



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE HIDALGO**



Instituto de Ciencias Agropecuarias

**“EFECTO DE BACTERIAS PROBIÓTICAS LIBRES Y
ENCAPSULADAS EN LA CONSERVACION DE LACTOSUERO”**

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRA EN ALIMENTOS

PRESENTA

Rosalía Moras Montiel

DIRECTOR

Dr. Rafael Germán Campos Montiel

ASESORES

Dra. Diana Jaqueline Pimentel González

Dr. Gabriel Aguirre Álvarez

Tulancingo; Hgo

Mayo 2014



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO
INSTITUTO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS**

COORDINACIÓN DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO DEL ICAP

Actas de la reunión del comité de Tesis de Maestría en Alimentos
Apertura:

La reunión ordinaria para evaluar los avances de la tesis titulada: **“EFECTO DE BACTERIAS PROBIOTICAS LIBRES Y ENCAPSULADAS EN LA CONSERVACION DE LACTOSUERO”** que desarrolla la estudiante Ing. Agroindustrial Rosalia Moras Montiel.

Asistentes:

Dr. Rafael Germán Campos Montiel

Dra. Diana Jaqueline Pimentel González

Dr. Gabriel Aguirre Álvarez

A. Revisión de trabajo de Tesis

Observaciones:

El comité revisó con antelación el trabajo de tesis en extenso propuesto por la estudiante comunicando a Ing. Agroindustrial Rosalia Moras Montiel, oportunamente las correcciones, adiciones y/o modificaciones que debería considerar para mejorar su trabajo y poder continuar con el proceso de obtención de grado. La estudiante atendió de forma conveniente las sugerencias del comité.

B. Acuerdos

En esta fecha, se comunica atentamente que el comité conformado por los profesores firmantes, otorgamos nuestra autorización para que la estudiante imprima su trabajo final de tesis y continúe con los trámites necesarios para la obtención del grado de maestría respectivo.

ATENTAMENTE

“AMOR, ORDEN Y PROGRESO”

Tulancingo de Bravo, Hidalgo a 24 de abril de 2014.

Dr. Rafael Germán Campos Montiel

Dra. Diana Jaqueline Pimentel González

Dr. Gabriel Aguirre Álvarez



AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Dr. Rafael Campos Montiel por su incondicional paciencia y apoyo que tuvo conmigo durante la dirección de este trabajo, por impulsarme siempre a seguir adelante y por compartir conmigo que todos los obstáculos debemos tomarlos como una oportunidad. Pero sobre todo por su amistad.

A la Dra. Diana Pimentel González, por su amistad invaluable, por saber escuchar y enseñar al mismo tiempo. Por compartir experiencias, muchas gracias.

Al Dr. Gabriel Aguirre por las observaciones hechas para mejora de este trabajo. Y por la amistad de varios años.

A la Dra. Aurora Quintero por apoyarme en el laboratorio.

A todos los profesores que me dieron clase en la maestría, por la entrega a su trabajo, por ese deseo de transmitir sus conocimientos y compartirlos conmigo y sobre todo porque gracias a ustedes puedo concluir otro ciclo de mi vida. A todos muchas gracias.

A todos mis compañeros de clase por el tiempo compartido en nuevas experiencias.

Y a todas aquellas personas que de un modo u otro intervinieron para poder concluir este trabajo.

Mami gracias porque sin tu apoyo siempre incondicional hubiera sido más difícil.

Papá gracias por sembrar todo aquello que hay en mí.

Oscar gracias por tu compañía, confianza, apoyo, amor y por estar conmigo en todos mis proyectos siempre impulsándome a concluirlos. Te amo.

Oscar y Omar ustedes son el impulso que me permitió llegar al final de esta meta trazada, gracias por ese tiempo que me regalaron, en el cual no pude estar cuando me necesitaban. Este esfuerzo también es suyo.

Mirella, Diana y Juan Abraham gracias por tolerarme y apoyarme cuando los he necesitado.

DEDICATORIA

Dedico esta tesis a:

Mi papá que siempre creyó en mí, y porque me enseñó a concluir todas las cosas
que se inician.

Mis hijos, que son la alegría de mi vida.

Mi mamá por estar siempre conmigo apoyándome.

Mis hermanos y sobrinos por la unión familiar que existe.

Mi esposo por compartir conmigo parte de su vida.

