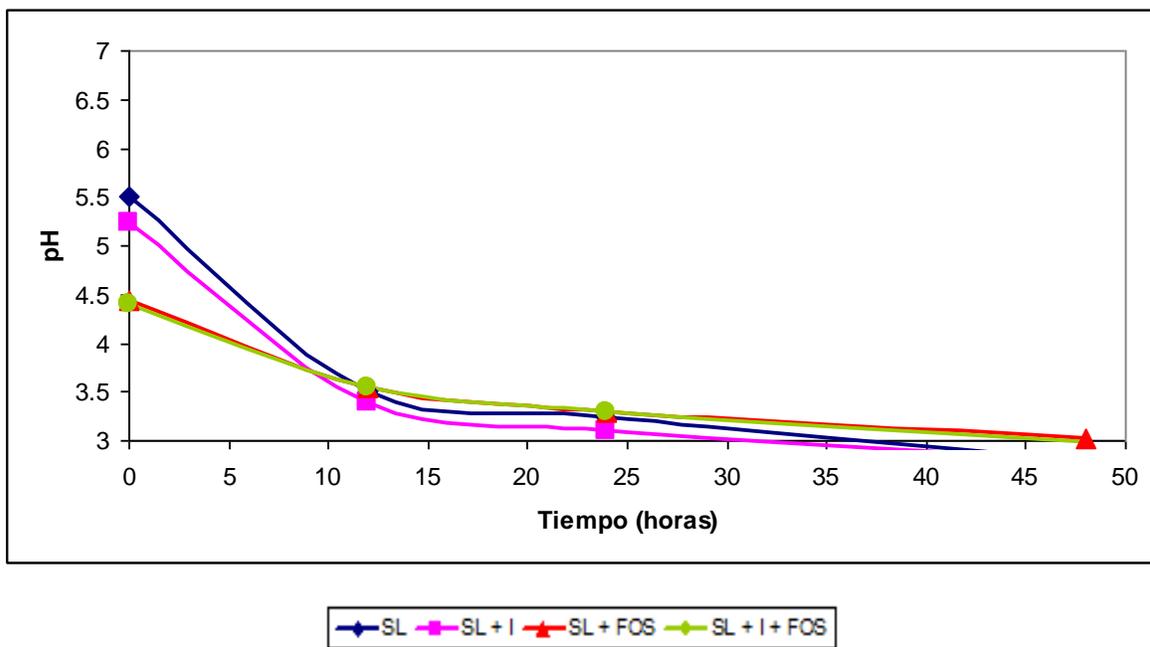


Figura 13: Perfil del pH de *Lb. acidophilus* en las formulaciones SL, SL + I, SL + FOS y SL + I + FOS.

6.4.1. Descripción del pH:

Es importante destacar en esta sección que el pH inicial de las formulaciones antes de agregar las cepas probióticas se encontraba en un rango de 6.6 a 6.8, pero al momento de inocular las cepas probióticas el pH cambio rápidamente en todas las formulaciones, y fue ese el valor de pH que se tomó como punto 1 para la construcción de estas gráficas. La formulación de SL, fue donde se presentó el valor más alto de pH inicial (5.7 para *Lb. casei* y 5.5 para *Lb. acidophilus*), seguido por el medio SL+I (5.5 para *Lb. casei* y 5.3 para *Lb. acidophilus*) y los medios que presentaron valores más bajos de pH fueron SL+FOS y SL+I+FOS, con un valor de 4.5 para ambos microorganismos y formulaciones.

Los valores de pH de las fermentaciones en las formulaciones SL, SL+I, SL + FOS Y SL+I+FOS se muestran en las figuras 12 y 13 a continuación se describen los resultados obtenidos.

En el caso de la fermentación de las formulaciones con *Lb. casei* (Figura 12), ocurrió lo siguiente; en la formulación con suero de leche se observó una diferencia significativa con respecto al pH inicial (5.7) hasta las 24 horas de fermentación con un valor de 3.61; ya que a las 12 horas de fermentación solo mostró un ligero descenso en el valor de pH(5.5 aproximadamente); en las formulaciones restantes a las 12 horas de fermentación se observó una disminución significativa con respecto al pH inicial de cada formulación con un valor que osciló entre 3.7 y 3.85; a las 48 horas la formulación que alcanzó una mayor acidificación fue la de suero de leche (pH 3.11) y la que presentó una menor acidificación fue la formulación con suero de leche + FOS (3.37) (Figura 12).

Para *Lb. acidophilus* (Figura 13) observamos el mismo comportamiento en todas las formulaciones al que tuvo *Lb. casei*, exceptuando el medio SL, ya que en la fermentación de *Lb. acidophilus* en SL, el pH disminuyó de la misma manera que en las otras formulaciones a las 12 horas. Así que a las 12 horas de fermentación el pH disminuyó con respecto al pH inicial de cada formulación con valores que

oscilaron entre 3.55 y 3.38; a las 48 horas de fermentación las formulaciones presentaron valores de pH por debajo de 3, siendo la más ácida la formulación con suero de leche (pH 2.78) y la que presentó un pH mayor fue la formulación con suero de leche + FOS (pH 3.01) (Figura 13).

Los resultados anteriores ponen en evidencia que *Lb. acidophilus* acidificó más rápido en todas las formulaciones. Para que una bacteria láctica pueda crecer y reducir el pH del medio por debajo de 5, necesita disponer de las proteínas de la leche (Shahbal y cols., 1991); en este estudio se confirma que el suero de leche aportó proteínas, azúcares y minerales para el crecimiento y propagación de estos cultivos (Jay, 2003).

Con base en estos resultados, se eligieron los medios SL+FOS y SL+I+FOS para elaborar la bebida fermentada, ya que tanto *Lb. casei* como *Lb. acidophilus* se desarrollaron bien en estos medios y después de 24 horas de fermentación se obtuvieron concentraciones altas de los microorganismos (10^{11} UFC/mL y 10^{10} UFC/mL) respectivamente, lo que es de gran importancia para realizar una bebida probiótica, ya que ésta debe disponer de una concentración mínima de 10^6 UFC/mL o gramo del producto (Shah; 2001).