INDICE

Contenido

| | |
|--|-----------|
| RESUMEN | VIII |
| 1. INTRODUCCION | 1 |
| 2. REVISIÓN DE LITERATURA | 5 |
| 2.1 MICROORGANISMOS PROBIÓTICOS | 6 |
| 2.2 BENEFICIOS A LA SALUD ASOCIADOS CON LOS PROBIÓTICOS | 11 |
| 2.3 <i>LACTOBACILLUS RHAMNOSUS</i> Y SUS EFECTOS COMO PROBIÓTICO. | 16 |
| 2.4 PRODUCTOS NUTRACÉUTICOS | 18 |
| 2.5 ALIMENTOS FUNCIONALES | 20 |
| 2.6 MICRO ENCAPSULACIÓN DE MICROORGANISMOS PROBIÓTICOS. | 22 |
| 2.7 EMULSIONES, EMULSIFICANTE Y ESTABILIZANTE | 23 |
| 2.8 LACTOSUERO | 30 |
| 2.9 LACTOSUERO COMO MEDIO DE CULTIVO | 32 |
| 3. OBJETIVOS..... | 34 |
| 3.1 OBJETIVO GENERAL..... | 35 |
| 3.2 OBJETIVOS PARTICULARES..... | 35 |
| 4. HIPÓTESIS..... | 36 |
| 5. JUSTIFICACIÓN | 38 |
| 6. MATERIALES Y MÉTODOS | 41 |
| 6.1 CONDICIONES DE CULTIVO DE <i>L. RHAMNOSUS</i> | 42 |
| 6.2 PREPARACIÓN DE <i>L. RHAMNOSUS</i> POR ENTRAMPAMIENTO EN EMULSIONES | 42 |
| 6.3 CONDICIONES EXPERIMENTALES..... | 44 |
| 6.4 CARACTERIZACIÓN EXPERIMENTAL DEL LACTOSUERO | 45 |
| 6.5 ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICOS | 45 |
| 6.5.1 <i>Determinación de proteína soluble.</i> | 45 |
| 6.5.2 <i>Determinación de materia grasa.</i> | 46 |
| 6.5.3 <i>Determinación de sólidos totales.</i> | 47 |
| 6.5.2 <i>Determinación de azúcares totales</i> | 47 |
| 6.5.3 <i>Determinación de pH</i> | 48 |
| 6.5.4 <i>Determinación de acidez titulable</i> | 48 |
| 6.6 ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS | 49 |
| 6.6.1 <i>Cuantificación de mesófilos aerobios, bacterias ácido lácticas y coliformes totales.</i> 49 | |
| 7. RESULTADOS Y DISCUSIONES | 51 |
| 7.1 CULTIVO DE <i>L. RHAMNOSUS</i> | 52 |
| 7.2 <i>L. RHAMNOSUS</i> ENTRAMPADA EN EMULSIONES DOBLES $W_1/O/W_2$ | 53 |

| | | |
|------------|--|-----------|
| 7.3 | CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA Y MICROBIOLÓGICA DEL LACTOSUERO ÁCIDO..... | 55 |
| 7.3.1 | <i>Proteína soluble</i> | 55 |
| 7.3.2 | <i>Materia grasa</i> | 56 |
| 7.3.3 | <i>Sólidos totales</i> | 56 |
| 7.3.4 | <i>Azúcares totales</i> | 57 |
| 7.3.5 | <i>pH</i> | 58 |
| 7.3.6 | <i>Determinación de acidez titulable</i> | 60 |
| 7.4 | CARACTERIZACIÓN MICROBIOLÓGICA | 62 |
| 8. | CONCLUSIONES | 66 |
| 9. | RECOMENDACIONES..... | 68 |
| 10. | REFERENCIAS..... | 70 |
| 11. | ANEXOS | 90 |

INDICE DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 6.1. Homogeneizador Virtis operado a 5000 rpm..... | 43 |
| Figura 6.2. Tratamientos de lactosuero pasteurizado, lactosuero pasteurizado inoculado y emulsiones..... | 44 |
| Figura 6.3. Curva patrón para determinación de proteína soluble por el método de Bradford)..... | 46 |
| Figura 6.4. Curva patrón de azúcares totales (Método Antrona)..... | 48 |
| Figura 6.5. Medios de cultivo de microorganismos..... | 49 |
| Figura 7.1. Emulsiones $W_1/O/W_2$ a los 0,1,2,4,8,16 y 32 días | 53 |
| Figura 7.2. Sólidos totales suspendidos en lactosuero pasteurizado, inoculado y emulsiones..... | 57 |
| Figura 7.3. Concentración de pH en el estudio de lactosuero ácido en tres tratamientos..... | 59 |
| Figura 7.4. Curva de crecimiento de ácido láctico en tres tratamientos..... | 61 |
| Figura 7.5. Curva de crecimiento de coliformes totales en tres tratamientos a) lactosuero ácido pasteurizado, b) lactosuero ácido pasteurizado e inoculado con <i>L. rhamnosus</i> c) entrapamiento de <i>L. rhamnosus</i> en emulsiones dobles..... | 62 |
| Figura 7.6. Comportamiento de bacterias mesófilas en tres tratamientos a) lactosuero ácido pasteurizado b) lactosuero ácido pasteurizado e inoculado con <i>L. rhamnosus</i> c) entrapamiento de <i>L. rhamnosus</i> en emulsiones dobles..... | 63 |
| Figura 7.7. Cinética de crecimiento de bacterias ácido lácticas en tres tratamientos. a) Lactosuero ácido pasteurizado b) lactosuero ácido pasteurizado e inoculado con <i>L. rhamnosus</i> c) entrapamiento de <i>L. rhamnosus</i> en emulsiones dobles..... | 64 |

INDICE DE TABLAS

| | |
|---|----|
| Tabla 2.1. Microorganismos usados como probióticos..... | 8 |
| Tabla 2.2 Principales mecanismos de acción de los probióticos..... | 9 |
| Tabla 2.3. Principales microorganismos probióticos y algunos de sus efectos benéficos para la salud..... | 15 |
| Tabla 2.4. Composición química de lactosuero líquido dulce y ácido..... | 31 |
| Tabla 7.1. pH observado en 7 variables..... | 54 |
| Tabla 7.2 Concentración de proteína después de 32 días en tres tratamientos..... | 56 |
| Tabla 7.4. Azúcares totales en tres diferentes tratamientos en la observación inicial y final de los tratamientos después de 32 días..... | 58 |

RESUMEN

La mayoría de las empresas queseras no tienen tecnologías viables para el procesamiento del lactosuero que se obtiene de la coagulación de la leche en la elaboración del queso, por lo tanto el lactosuero es un alimento muy perecedero que se fermenta en forma acelerada y ocupa mucho volumen en las queserías, éste es vertido como residuo aunque contiene una gran cantidad de nutrientes. Una opción es dar un mínimo de procesamiento al lactosuero mediante la inoculación de una bacteria láctica para su conservación y darle propiedades nutraceúticas para mejorar las condiciones intestinales.