6.5. Análisis de la metodología para la elaboración de bebidas simbióticas:

Existieron varios aspectos importantes que se cuidaron durante la elaboración de la bebida fermentada para obtener así un producto de buena calidad. Primero los procesos térmicos a los que fueron sometidos los ingredientes para garantizar su inocuidad, la esterilización por separado de los ingredientes, es decir del suero de leche al 3%, de la inulina al 2%, de los FOS al 3% y el tratamiento térmico que recibió el suero de leche concentrado al 30% (80-85°C por 60 minutos) fueron de gran importancia. Uno de los objetivos del tratamiento térmico fue la "esterilización parcial" del suero concentrado alterando lo menos posible la estructura física de los componentes y las propiedades organolépticas de este medio. Cuidar la temperatura a la cual se pasteurizó el suero de leche concentrado fue de gran

importancia, ya que si se rebasaba una temperatura de 85°C se observaba inmediatamente la desnaturalización de las proteínas, lo cual provocaría una textura desfavorable para el ingrediente y no podría ser utilizado para la elaboración del producto final.

De la misma forma se cuidó la temperatura a la cual se agregaban cada uno de los ingredientes (30°C) para hacer los medios con base en suero de leche, ya que si la inulina y los FOS se agregaban a una alta temperatura al suero de leche, lo precipitaban inmediatamente, por lo tanto los ingredientes se enfriaron inmediatamente después de sus respectivos tratamientos térmicos.

Todo el material que se requirió para realizar los medios fué previamente esterilizado a una temperatura de 121°C por 15 minutos.

La temperatura de 30°C de los medios fue fundamental a la hora de agregar el cultivo ya que al ser microorganismos mesófilos se desarrollan mejor a una temperatura de 30 °C (Viloche y Tito, 2006) lo cual fue de gran importancia, ya que no se varió la temperatura de la cuál procedían las cepas reactivadas, lo que ayudó a que no se estresaran las cepas en los nuevos medios con un posible aumento de tiempo en su fase lag.

Posteriormente los diferentes medios de cultivo inoculados para elaborar la bebida fermentada se incubaron a una temperatura de 30°C, fue necesario también mantener esta temperatura constante, ya que la acción de los microorganismos sobre los azúcares para producir ácido láctico disminuye si esta temperatura es variable.

La fermentación se detuvo a las 24 horas; la bebida fermentada presentó un pH en un rango de 3.5 – 3.8, posteriormente se procedió a reconstituir la bebida con suero de leche al 30% tratado térmicamente con anterioridad, hasta alcanzar un pH cercano a 4.5; hacer esta reconstitución brindó mejores características sensoriales al producto tales como, viscosidad y color.

Una vez que estos procesos ocurrieron, el producto se sometió a refrigeración (4°C), debido a que se requiere disminuir la actividad de los microorganismos para no alterar las características del producto y obtener así una mayor vida útil.

6.5.1. Estandarización del inóculo mediante el conteo de células viables.

Las distintas bebidas fermentadas fueron elaboradas con los cultivos iniciadores *Lactobacillus casei subespecie paracasei* LMGP-21380 y *Lactobacillus acidophilus* LMGP-2138. El inóculo inicial de estas bacterias probióticas se encontró alrededor de 10^7 UFC/mL para cada cepa en las distintas formulaciones.

Para realizar la bebida fermentada, fue necesario conocer la concentración inicial del inóculo y que fuera la misma concentración inicial en todas las fermentaciones realizadas; por lo tanto se elaboró un protocolo para estandarizar el inóculo.

Se prepararon viales con 4.5mL de suero de leche estéril (121°C por 15 minutos) y se inocularon con 0.1mL de la cepa conservada en glicerol (-64°C); los viales se incubaron a una temperatura de 30°C por 24 horas y posteriormente por cada 100mL de medio se inocularon 2mL de la cepa reactivada en suero de leche, esta técnica permitió obtener una concentración inicial de 10^7 UFC/mL para ambas cepas.

6.5.2. Análisis del pH.

El pH inicial de las diferentes formulaciones fluctuaba entre 4 y 4.5; esto se debió a que la inulina y los FOS diluidos en agua tenían un pH inicial ácido 3.22 y 3.80 respectivamente, por lo cual se tuvo que ajustar el pH inicial con una solución de bicarbonato de sodio agregando la cantidad necesaria hasta alcanzar un pH alrededor de 6.5 que permitiera un mejor desarrollo de las bacterias ácido lácticas en las formulaciones.

El pH es un factor importante que puede afectar considerablemente la calidad de un producto fermentado durante el proceso de fermentación (Athanasiadis y cols. 2004). Al final de la fermentación (24 horas) el pH de las bebidas fermentadas fluctuaba alrededor de 3.5 y 3.8 (Tabla 8), esto sugirió que si ocurrió la producción de ácido láctico, así como de ácido acético por parte de las cepas probióticas, ya que se redujo el pH de las diferentes formulaciones. Corrieu y col. (2002) indica que en la preparación de leches fermentadas el tiempo de fermentación requerido para alcanzar un pH de 4.5 es de veinte horas, este tiempo de fermentación fue similar al tiempo que se incubaron las formulaciones inoculadas con las bacterias lácticas bajo las condiciones de este estudio para alcanzar valores de pH alrededor de 3.70 y 3.50 (Tabla 8).

Tabla 8: Valores de pH de las bebidas fermentadas

Formulación	pH (0 horas)	pH (24 horas)	Δ pH	pH final
Suero de leche + inulina + FOS + <i>Lb. casei</i>	6	3.50	2.5	4.23
Suero de leche + FOS + <i>Lb.</i> <i>casei</i>	6	3.68	2.32	4.36
Suero de leche + inulina + FOS+ <i>Lb. acidophilus</i>	6	3.86	2.14	4.24
Suero de leche + FOS + <i>Lb.</i> <i>acidophilus</i>	6	3.70	2.3	4.12

6.6. Análisis sensorial

Las formulaciones finales que se sometieron a un análisis sensorial cuyos resultados se presentan en la tabla 9.

Tabla 9: Formulaciones finales sometidas a evaluación sensorial (SL+FOS + Glucosa y SL+ I+ FOS+ Sacarosa).

Formulación/ Ingredientes	Suero de leche (3%)	Inulina (2 %)	FOS (3%)	Sacarosa (3%)	<i>Lb.</i> <i>casei</i>	<i>Lb.</i> <i>acidophilus</i>	Suero de leche [30%]
1	+	+	+	+	+	-	+
3	+	-	+	+	+	-	+
5	+	+	+	+	-	+	+
7	+	-	+	+	-	+	+

*Todas las bebidas fueron fermentadas durante 24 horas a una temperatura de 28°C.

*A todas las bebidas fermentadas se les agregó sacarosa en una proporción del 3% (p/v) para realizar la evaluación sensorial.

Para realizar el análisis sensorial las muestras se sirvieron a baja temperatura (4°C), la cual pudo aumentar con el transcurso del tiempo (aproximadamente 20 minutos) antes de ser consumidas por los panelistas. Se sirvieron 4mL de cada una de las bebidas fermentadas. La cantidad de panelistas disponibles fue limitada resultando en un total de 17 sin entrenamiento previo. Los datos recopilados arrojaron los siguientes resultados:

6.6.1. El análisis de preferencia:

El objetivo de esta prueba fue definir el grado de aceptación y preferencia de un producto determinado por parte del consumidor.

Se analizó estadísticamente con la prueba de Friedman y Newell & Mc Farlen, teniendo como parámetro la hipótesis nula (H_0 = NO existe diferencia significativa entre las muestras) y la hipótesis alternativa (H_1 = Existe diferencia significativa entre las muestras).

Con la prueba de Friedman se obtuvo un valor negativo de la CHI^2 calculada de -242.151. En ocasiones, cuando en la muestra hay pocos individuos (menos de 50 o 60) el resultado de la prueba, es decir el valor de la CHI^2 , puede arrojar un número negativo, lo cual es posible, pero para los efectos de la prueba se debe interpretar como una fuerte evidencia de que no puede rechazarse la hipótesis nula (H_0 = No existe diferencia significativa entre las bebidas), (Stata Reference manual; 2005).

Con las tablas de Newell y Mc Farlen con 17 panelistas y 4 muestras, el valor crítico tabulado con una probabilidad 0.05 es de 20, por lo tanto concluimos que no existe diferencia significativa entre las muestras ya que la diferencia total de los pares entre las muestras fluctúa entre los valores de 1 a 5.

6.6.2. Prueba de aceptación:

Esta prueba permito medir el grado de preferencia y la actitud del panelista o catador hacia las bebidas fermentadas, se le preguntó al consumidor si estaría dispuesto a adquirirlo y por ende su gusto o disgusto frente al producto catado.

Este estudio se realizó para saber si el producto sería aceptado o no por una población (Anexo 2). Esta prueba se realizó de la siguiente manera, se compararon cuatro muestras de bebidas fermentadas que estaban codificadas aleatoriamente, dos de las bebidas fueron fermentadas con *Lb. casei* y las dos restantes con *Lb. acidophilus*. Este estudio se realizó para saber si el producto sería aceptado o no por una población.

Con una población de 17 panelistas y un nivel de probabilidad de 5%, no se obtuvo el número mínimo de jicios coincidentes necesarios (13) para establecer si existía una diferencia significativa entre las formulaciones SL + I + FOS y SL + FOS ambas fermentadas con *Lb. casei*.

En el caso de las formulaciones SL + I + FOS y SL + FOS ambas fermentadas con *Lb. acidophilus* con una población de 17 panelistas y un nivel de probabilidad de

5%, tampoco se obtuvo el número mínimo de juicios coincidentes necesarios (13) para establecer si existía una diferencia significativa entre éstas.

Estos resultados ponen de manifiesto nuevamente que con una población de 17 panelistas no existe diferencia significativa entre estas muestras. Para probar si existe o no diferencia significativa entre estas muestras, se ha propuesto realizar una evaluación sensorial que incluya tanto la prueba de aceptación como la de preferencia, pero con un número de panelistas no entrenados igual o mayor a 100, ya que los resultados que se obtienen con poblaciones más grandes tienden a ser más acertadas.

Los panelistas que realizaron estas pruebas sensoriales sugirieron algunos aspectos a cuidar en una elaboración posterior de las bebidas fermentadas, a continuación se presentan los más relevantes:

- Las bebidas fermentadas requieren de mayor acidez.
- Aumentar el dulzor de todas las bebidas.
- Aumentar la cantidad de sólidos totales de las 4 bebidas fermentadas.

7. SOBREVIVENCIA.

7.1. Estudio de la sobrevivencia de *Lactobacillus casei subespecie paracasei* LMGP-21380 y *Lactobacillus acidophilus* LMGP-21381 en medios elaborados con suero de leche, Inulina y FOS.

Es importante mencionar que esta prueba se realizó cuando las bebidas simbióticas ya habían sido adicionadas con sacarosa y máximo con un día de almacenamiento a 4°C.

En las figuras 14 y 15 se aprecia el comportamiento de *Lactobacillus casei subespecie paracasei* LMGP-21380 y *Lactobacillus acidophilus* LMGP-21381 en las formulaciones elaboradas con suero de leche, inulina y FOS, una vez

concluida la fermentación durante un periodo de almacenamiento de cuatro semanas en refrigeración.

Tal como se aprecia en la figura 14, la cuenta inicial de *Lb. casei* en las bebidas fermentadas se encuentra alrededor de 10^7 UFC/mL, en la primer semana aumenta hasta 10^9 UFC/mL en ambas formulaciones, en la segunda semana se observa una disminución en ambas bebidas, pero esta disminución fue más marcada en el medio que solo contenía FOS (10^8 UFC/mL), a pesar de la disminución en la semana 4 concentración de microorganismos vuelve a aumentar hasta 10^{10} UFC/mL para ambas formulaciones.

En la grafica 15 se observa el comportamiento de la sobrevivencia de *Lb. acidophilus*. Esta fermentación presentó un comportamiento similar que en *Lb. casei*, la cantidad inoculada al inicio de la fermentación era de 10^7 UFC/mL, en la semana 1 de almacenamiento se observó un aumento en la concentración que se encontró en un rango de 10^9 UFC/mL y 10^{10} UFC/mL, en la semana 2 se observa nuevamente una disminución en la densidad celular y se encuentra alrededor de 10^9 UFC/mL, en este caso en las semanas 3 y 4 la concentración de microorganismos probióticos en las bebidas fermentadas se mantuvo constante con un valor de 10^{10} UFC/mL.