El objetivo de este trabajo es determinar el efecto de la adición de una bacteria probiótica libre y encapsulada en la conservación de lactosuero. El cultivo se realizó con la bacteria *Lactobacillus rhamnosus* en lactosuero ácido proveniente de la elaboración de queso Oaxaca. Se tuvieron tres tratamientos: Lactosuero ácido pasteurizado (LAP) como control; Lactosuero ácido pasteurizado e inoculado con la bacteria de *L. rhamnosus* libre (LAPI); Lactosuero ácido con *Lactobacillus rhamnosus* encapsulado emulsiones dobles (LAE), en todos los casos se observaron a los 0, 1, 2, 4, 8, 16, y 32 días a temperatura ambiente ($20^{\circ}\text{C} \pm 2$). Se realizó la caracterización fisicoquímica y microbiológica.

Se observaron concentraciones iniciales de azúcares de (25.86 ± 1.05 g/L) y proteína (62.97 ± 0.99 g/L) en la emulsión debido a la concentración de biomasa, se observó sin embargo en LAP y LAPI concentraciones muy similares pero relativamente bajas en azúcares (9.68 ± 1.2) y (11.29 ± 3.2) incrementando la concentración al final del estudio (12.76 ± 0.9) y (15.98 ± 0.4) g/L respectivamente. Mientras que en proteína en LAP se observaron (4.67 ± 0.17) y en LAPI (4.15 ± 0.02) al final de del estudio de 32 días. La grasa no tuvo cambios al final del tiempo en ningún tratamiento, observando 2% en LAP y LAPI mientras que en emulsiones 7%. La acidez aumentó en todos los tratamientos por la fermentación realizada por los microorganismos, y se vio reflejado en el pH que disminuyó alrededor de una unidad logarítmica. En los resultados de sólidos totales se observó un incremento en los tratamientos de lactosuero pasteurizado y

lactosuero inoculado con *L. rhamnosus*, mientras que en la emulsión se presentó una disminución.

Los resultados mostraron que hubo mayor crecimiento de mesófilos en la emulsión (3.1×10^8 ufc mL⁻¹), sin embargo a los 32 días tuvo un descenso considerable, mientras que en el tratamiento inoculado se observó un ascenso durante el estudio terminando con 1.5×10^8 ufc a los 32 días. En el tratamiento pasteurizado se encontró menor número de microorganismos mostrando una curva de crecimiento al finalizar el estudio (1.8×10^3 ufc mL⁻¹).

Por otro lado el mayor crecimiento de bacterias ácido lácticas en los tratamientos de lactosuero ácido pasteurizado (2.2×10^5 ufc mL⁻¹) y lactosuero ácido pasteurizado inoculado con *L. rhamnosus* (1.05×10^{11} ufc mL⁻¹) se presenta a los 16 días de estudio. Mientras que en la emulsión se observa una cinética de crecimiento ascendente durante el estudio teniendo un alto contenido de microorganismos a los 32 días con 1.9×10^{11} ufc mL⁻¹.

La concentración de los coliformes totales encontrados en este estudio fue mayor en el tratamiento inoculado, esto puede deberse al mal manejo sanitario, siguiendo la emulsión y por último el lactosuero pasteurizado, desapareciendo a los 32 días en los tres casos.

Por lo que se concluye que la inoculación de *L. rhamnosus* influyó positivamente en la conservación del lactosuero a temperatura ambiente y el tiempo óptimo empleado en el tratamiento encapsulado en emulsiones con el *L. rhamnosus* fue a los 32 días para la obtención de la mayor cantidad de bacterias lácticas que puedan actuar como probióticos.

Capítulo 1

Introducción

1. INTRODUCCIÓN

Hoy en día, nuestra sociedad muestra una preocupación debido a la posibilidad que existe entre la relación de nuestra salud y los alimentos que se consumen. Actualmente los alimentos han aparecido en el mercado proporcionando beneficios saludables para todos nosotros, llamados alimentos funcionales o nutraceúticos, los cuales son productos que tienen un futuro bastante prometedor.

No existe una definición universalmente aceptada sobre el concepto de "alimento funcional"; con base a las definiciones emitidas por diferentes autores se sugiere que: "Un alimento funcional es cualquier alimento que en forma natural o procesada contiene sustancias seguras e inocuas ("componentes nutracéuticos") que promueven beneficios a la salud, capacidad física y estado mental, además de cumplir con las necesidades nutricias de crecimiento y mantenimiento, que deben estar incluidos en la dieta" (Wildman, 2001).

Actualmente, los probióticos se han suplementado a diversos productos alimenticios para crear "alimentos funcionales o nutracéuticos" en mercados globales (Stanton y col., 2001) y la principal preocupación es la viabilidad de los microorganismos (Phillips, Kailasapathy y Tran, 2006). Los probióticos se refieren a los microorganismos viables que promueven o soportan un balance benéfico de la población microbiana autóctona del tracto gastrointestinal (Holzapfel, Haberer, Geisen, Björkroth y Schillinger, 2001).

El consumo de productos lácteos conteniendo bacterias probióticas viables se ha incrementado dramáticamente en años recientes debido a que es reconocida la importancia de la flora intestinal en el mantenimiento de la salud y en la prevención de enfermedades (Santosa, Farnworth y Jones, 2006).