En la semana dos para ambas cepas y en las diferentes formulaciones como se mencionó anteriormente se aprecia una disminución en la concentración de aproximadamente un ciclo logarítmico en las poblaciones, esto se le atribuye al cambio de temperatura al cual fueron sometidas las bebidas fermentadas, ya que al finalizar la fermentación las bebidas simbióticas fueron almacenadas a temperatura de refrigeración (4°C), lo cual afectó la velocidad de crecimiento de los microorganismos, a pesar de esta disminución el promedio de ambas poblaciones de microorganismos de *Lb. casei* y *Lb. acidophilus* en la semana dos fue superior a 10^6 UFC/mL que es el nivel mínimo requerido para considerar una bebida como probiótica. Un comportamiento similar fue reportado por Ankur (2008), donde realizó un estudio a 7 diferentes cepas de lactobacilos, en el cuál menciona que durante 4 semanas de almacenamiento de estas cepas a 4°C

cultivadas en caldo MRS, suplementado con prebióticos (inulina), observó que en general todas las cepas disminuyen su viabilidad en el periodo de almacenamiento, sin embargo la viabilidad de las cepas hasta el final del almacenamiento en todos los casos se mantuvo mayor a 10^6 UFC/mL, al igual que en este estudio.

En la semana tres se observa nuevamente el aumento aproximado de un ciclo logarítmico en las poblaciones de los microorganismos para cada una de las cepas, este comportamiento se atribuyó principalmente a que antes de almacenar las bebidas fermentadas a una temperatura de 4°C se agregó sacarosa a cada una de las bebidas, esta adición probablemente favoreció al desarrollo de los microorganismos durante el periodo de almacenamiento.

Aunque puede parecer un parámetro de menor importancia, mantener el pH adecuado es el primer paso para garantizar la seguridad y la conservación de los alimentos.

El pH del producto disminuyó conforme avanzaba el tiempo de almacenamiento lo que nos indicó que a mayor tiempo de almacenamiento será menor el pH de las bebidas fermentadas. Este es un punto muy importante que se debe tomar en cuenta en la elaboración de bebidas fermentadas ya que al inicio si se requiere la disminución del pH, pero no se requiere que baje más de un pH 4, ya que un producto demasiado ácido resultaría desagradable para los consumidores, es decir, mantener un pH constante será de gran importancia para este tipo de bebidas, para evitar que el pH de las bebidas fermentadas disminuya con el periodo de almacenamiento, será necesario agregar un corrector de acidez. Los correctores de la acidez se usan para alterar o controlar la acidez o la alcalinidad de un alimento y mantenerla a un nivel adecuado, lo que es importante en términos de procesado, sabor y seguridad alimentaria. Para corregir este problema podríamos agregar ácido fumárico a las bebidas fermentadas, ya que éste se añade a los alimentos para controlar la acidez, se usa también como agente aromatizador. Algunas ventajas de usar ácido fumárico es que posee uno de los mayores poderes como acidulante. Incrementa el poder de gelificantes y se puede

mezclar con otros acidulantes. No presenta un sabor picante y extremo. Este ingrediente ya se utiliza en alimentos como en gelatinas, refrescos, mermeladas, conservas, recubrimientos de confites, etc. Disminuye hasta el 40% el consumo de cítrico y el 20% de tartárico en refrescos y gelatinas. En bebidas dietéticas enmascara los remanentes metálicos que presentan algunos edulcorantes.

Tal y como lo señala Corriols (2004), la preocupación primordial, a la hora del desarrollo de productos con microorganismos probióticos, radica en mantener su viabilidad durante un periodo de almacenamiento definido, su distribución y la supervivencia a la hora de consumirse, de esa forma, se producen los beneficios en la salud del consumidor. Las bebidas fermentadas cumplieron con este criterio de viabilidad; ya que al finalizar su periodo de almacenamiento (4 semanas) contaban con una cantidad mayor a la requerida de UFC/mL para ser consideradas como bebidas probióticas, con valores que oscilaban de 10^{10} UFC/mL hasta 10^{11} UFC/mL para ambos microorganismos (Figuras 14 y 15).

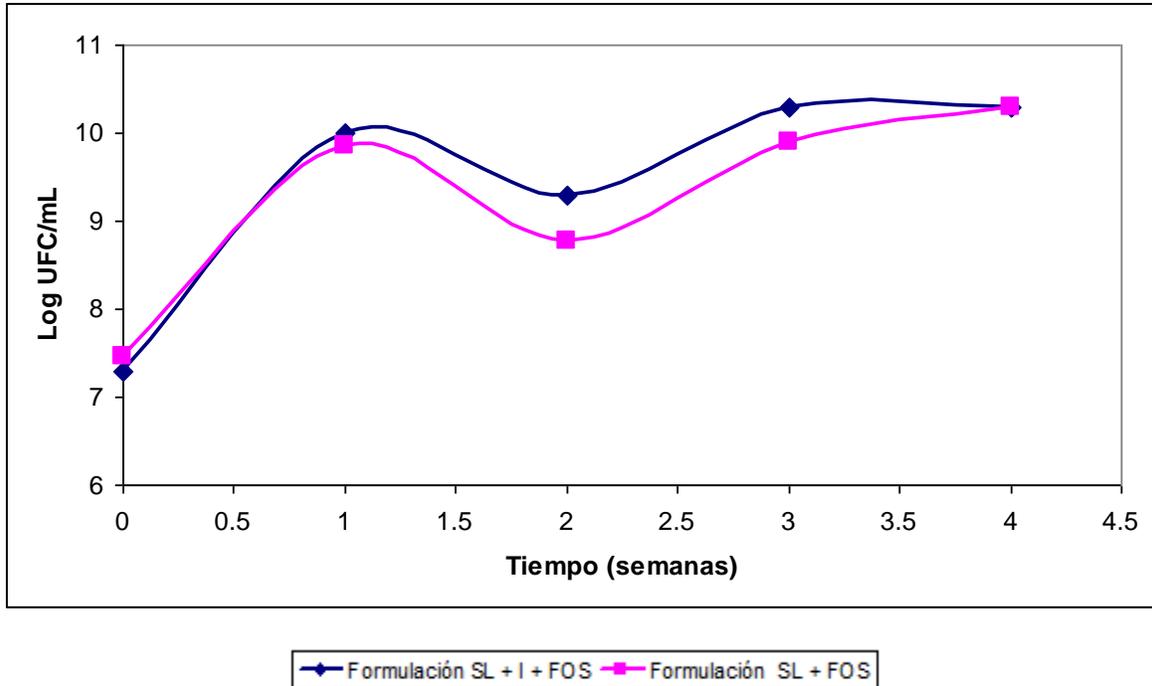


Figura 14: Comportamiento de la sobrevivencia de *Lb. casei* en los medios SL + I + FOS y SL + FOS.

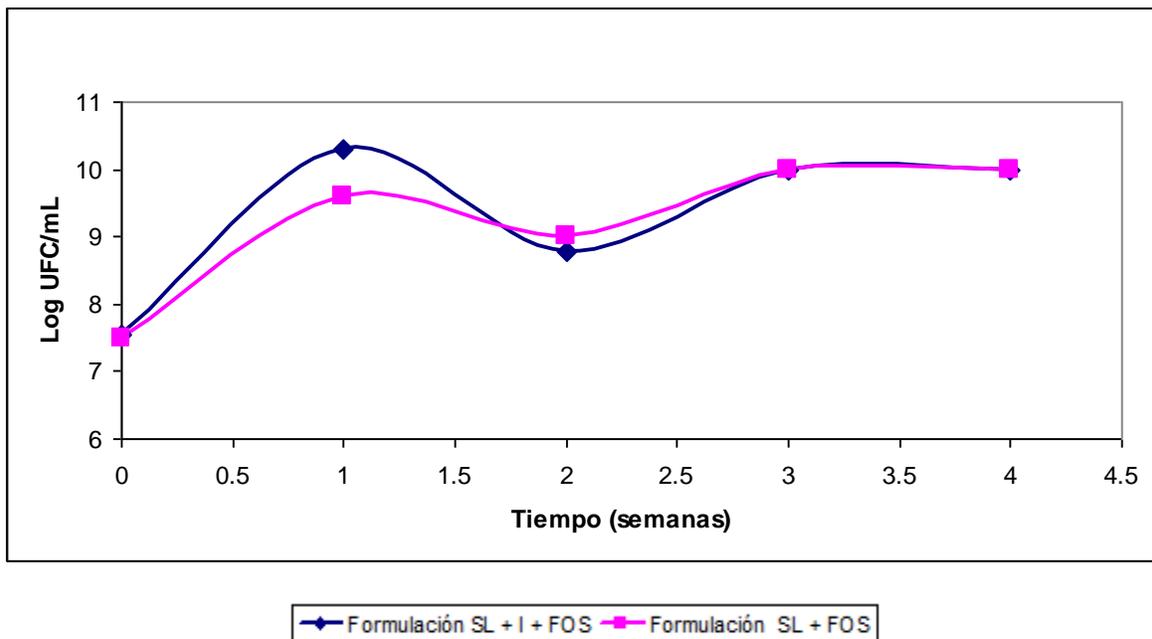


Figura 15: Comportamiento de la sobrevivencia de *Lb. acidophilus* en los medios SL + I + FOS y SL + FOS.

8. DESCRIPCIÓN GENERAL DE LAS BEBIDAS FERMENTADAS.

En general las bebidas fermentadas presentaron un color blanco brillante con un ligero tono amarillo, el pH de las bebidas antes de su almacenamiento a 4°C se encontraba en un valor aproximado de 4.5, en las dos primeras semanas de almacenamiento no se observó ningún cambio primordial en las características físicas de las mismas, solo una disminución del pH, de 4.5 a 4.2 aproximadamente, en la semana uno se observó un aumento de 10^7 UFC/mL a un valor de 10^{10} UFC/mL para las formulaciones que tenían SL + I + FOS para ambas cepas probióticas y 10^9 UFC/mL para las formulaciones que solo contenían SL + FOS para ambos microorganismos, en la semana dos se observó la disminución de aproximadamente un ciclo logarítmico en el número de UFC/mL en las 4 formulaciones. En las semanas tres y cuatro fue clara la precipitación de las bebidas fermentadas, este comportamiento es una consecuencia de de la producción de ácido láctico por las bacterias probióticas (Heller; 2001), siendo ésta más evidente en la cuarta semana de almacenamiento, al igual que una disminución más radical en el valor de pH, con un valor que oscilaba entre 3.6 y 3.8 para cada una de las bebidas, en cuanto al aspecto microbiológico, se observó que todas las bebidas se encontraban en un valor de 10^{10} UFC/mL de bacteria probiótica.

9. CONCLUSIONES.

- Se elaboraron 4 bebidas simbióticas con base en suero de leche adicionado con prebióticos y probióticos.
- Se observó que las cepas probióticas consumieron los ingredientes prebióticos procedentes del agave que se utilizaron para realizar este estudio.
- No se encontró diferencia significativa entre las 4 distintas formulaciones a las cuáles se les realizó una evaluación sensorial.
- Las cepas probióticas se desarrollaron mejor en los medios que contenían FOS como ingrediente prebiótico que en los que contenían inulina.
- La composición física de las bebidas fermentadas y almacenadas a 4°C durante un periodo de un mes variaron a partir de la semana dos, donde se observó la precipitación de los ingredientes.
- Después de un mes de almacenamiento de las bebidas simbióticas, los microorganismos permanecieron viables obteniendo valores superiores a 10^6 UFC/mL.
- La bebida desarrollada es una buena alternativa para el uso del suero de leche en la alimentación humana, debido a su gran valor nutricional.

10. Perspectivas del trabajo

- Utilizar estabilizadores para mejorar la textura de las bebidas simbióticas.
- Valerse de saborizantes para mejorar la aceptación del consumidor.
- Comparar las bebidas simbióticas realizadas en este estudio con bebidas comerciales.
- Llevar a cabo un análisis químico de las bebidas fermentadas verificando sus componentes para poder realizar un etiquetado nutricional.
- Realizar un análisis de sinergismo entre los microorganismos probióticos.

11. BIBLIOGRAFÍA.

- **Aguirre M., Collins M.D:** Lactic acid bacteria and human clinical infection. J Appl Bacteriol (1993); 75(2): 95-107.

- **Amores R., Calvo A., Maestre J.R. y Martínez Hernández D:** Probióticos. Revista Española de Quimioterapia, Volumen 17, Junio (2004), Pp 131-139.

- **Ankur Desai:** B.Sc. M. Sc. (2008). Strain Identification, Viability and Probiotics properties of *Lactobacillus casei*.

- **Araya L. Héctor, Mariane Lutz R. Mariane:** Alimentos Funcionales y Saludables. Abril (2003) Revista chilena de nutrición Rev Chil Nutr Vol. 30, Nº1.

- **Ashwell M:** Conceptos sobre Alimentos Funcionales. ILSI Europe Concise Monograph Series, ILSI Press (2005).