La industria láctea nacional presenta dos rasgos importantes, su heterogeneidad y su concentración económica y tecnológica de las grandes empresas. Las empresas familiares, micro y pequeñas no tienen tecnologías viables para el procesamiento del lactosuero que se obtiene por la coagulación de

la leche en la elaboración del queso, por lo tanto el lactosuero es un alimento muy perecedero ya que se fermenta en forma acelerada y ocupa mucho volumen en las queserías, este es vertido como residuo aunque contiene una gran cantidad de nutrientes (Vernon-Carter y Pimentel-González, 2007). En el lactosuero, se encuentran la mayor parte de las sustancias solubles, como la lactosa, las proteínas, las sales minerales y una porción mínima de grasa de la leche. En la actualidad se ha convertido en un problema de gran importancia desde el punto de vista ambiental y de salud pública (Scott, 1991), tan sólo en la región de Tulancingo, Hidalgo, se generan alrededor de medio millón de litros diariamente (Campos, 2007).

Una opción para este subproducto puede ser un mínimo de procesamiento mediante la inoculación por una bacteria láctica para su conservación y darle propiedades nutracéuticos para mejorar las condiciones intestinales.

Lactobacillus rhamnosus es una bacteria ácido láctica (BAL) (Myllyluoma y col., 2005; Otte & Podolsky, 2004) que está dentro del grupo de las bacterias consideradas como probióticas y ha sido ampliamente estudiada por sus propiedades funcionales (Liew, Ariff, Raha y Ho, 2005).

El crecimiento de BAL es afectado por las condiciones de fermentación tales como pH, temperatura, composición del medio y otros factores. Las BAL generalmente tienen limitada capacidad biosintética, requiriendo múltiples aminoácidos y vitaminas para su crecimiento (Tseng & Montville, 1993).

Un método alternativo para proteger a los probióticos es su inclusión en una emulsión agua-en-aceite-en-agua ($W_1/O/W_2$) (Shima y col., 2006). Las emulsiones dobles pueden servir como una cubierta envolvente para encapsular y proteger bacterias probióticas en el tracto gastrointestinal, y pueden ser usadas como unas potenciales biocápsulas para encapsular bacterias para utilización comercial en productos lácteos. El lactosuero a menudo ha sido usado como un agente emulsificante/microencapsulante (Britten & Giroux, 1991; Young y col., 1993).

En el presente trabajo se propone la encapsulación de *Lactobacillus rhamnosus*, bacteria considerada como probiótica atrapada en una emulsión doble $W_1/O/W_2$ como alternativa de “nutracéutico”, comparada con lactosuero ácido inoculado con la misma bacteria y lactosuero pasteurizado, utilizando lactosuero proveniente de la elaboración de queso Oaxaca, mediante cultivos secuenciados en un almacenamiento a temperatura ambiente.

Capítulo 2

Revisión de literatura

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Microorganismos probióticos

Microorganismos es un término amplio aplicado a todos los seres vivos de pequeño tamaño, algunas especies se encuentran presentes en el intestino de los animales y son esenciales ya que ayudan a la digestión de los alimentos (Silva y col., 1998). En los años 90's se empezaba a escuchar el término probiótico al que se le conocía como el conjunto de microorganismos vivos y sustancias secretadas por los mismos que tenían un efecto benéfico en el hospedero (Fuller, 1992). Actualmente se han nombrado a los probióticos como microbios vivos que afectan benéficamente al animal hospedero proveyéndole un mejor balance en los microbios intestinales (Kung, 1999). Los probióticos por consenso internacional, han sido definidos como "microorganismos vivos los cuales cuando son administrados en cantidades adecuadas confieren un beneficio a la salud del huésped (Reid y col., 2003).

Los probióticos son microorganismos vivos, no patógenos, agentes biológicos con un impacto significativo en la composición de la microflora intestinal, tanto cualitativa como cuantitativamente que, además, pueden inhibir el crecimiento de la flora patógena (Tojo y col., 2003). Los nutrientes están presentes en cantidad limitada en el intestino, si las bacterias beneficiosas consumen estos nutrientes necesarios para el desarrollo de agentes patógenos, limitan así su proliferación (Famuralo y col., 1999).

Originalmente los probióticos fueron definidos como "microorganismos que promueven el crecimiento de otros microorganismos" (Lilly & Stillwell, 1965). De acuerdo a la interpretación actual los probióticos se refieren a "microorganismos viables que promueven o soportan un balance benéfico de población autóctona microbiana del tracto gastrointestinal (GI) y deben tener un efecto benéfico en la salud de hombres y animales" (Fuller, 1989; Parker, 1974).

Los microorganismos para ser considerados probióticos deben poseer las siguientes características:

- a) Capacidad para crecer en un medio e incrementar el número de células.
- b) Permanecer viables en liofilizados y congelamiento.
- c) Tolerancia a la acidez del estómago y sales biliares durante su paso por el tracto GI (Gardiner y col., 2002).
- d) Carecer de toxicidad y patogenicidad.
- e) Capacidad de colonizar la mucosa intestinal.
- f) Ejercer una mejora en la salud del huésped; incluyendo protección contra patógenos a través de la exclusión competitiva (Van der Wielen y col., 2002).
- g) Ser resistentes a procesos tecnológicos, almacenamiento, y liberación.
- h) Producir sustancias antimicrobianas.
- i) Modular la respuesta inmune del hospedero.
- j) Modular la bioquímica del hospedero tal como los niveles de colesterol sérico o absorción de minerales.
- k) Producir lactasa, ácidos grasos de cadena corta, o vitaminas (Guarner & Schaafsma, 1998).

La forma más frecuente de consumir probióticos es a través de alimentos lácteos que contienen especies intestinales de lactobacilos y bifidobacterias; por los efectos benéficos adicionales a los nutritivos, estos alimentos se consideran en el grupo de los alimentos funcionales (Palou y Serra, 2000).