- **Athanasiadis, I., A.M. Paraskevopoulou, G. Blekas and V. Kiosseoglu.** (2004). Development of novel whey beverage by fermentation with kefir granules. Effect of various treatments. Biotech. Prog. 20:1091-1095.

- **Bornet F.R.J., Brouns F., Tashiro Y. and Duvillier V:** Nutritional aspects of short-chain fructooligosaccharides: natural occurrence, chemistry, physiology and health implications. Digest Liver Dis (2002) 34: 111-120

- **Cabeza Herrera E.A:** Bacterias ácido-lácticas (BAL): Aplicaciones como cultivos estárter para la industria láctea y cárnica. Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias Básicas, Universidad de Pamplona, (2004).

- **Carrillo A.J.L:** Tratamiento y reutilización del suero de leche. Revista *Conversus México* (2002); 10, ipn, 27-30.

- **Corrieu, G.,** Remeuf, F., Oliveira, M. N., Lucas, A., Sodini, I. (2002). Effect of Milk Base and Starter Culture on Acidification, Texture, and Probiotic Cell Counts in Fermented Milk Processing. *J. Dairy Sci.* 85:2479 – 2488.

- **Corriols M.** Determinación de la sobrevivencia de *Bifidobacterium lactis* en una natilla liviana durante el período de almacenamiento. Tesis Lic. Tecnología de Alimentos. Universidad de Costa Rica, Escuela de Tecnología de Alimentos, San José, (2004).

- **Crittenden R.G. y Playne M.J:** Production, properties and applications of food grade oligosaccharides. *Trends Food Sci Tech* (1996); 7:361.

- **De las Cagigas-Reig A. L.,** Blanco - Anesto J: Prebióticos y probióticos, una relación beneficiosa. *Revista Cubana Alimentación y Nutrición*, (2002); 63-68.

- **Deraz, S.F.**, Karlsson, E.M., Hedström, M., Andersson, M.M., Matiasson, B. (2005). Purification and characterization of acidocin in D20079, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* DSM 20079. *Journal Biotechnology* 117 (4): 343-354.

- **Desmazeaud M.** Les bacteries Lactiques Dans l'alimentation humaine: utilisation et innocuité. *Cahier Agricultures* (1996). 5: 331-343.

- **Devlieghere Frank**, Vermeiren Lieve, Debevere Johan. New preservation technologies: Possibilities and limitations. *International Dairy Journal*, Volume 14, Issue 4, April (2004), Pages 273-285.

- **Diplock A.T.**, Aggett P.A., Ashwell M., Borneo F., Fern E. B., Roberfroid M.B. Scientific concepts of functional foods in Europe: Consensus Document. *Br J Nutr* (1999); 81: supp 1, S1-S2

- **Early Ralph.** Tecnología de los productos lácteos. 2ª ed. España: Acribia, (2000).

- **Ehrmann, M.**, Korakli, M. and Vogel, R. (2003). Identification of the gene for beta-fructofuranosidase of *Bifidobacterium lactis* DSM 10140T and characterization of the enzyme expressed in *Escherichia coli*. *Curr. Microbiol.* 46:391

- **Felis E. G., y Dellaglio† F.**, Taxonomy of *Lactobacilli* and *Bifidobacteria*. Online journal at www.ciim.net, 44-61.

- **Fernández J.** (2003). Yacon: Importancia Prebiótica y Tecnológica. Revista Agroenfoque. Ed. N° 139. Noviembre. Lima. Perú. 26 p.

- **García Yanelys;** Boucourt, R., Albelo Nereida., Núñez Odalis: Fermentación de inulina por bacterias ácido lácticas con características probióticas. Revista Cubana de Ciencia Agrícola, vol. 41, núm. 3, (2007), pp. 263-266. Instituto de Ciencia Animal. La Habana, Cuba

- **Gobbetti, Marco:** *Lactobacillus casei*, Enciclopedia of Food Microbiology, Instituto di Produzione Alimentari, Agricultural Faculty of Foggia , Italia (1999).

- **Gomes, A.M.P, Malcata, F.X:** *Bifidobacterium spp.* and *Lactobacillus acidophilus*: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as a probiotic. Trends in Food Science y Techonology (1999); 10:139 – 157

- **Gutiérrez Luid,** Villegas Jesús, Huitrón Carlos, Trujillo Roldán: Producción y aplicación de inulinasas utilizando la penca de Agave tequilana Weber variedad azul como fuente de carbono en cultivo sumergido con el hongo. Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

- **Handan Kaplan and Robert W. Hutkins:** Fermentation of Fructooligosaccharides by Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria: Department of Food Science and Technology, 338 FIC, University of Nebraska—Lincoln, 2000.
- **Hébuterne X.** Gut changes attributed to ageing: effects on intestinal microflora. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. January 2003, pages 49-54
- **Heller, Knut J.** 2001. Probiotic bacteria in fermented foods: product characteristics and starter organisms. *Am. J. Clin. Nutr.* 73: 374 – 379
- **Hernández-Carranza P. y Jiménez-Munguía M.T:** Propiedades funcionales y aplicaciones industriales de los fructooligosacáridos. Departamento de Ingeniería Química, Alimentos y Ambiental. Universidad de las Américas, Puebla. Sta. Catarina Mártir, Cholula, Puebla. 72810. México (2010): 1-8.
- **Hernandez- Carranza P. y Jiménez-Munguía M. T:** 2010. Propiedades funcionales de los fructo-oligosacáridos.
- **Hilton E.,** Rindos P. e Isenberg H.D. *Lactobacillus* GG vaginal suppositories and vaginitis. *Journal of Clinical Microbiology* (1995). 33: 14-33.
- **Hugunin Alan:** Productos de Suero de Leche en Yogurt y Productos Lácteos Fermentados. *Mundo Lácteo y Cárnico* 2008. Pp 4-8.

- **Jay, J. M.** (2003). Modern Food Microbiology Chapter 7: Fermentation and Fermented Dairy Products. 6th Ed. Pp 113-128.

- **Jimenez G.J;** García G.M. Propiedades Nutracéuticas de las Proteínas del Suero de Leche. Carnilac Industrial (200); 6: 22-27

- **Juárez M.,** Olano A., Morais F., (2005) Alimentos funcionales. Madrid: FECYT.

- **Kaplan, H and Hutkins, R.** (2003). Metabolism of fructooligosaccharides by *Lactobacillus paracasei* 1195. Appl. Environ. Microbiol. 69:2217.

- **Kaplan, H and Hutkins, R.** (2000). Fermentation of fructooligosaccharides by lactic acid bacteria and bifidobacteria. Department of Food Science and Technology, University of Nebraska-Lincoln. (2000).

- **Larpent, J.P.** Las bacterias lácticas. En ICMSF, Microbiología Alimentaria Vol. 2., Las fermentaciones alimentarias. Editorial Acribia S.A. Zaragoza. España (1995); 3-17.

- **Lopez G. Mercedes,** Mancilla M. Norma and Mendoza D. Guillermo: Molecular Structures of Fructans from Agave tequilana Weber variedad azul. Departamento de Biotecnología y Bioquímica, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN.

- **Lyhs, U.** Lactic acid bacteria associated with the spoilage of fish products. Academic Dissertation, Department of Food and Environmental Hygiene. Faculty of Veterinary Medicine, University of Helsinki (2002).

- **Madrigal Lorena y Sangronis Elba:** La inulina y derivados como ingredientes claves en alimentos funcionales. Caracas-Venezuela (2007). Órgano Oficial de la Sociedad Latinoamericana de Nutrición Vol. 57 N° 4. Universidad Simón Bolívar, Departamento de Procesos Biológicos y Bioquímicos.

- **Maragkoudakis, P.A.,** Zoumpopoulou, G., Miaris, C., Kalantzopoulos, G., Pot, B., Tsakalidou, E. Probiotic potential of *Lactobacillus* strains isolated from dairy products. Int. Dairy J. (2006); 16: 189-199

- **Martínez-Hernández A,** Pastrana-Chávez J, Sánchez-Villarreal A, Lara-Reyna J., Herrera-Estrella L., Herrera-Estrella A., Martínez de la Vega O., Simpson-Williamson J: Genómica de Agave tequilana: Identificación de genes útiles para la industria tequilera y el desarrollo de usos alternativos del agave. CINVESTAV campus Gto. (2008).

- **Mital, B.K. and Garg, S.K:** Acidophilus Milk Products: Manufacture and Therapeutics in Food Reviews International (1992) 8: 347-389

- **Miñana I. Vitoria.** Oligosacáridos en nutrición infantil: fórmula infantil, alimentación complementaria y del adolescente. Sección de Nutrición Infantil. Acta Pediatrica Esp. 2007; 65(4): 175-179.

- **De los Monteros Fernández José Joel.** Caracterización del proceso de crecimiento de Bacillus subtilis bajo condiciones anaerobias. Universidad Nacional Autónoma De México. Instituto de Biotecnología Cuernavaca, Mor. Febrero del 2005.

- **Murphy, O:** 2001. Non polyol low digestible carbohydrates: food applications and functional benefits. British Journal of Nutrition 85(1): S47-S53.

- **Olveira Fuster G., González Molero I:** Probióticos y prebióticos en la práctica clínica. Málaga-España 2007. Unidad de Nutrición Clínica y Dietética. Servicio de Endocrinología y Nutrición. Hospital Regional Universitario Carlos Haya. Instituto de Salud Carlos III.

- **Oliveros Leal L. y J.M. Moreno Villares:** Prebióticos en fórmulas infantiles Unidad de Nutrición Clínica. Madrid-España. An Pediatr, Monogr. (2006); 4(1):20-9.

- **Parra Huertas R. A:** Bacterias Ácido Lácticas: Papel Funcional En Los Alimentos, Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia. (2010) 8: 93-105.

- **Peña A.S:** Flora intestinal, probióticos, prebióticos, simbióticos y alimentos novedosos. (2007). *Rev Esp Enferm Dig (Madrid)*. Vol. 99. N° 11, pp. 653-658.

- **Pedersen Martin B.,**Philippe Gaudu, Delphine Lechardeur, Marie-Agnès Petit, and Alexandra Gruss. *Aerobic Respiration Metabolism in Lactic Acid Bacteria and Uses in Biotechnology* . Institut National de la Recherche Agronomique, 78352 Jouy-en-Josas Cedex, France; (2011).

- **Prado F. C.,** Parada J. L., Pandey A., Soccol C. R., Trends in non-dairy probiotic beverages., *Food Research International*, (2008), 111-123.

- **Rafter J:** Lactic acid bacteria and cancer: mechanistic perspective. Huddinge-Sweden (2002), Department of Medical Nutrition, Karolinska Institute, Pages 89-94.

- **Roberfroid M.B. and Delzenne N.M:** Dietary fructans. *Annu Rev Nutr* (1998) 18: 117-143.

- **Rodríguez, D.,** Rocha Santos, T. A. P., Pereira, C. I., Gómez, A. M., Alcata, F. X., Freitas, The potential effect of FOS and inulin upon probiotic bacterium performance in curdled milk matrices., *Food Science and Technology*, (2010); 100-108.

- **Sabater Molina María:** Efecto de las poliaminas y los fructooligosacáridos de la dieta sobre la maduración intestinal en cerdos destetados precozmente, 2008. Presentada por Universidad de Murcia, Facultad de Biología, Departamento de Fisiología, para la obtención del grado de Doctora en Biología.

- **Samaniego Fernández Luz María., Maryla Sosa del Castillo.** *Lactobacillus spp:* Importantes promotores de actividad probiótica, antimicrobiana y bioconservadora. Matanzas-Cuba., (1998). Centro de Estudios Biotecnológicos. Facultad de Agronomía. Universidad de Matanzas “Camilo Cienfuegos”.

- **Sarmiento Rubiano L. A:** Investigación de propiedades prebióticas de alimentos o componentes alimenticios. Orinoquia 12(1):182-193, 2008. Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos. CSIC. Valencia-España

- **Sanders M.E., Huis in't Veld J.** Bringing a probiotic-containing functional food to the market: microbiological, product, regulatory and labeling issues. Antonie van Leeuwenhoek, Volume 76, Number 1, November (1999), pp. 293-315(23)

- **Shahbal, S., Hemme, D. & Desmazeaud, M.** (1991). High cell wall-associated proteinase activity of some *Streptococcus thermophilus* strains (H-strains) correlated with a high acidification rate in milk. Lait 71, 351±357.