Entre los microorganismos comúnmente empleados como probióticos se encuentran las bacterias ácido-lácticas que agrupan una gran cantidad de géneros que incluyen un considerable número de especies de los géneros *Lactobacillus*, *Enterococcus* y *Bifidobacterias* (Tabla 2.1) (Álvarez y Oberhelman, 2001; Macfarlane y cummings, 1999). Las bacterias ácido lácticas (BAL) son organismos Gram-positivos, no esporulados, catalasa-negativos que carecen de citocromos y son anaerobios facultativos o aerotolerantes, exigentes, ácido tolerantes y

estrictamente fermentativos (Axxelson, 1998). Las bacterias Gram-positivas que fermentan el azúcar para producir ácido láctico como principal producto final, viven en materia orgánica en descomposición, así como en la leche y otros productos lácteos (Pearl, 1998). Las BAL son habitantes de la cavidad oral humana, el tracto GI, y la vagina, pueden tener una influencia benéfica en estos ecosistemas humanos y por lo tanto pueden ser candidatas para la aplicación como probióticos (Holzapfel y col., 2001). Por lo que las BAL son las más comúnmente usadas como probióticos (Reuter, 2001).

Tabla 2.1. Microorganismos usados como probióticos.

| <i>Lactobacillus spp.</i> | <i>Bifidobacterium spp.</i> | <i>Lactococcus spp.</i> | <i>Streptococcus spp.</i> | <i>Enterococcus spp.</i> | <i>Bacillus spp.</i> | Otras especies |
|---------------------------|-----------------------------|-------------------------|---------------------------|--------------------------|----------------------|---------------------------------|
| <i>L. acidophilus</i> | <i>B. bifidum</i> | <i>L. lactis</i> | <i>S. thermophilus</i> | <i>E. faecium</i> | <i>B. subtilis</i> | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> |
| <i>L. lactis</i> | <i>B. longum</i> | <i>L. cremoris</i> | <i>S. lactis</i> | <i>E. faecalis</i> | <i>B. coagulans</i> | <i>Saccharomyces boulardii</i> |
| <i>L. bulgaricus</i> | <i>B. infantis</i> | <i>L. diacetilactis</i> | | | | <i>Leuconostoc spp.</i> |
| <i>L. rhamnosus GG</i> | <i>B. breve</i> | | | | | |
| <i>L. casei</i> | <i>B. lactis</i> | | | | | |
| <i>L. kéfir</i> | <i>B. adolescentis</i> | | | | | |
| <i>L. brevis</i> | | | | | | |
| <i>L. reuteri</i> | | | | | | |
| <i>L. helveticus</i> | | | | | | |
| <i>L. plantarum</i> | | | | | | |
| <i>L. johnsonii</i> | | | | | | |
| <i>L. salivarius</i> | | | | | | |

Reuter (1969) estudió los lactobacilos asociados con el tracto GI humano y asumió que los lactobacilos que se encuentran en el tracto GI están representados por 3 grupos: 1) el grupo de *L. acidophilus* incluye cepas de (*L. acidophilus*, *L. gasseri*, *L. crispatus*, y *L. johnsonii*); 2) *Lactobacillus salivarius*; y 3) el grupo de *Lactobacillus casei* (*L. paracasei* y *L. rhamnosus*). Otros organismos que han sido identificados como probióticos incluyen: *Pediococcus acidilactici*, *Enterococcus spp.*, y *Sacharomyces boulardii* (Tamime y col., 2005).

Diversas pruebas realizadas con animales y estudios *invitro* han demostrado que las cepas probióticas ejercen una acción protectora contra la adherencia, la colonización, la reproducción y la acción patógena de agentes enteropatógenos específicos mediante distintos mecanismos de acción que aún

no han sido completamente esclarecidos. Sin embargo entre los mecanismos más significativos (Tabla 2.2) (Brook 1999; Fons y col., 2000) que se han propuesto destacan, la privación a los agentes patógenos de los nutrientes específicos.

Tabla 2.2 Principales mecanismos de acción de los probióticos

| Acción | Mecanismo | Microorganismo |
|---|---|---|
| Prevención de la colonización por microorganismos patógenos | Bloqueo de receptores específicos (adherencia) y competencia por nutrientes | <i>L. rhamnosus</i> GG. <i>L. plantarum</i> , <i>S.bouardii</i> |
| Actividad antimicrobiana | Producción de sustancia con acción | <i>L. rhamnosus</i> GG., <i>S.bouardii</i> |
| Inmunomoduladora | Regulación de la respuesta inmunitaria humeral y celular | <i>L. rhamnosus</i> GG. <i>L. acidophilus</i> , <i>Bifidobacterias</i> spp., <i>L. reuteri</i> |
| Actividad enzimática | Disminución en la actividad de enzimas asociadas con la síntesis de lactosa, pro carcinógenos, etc. | <i>S. thermophilus</i> , <i>Lactobacillus</i> spp. <i>Bifidobacterium</i> spp. |

Los probióticos poseen un futuro brillante en la industria alimentaria, y pueden resumirse los siguientes efectos beneficiosos (Hernández, 2009).

- a) Modulación de la microbiota intestinal.
- b) Mayor resistencia del hospedador a enfermedades infecciosas.
- c) Efecto profiláctico y terapéutico en diarreas.
- d) Atenuación de la intolerancia a la lactosa.
- e) Reducción del colesterol plasmático.
- f) Actividad inmunomoduladora.
- g) Mejora de la enfermedad intestinal inflamatoria.
- h) Mejora de enfermedades atópicas.
- i) Prevención del cáncer.
- j) Empleo de las bacterias lácticas (BAL) como vacunas vivas orales.

k) Empleo de las bacterias lácticas (BAL) como "factorías celulares" de producción de compuestos de interés en la prevención y control de afecciones de las personas.

Las BAL generalmente tienen limitada capacidad biosintética, por lo que requieren de múltiples aminoácidos y vitaminas para su crecimiento (Tseng & Montville, 1993), a menudo suplementadas con constituyentes complejos tales como extracto de levadura. Las bacterias por lo general se reproducen mediante fisión binaria, sin embargo la reproducción se ve afectada por la falta de alimento o la acumulación de productos de desecho (Pearl, 1998.)

En general, las bacterias probióticas crecen mejor en medios sintéticos enriquecidos, tales como los medios de levadura triptosa peptona (por sus siglas en inglés, TPY) y de Man, Rogosa y Sharpe (MRS), en leche (Sha, 2000). No obstante, estos medios son complejos y costosos para la propagación a gran escala de bacterias probióticas.

Las preparaciones de cultivos probióticos en gran escala pueden ser una dificultad y el proceso puede consumir una gran cantidad de tiempo, por su bajo porcentaje de crecimiento en medios basados en leche y sintéticos (Ross y col., 2005). Un medio económico fiable es claramente deseable, con la tendencia a ser inoculado directamente en el producto con cultivos concentrados. El crecimiento microbiano puede medirse en términos de concentración celular (número de células viables por unidad de volumen de cultivo) o de concentración de la biomasa (peso seco de las células por unidad de volumen de cultivo) (Jawetz y col., 1996).

Holzapfel y col. (2001), por medio de análisis de homología de ADN, identificaron *L. acidophilus*, *L. johnsonii*, *L. crispatus*, *L. paracasei*, *L. rhamnosus*, y *L. casei*. en yogures que contenían probióticos y yogures bebibles en Europa. Rodríguez y col. (2008) reportan que los estudios recientes han revelado que los lactobacilos aislados de leche materna poseen un potencial probiótico similar o superior al de ciertas cepas de lactobacilos de gran difusión comercial, como *L. rhamnosus GG*, *L. casei immunitas* o *L. johnsonii La1*.

Entre los productos tipo yogur (Holzapfel y col., 1998), predominan cepas de *L. acidophilus* incluyendo las especies *L. crispatus* y *L. johnsonii*, *L. casei* y *L. paracasei*, y *Bifidobacterium spp.* La incorporación de *L. acidophilus* y *Bifidobacterium spp.* dentro de los cultivos iniciadores del yogur da como resultado un producto lácteo de excelente valor 'terapéutico'. Actualmente, el 11% de todos los yogures vendidos en Francia contienen *Bifidobacterium spp.* (Hughes & Hoover, 1991).

Los productos probióticos vendidos en Estados Unidos son principalmente suplementos preparados como cápsulas, tabletas, polvos, o líquidos (Lin, 2003).

El consumo de productos lácteos que contienen cepas probióticas se ha incrementado dramáticamente en años recientes. Tales productos como yogur (Picot & Lacroix, 2004; Vinderola, y col., 2000), helado (Playne y col., 2003), leche pasteurizada, leche en polvo para bebés (Tamime y col., 1995) y queso (Godward & Kailasapathy, 2003), han sido escogidos como exitosos alimentos acarreadores para microorganismos probióticos.

2.2 Beneficios a la salud asociados con los probióticos

El uso de probióticos se ha convertido en una alternativa beneficiosa para evitar o minimizar el efecto de los antibióticos sobre la flora (Tojo y col., 2003). La administración oral, es la ruta más conveniente de liberación para los probióticos y, estos microorganismos viables son comúnmente adicionados a alimentos, especialmente en productos lácteos (Stanton y col., 1998), que contienen bacterias que se reproducen en el intestino, como los lactobacilos y las bifidobacterias, estos alimentos tienen efectos benéficos adicionales a los de su función nutritiva, por lo que se consideran en el grupo de los llamados alimentos funcionales. El consumo de todos los tipos de leches fermentadas está incrementándose en la mayoría de los países en el mundo, y esto es atribuido a los aspectos nutricionales y de salud asociados con estos productos (IDF, 2002).

Entre algunos de los beneficios de estos alimentos incluye su acción coadyuvante en las enfermedades infecciosas gastrointestinales, también en enfermedades crónicas intestinales como la colitis ulcerosa; actúan como inmunomoduladores, favorecen al tratamiento de algunas enfermedades cardiovasculares, la diabetes mellitus no inmunodependiente, en el manejo de personas obesas, la osteoporosis y el cáncer (Birujete y col., 2009). Los efectos en el intestino se deben a su acción directa o indirecta en la regulación de la microflora intestinal y en su aparente acción en la respuesta inmunológica. Una barrera estable, típica de individuos saludables, asegura al hospedero protección y sirve como soporte para la función intestinal normal y resistencia inmunológica (Holzapfel & Schillinger, 2002). La adhesión y colonización (aunque transitoria) de bacterias probióticas en el tracto GI del huésped llega a ser una de las características esenciales requeridas para mostrar sus efectos benéficos (Bernet y col., 1994). Entre las bacterias responsables de los efectos ya mencionados se encuentran las llamadas bacterias ácido-lácticas, como: *Lactobacillus acidophilus*, *L. plantarum*, *L. casei*, *L. casei spp rhamnosus*, *L. delbrueckii spp lactis*, *Lactococcus lactis spp cremoris*, *Bifidobacterium bifidum*, *B infantis*, *B. acidolecentis*, *B. longum*, *B.breve*, *Enterococcus faecalis* y *enterococcus faecium* (Birujete y col., 2009). Un epitelio intestinal saludable, en asociación con una flora intestinal óptima, proporciona una barrera vital contra la invasión de microorganismos patógenos, antígenos y compuestos perjudiciales del lumen intestinal.