- **Shah N.P.** 2001. Functional foods from probiotics and prebiotics. *Food Technology* 55 (11) : 46-53.
- **Stiles M. E., Holzapfel W. H:** Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy, *International Journal of Food Microbiology*, (1997); 1-29.
- **Taranto, M. T., Médici, M., Font de Valdez G.,** Alimentos funcionales probióticos. *Química Viva*, (2005); 1, año 4, 26-34.
- **Valencia Denicia E., Ramírez Castillo M. L., A.C.** Impacto ambiental: La problemática., *La industria de la Leche y la contaminación del Agua*, (2009); 27-31.
- **Van Belzen N;** (2002). The role of Lactoferrin in Cancer Prevention, *Proceedings of the 26th International Dairy Congress*, Paris, France.
- **Van Loo J, De Coussement P, Leenheer L, Hoebregs H, Smits G.** On the presence of inulin and oligofructose as natural ingredients in the western diet. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 1995; 35: 525–52.
- **Velázquez Mansilla Jeanette Paola.** Efecto Antagonista de la Cepa *Carnobacterium piscicola* sobre *Listeria monocytogenes* en Salmón Ahumado en Frío. Valdivia-Chile., (2006). Presentada por La Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias, Escuela de Ingeniería en Alimentos para la obtención del grado Licenciado en Ciencias de los Alimentos.

- **Vergara Sobarzo Ana Odette.** Estudio de la Viabilidad de *Lactobacillus casei* en Jugo de Pera. Valdivia-Chile., 2007. Presentada por La Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias, Escuela de Ingeniería en Alimentos para la obtención del grado Licenciado en Ciencias de los Alimentos.
- **Viloche B. J; Tito V. C;** Ciencia y Desarrollo. Aislamiento de *Latobacillus* nativos de productos de fermentación en la ciudad de Tacna pp 61-66.
- **Vinderola, C.G. and Reinheimer, J.** 2003. “Lactic acid starter and probiotic bacteria: a comparative `in vitro´ study of probiotic characteristics and biological barriers resistance” en Int. Dairy J., 36, 895-904.
- **Wouters Rudy:** Innovación en productos lácteos. Mundo lácteo y cárnico. (2006) 19-22.
- **Yun J.W:** Fructooligosaccharides-ocurrence, preparation, and application. Enzyme Microb Teach (1996); 19: 107-117.
- **CODEX STAN 289-1995:** Norma del CODEX para sueros en polvo.
- **Estudio FAO Alimentación y Nutrición:** Probióticos en los alimentos; Propiedades saludables y nutricionales y directrices para evaluar. Córdoba Argentina (2003).
- **Stata (2005) Reference manual A-J. Stata Pres.** Texas, 441-448.

ANEXO 1: Ficha técnica del suero de leche.



Suero de Leche Dulce Alimatec

Descripción

El Suero de Leche en Polvo resulta de someter el suero de leche en un proceso de secado, procurando mantener todas las propiedades nutritivas funcionales y sensoriales del suero natural, apto para el consumo humano y cuyos parámetros nutrimentales es totalmente soluble al agua, esta libre de aditivos y tiene excelente calidad nutricional.

Características

Descripción	Especificación
Color	Amarillo cremoso
Sabor	Lácteo característico
Olor	Lácteo característico
Apariencia	Polvo granular
Humedad	5% máx.
Proteína	11.5% min.
Grasa	2.0% máx.
pH	6.6 máx.
Partículas quemadas	Disco A
Solubilidad	Completa
Cuenta Total	30,000 ufc/g máx.
Material extraño	Exento
Coliformes totales	<=10 ufc/g máx.
Estafilococos	Ausente
Aureus	Ausente
Hongos y Levaduras	100 ufc/g máx.
Salmonella	Ausente
E.Coli	<=10 ufc/g máx

Aplicaciones.

El suero de leche puede ser empleado en la elaboración de productos lácteos diversos, como bebidas nutricionales.

Almacenamiento y Vida de Anaquel

El producto debe almacenarse en un lugar fresco y seco. La vida de anaquel es de 12 meses a las condiciones antes mencionadas.

Empaque.

Saco de papel kraft de 25kg, con bolsa interior de polietileno.

Tel. + 52 (55) 5632 - 3634
Fax. + 52 (55) 5632 - 3634
sresendiz@alimatec.com.mx
www.alimatec.com.mx

alimatec
Av. 21 - 23 de Dolores Guerrero Edif. 59
Depto. 102, Unidad C.T.M. Culhuacán
Del. Coyoacán 04-80, México, D.F.



ANEXO 2: Significancia para pruebas de dos muestras.

EVALUACION SENSORIAL

Tabla 2. Significancia para pruebas de dos muestras

Número de juicios	Pruebas bilaterales* Nivel de probabilidad			Pruebas unilaterales** Nivel de probabilidad		
	5%	1%	0.1%	5%	1%	0.1%
5	-	-	-	5	-	-
6	-	-	-	6	-	-
7	7	-	-	7	7	-
8	8	8	-	7	8	-
9	8	9	-	8	9	-
10	9	10	-	9	10	10
11	10	11	11	9	10	11
12	10	11	12	10	11	12
13	11	12	13	10	12	13
14	12	13	14	11	12	13
15	12	13	14	12	13	14
16	13	14	15	12	14	15
17	13	15	16	13	14	16
18	14	15	17	13	15	16
19	15	16	17	14	15	17
20	15	17	18	15	16	18
21	16	17	19	15	17	18
22	17	18	19	16	17	19
23	17	19	20	16	18	20
24	18	19	21	17	19	20
25	18	20	21	18	19	21
26	19	20	22	18	20	22
27	20	21	23	19	20	22
28	20	22	23	19	21	23
29	21	22	24	20	22	24
30	21	23	25	20	22	24
31	22	24	25	21	23	25
32	23	24	26	22	24	26
33	23	25	27	22	24	26
34	24	25	27	23	25	27
35	24	26	28	23	25	27
36	25	27	29	24	26	28
37	25	27	29	24	27	29
38	26	28	30	25	27	29
39	27	28	31	26	28	30
40	27	29	31	26	28	31
41	28	30	32	27	29	31
42	28	30	32	27	29	32
43	29	31	33	28	30	32
44	29	31	34	28	31	33
45	30	32	34	29	31	34
46	31	33	35	30	32	34
47	31	33	36	30	32	35
48	32	34	36	31	33	36
49	32	34	37	31	34	36
50	33	35	37	32	34	37
60	39	41	44	37	40	43
70	44	47	50	43	46	49
80	50	52	56	48	51	55

* Número mínimo de juicios coincidentes necesario para establecer diferencia significativa

** Número mínimo de respuestas correctas necesario para establecer diferencia significativa

Fuente: Roessler y col. 1956