Un estudio sugiere que la administración de lactobacilos a pacientes con colon irritable mejora su estado clínico, con una disminución del dolor y la distensión abdominal (Tojo, 2003). Las cepas con la historia probablemente más larga de proveer beneficios a la salud y seguridad de uso son la cepa *L. casei Shirota* y algunas cepas del grupo *L. acidophilus* (Holzapfel y col., 2001).

Holzapfel y col., (1998), han sugerido los siguientes beneficios nutricionales para las bacterias probióticas:

- a) Producción de vitaminas, disponibilidad de minerales y elementos traza y producción de importantes enzimas digestivas (e. g. β -galactosidasa).
- b) Efectos barrera/restauración: diarrea infecciosa (diarrea del viajero, diarrea aguda viral de niños), diarrea asociada a antibióticos, diarrea asociada con irradiación.
- c) Efectos de niveles bajos de colesterol.
- d) Estimulación del sistema inmune.
- e) Mejora de la motilidad intestinal/alivio de la constipación.
- f) Resistencia a la adherencia y colonización.
- g) Mantenimiento de la circulación y nutrición de la mucosa.

El tránsito intestinal lento es un problema general de las personas mayores. Diversos estudios sugieren que los probióticos mejoran parcialmente la motilidad intestinal y reducen la actividad enzimática fecal en las personas mayores (Amores y col., 2004). Los efectos inhibitorios de los probióticos por encima de los patógenos podría ser debido a su competencia por adherencia y colonización en la superficie del tracto GI y liberación de sustancias antimicrobianas tales como bacteriocinas, peróxido de hidrógeno, y ácidos grasos de cadena corta (Lin, 2003). Los probióticos también pueden mostrar su efecto en el sistema inmune por prevenir el paso de un antígeno a través del epitelio. También aumentan la actividad fagocítica de leucocitos (Gill y col., 2001), mejoran la producción de inmunoglobulina A (Marteau y col., 2001), por lo cual se incrementa la barrera inmunológica intestinal. La importancia de la microflora colónica en la fisiología humana y el metabolismo está siendo reconocida cada vez más (Macfarlane & Cummings, 2002). Esto es, en parte, a los recientes avances en técnicas de biología molecular para estudiar la composición y las actividades de la microflora normal, tales como, por ejemplo, secuencia del gen del 16S rRNA (Hold y col., 2002). Estos desarrollos han arrojado más esquemas sistemáticos de la taxonomía de potenciales microorganismos probióticos como

los lactobacilos (Reid y col., 2002). Por otro lado, debido a la deficiencia de lactasa, una gran proporción de población adulta del mundo sufre de síntomas como flatulencia, dolor abdominal, y diarrea. Si altas concentraciones de lactasa están presentes en el producto, las personas intolerantes a la lactosa pueden consumir productos lácteos sin advertir síntomas. Los clásicos cultivos bacterianos iniciadores están bien adaptados a la leche como sustrato y pueden fermentar lactosa más efectivamente que la mayoría de las cepas probióticas. Su sensibilidad a las condiciones intestinales (altas concentraciones de sales biliares) parece que resultan en la permeabilización y la liberación de la lactasa intracelular (Sanders, 1994). Con respecto a las cepas probióticas, esta hipótesis aun parece ser controversial (Hove y col., 1994).

La mínima dosis diaria y la duración requerida para producir un efecto benéfico en la salud están afectadas por factores incluyendo especie/cepa del microorganismo, la forma de preparación, el tipo de beneficio, y las condiciones de salud del hospedero. En suma, los probióticos difieren en sus propiedades tales como resistencia al ácido, adherencia al tracto GI, colonización, producción de bacteriocinas, etc. (Lin, 2003).

Se ha demostrado la inhibición de la adherencia de patógenos y actividad bacteriana utilizando un cultivo de la línea celular Caco-2 en un modelo *in vitro*, tras la administración de *Lactobacillus casei rhamnosus* (Lcr35) (Forestier y col., 2001).

El uso de probióticos se le atribuyen numerosos efectos saludables y son muchos los trabajos que demuestran los beneficios de estos para la salud humana (tabla 2.3) (Chandan, 1990; Saarela y col., 2000).

Ferrer y Dalmau (2001), demostraron que la administración de *Lactobacillus rhamnosus* a un grupo de niños desnutridos disminuye la incidencia de diarrea, aunque este efecto no se obtiene si los pacientes están alimentados con leche materna. La administración de probióticos (*L. bulgaricus*, *B. longum*, *S.*

thermophilus) también parece tener importantes beneficios en la absorción de minerales, en la síntesis de ácido fólico, de vitamina B6 y B12 y en su biodisponibilidad, al favorecer la hidrólisis de proteínas y grasas (Kopp-Hoolihan, 2001). Favorece también la producción de ácidos grasos de cadena corta con funciones energética, de integridad y función de la mucosa colónica y mantenimiento de pH adecuado en el marco colónico, que es crítico en la expresión de las enzimas bacterianas y el metabolismo de carcinógenos (Tojo y col., 2003).

Tabla 2.3. Principales microorganismos probióticos y algunos de sus efectos benéficos para la salud.

| Microorganismos | Efecto benéficos |
|---|---|
| <i>L. acidophilus</i> LCI <i>L. acidophilus</i> NCFCO1748 | Equilibrio flora intestinal, efecto en sistema inmunitario. Reducción actividad enzimática pro cancerígenas, diarrea y constipación. |
| <i>L. acidophilus</i> NCFM <i>L. jonsonii</i> LAI <i>L. rhamnosus</i> GG <i>L. bulgaricus</i> <i>L. casei</i> | Reducción actividad enzimática pro cancerígenas. Inmunoestimulador, tratamiento de gastritis y úlceras. Inmunoestimulador, diarrea, inflamación del intestino. Inmunoestimulador, adsorción de lactosa. Promotor del crecimiento y de la viabilidad de probióticos. |
| <i>B bifidum</i> <i>S. thermophilus</i> <i>S. Boulardii</i> | Diarrea por rotavirus, equilibrio de la microbiota. Inmunoestimulador, absorción de lactosa. Prevención de diarrea y tratamiento de colitis. |

En estudios recientes en humanos y animales, hipercolesterolémicos, la ingesta de probióticos como *L. reuteri*, *L. sporogenes*, *S. thermophilus* y *E. faecium* demuestra un descenso significativo de los valores de colesterol total (CT), colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad (cLDL), lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) y triglicéridos (Tg) y un incremento del colesterol unido a lipoproteínas de alta densidad (cHDL), de la razón HDL/cLDL y del fibrinógeno (Jackson y col., 1999; De Roos y Katan., 2000). La administración de *L. helveticus* y *S. cerevisiae* parece reducir la presión arterial sistólica y diastólica. En consecuencia, el consumo regular de probióticos y prebióticos puede proporcionar

un modesto efecto profiláctico contra la enfermedad cardíaca (Kopp-Hoolihan, 2001; Oxman y col., 2001).

2.3 *Lactobacillus rhamnosus* y sus efectos como probiótico.

El género *Lactobacillus* está constituido por bacilos Gram-positivos no esporulados, clasificados en la familia *lactobacillaceae*. Los lactobacilos están distribuidos en la naturaleza y son ubicados en los seres humanos. Habitan en la boca, el tracto gastrointestinal, la vagina y otros sitios (Konema y col., 1989).

L. rhamnosus es un anaerobio facultativo, heterofermentativo, que bajo condiciones anaerobias produce L (+) ácido láctico y etanol (Narayanan y col., 2004). El uso de cepas de *L. rhamnosus* se ha incrementado en los últimos años debido a que han mostrado efecto probiótico (Schillinger, 1999). Los probióticos actúan como posibles mecanismos protectores que podrían incluir la inhibición del crecimiento y adhesión de patógenos (McCracken & Gaskins, 1999). *Lactobacillus casei rhamnosus* (Lcr 35) es un buen ejemplo de la eficacia de los probióticos contra la colonización y crecimiento de patógenos en el tracto gastrointestinal, ya que inhibe la adherencia del *E. coli* enteropatógeno (EPEC), *E. coli* enterotoxigénico (ETEC) y *Klebsiella pneumoniae* a la mucosa intestinal, y presenta una actividad antibacteriana con inhibición del crecimiento de *K. pneumoniae*, *Shigella flexneri*, *Salmonella typhimurium*, *Enterobacter cloacae*, *Pseudomona aeruginosa*, *Enterococcus faecalis* y *Clostridium difficile*³⁴. Se ha demostrado una distinta adherencia de las diferentes cepas comerciales de probióticos a la mucosa intestinal, desplazando a los patógenos (Tojo y col., 2003). *L. rhamnosus* ATCC 7469 ha sido reportada por exhibir actividad protectora contra infecciones de *Escherichia coli* (Saito y col., 1980). Forestier y col., (2001), encontraron efectos inhibitorios de *L. rhamnosus* (Lcr35) en la adherencia de tres patógenos, la cepa enteropatógena *Escherichia coli*, la cepa entero-tóxica *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*.

Gopal y col., (2001) investigaron el efecto inhibitorio de *L. rhamnosus* contra la colonización intestinal de la cepa entero-tóxica *Escherichia coli* (cepa O157:H7), y demostraron que los microorganismos de *E. coli* fueron reducidos por las moléculas inhibitorias secretadas en el medio por la bacteria probiótica, sugiriendo que la inhibición puede ser debido a la acción sinergista del ácido láctico y sustancias proteínicas.

Al probiótico *L. rhamnosus* GG (ATCC 53103) le ha sido encontrado un beneficio como suplemento en el tratamiento en la erradicación de *Helicobacter pylori* (Armuzzi y col., 2001) y *L. rhamnosus* LC705 ha mostrado también efectos anti-patogénicos (Hatakka y col., 2007).

Reid (1999) reportó que *L. rhamnosus* GR-1 es un agente probiótico que es eficaz en el tratamiento y prevención de infecciones urogenitales en mujeres. Los efectos de cepas de probióticos de *Lactobacillus GG*, *L. rhamnosus* y *Shirota de L. casei (L. paracasei)* en el sistema inmune humano y en diarrea están documentados, e. g., por contrarrestar rotavirus o diarrea asociada a antibióticos (Salminen, 1996). En estudios realizados en niños de 1 a 6 años que asisten a guarderías se demuestra que los niños que reciben leches con *Lactobacillus rhamnosus* GG presentan menor ausentismo escolar por enfermedad ($p < 0,05$), incidencia de infecciones respiratorias ($p < 0,05$) y utilización de antibióticos ($p < 0,05$) que los niños que reciben leche sin suplementar con probióticos (Hatakka y col., 2001). Así, la administración oral de *L. rhamnosus* GR-1, que coloniza el intestino y la vagina, y *L. fermentum* RC-14 es eficaz en la protección contra la infección del tracto urogenital por *E. coli* y *Enterococcus faecalis*, al disminuir la adhesión de los patógenos a las células uroepiteliales, competir por sus receptores y aumentar la producción de inhibidores del crecimiento de éstos (Reid, 2001).

2.4 Productos nutracéuticos

Algunos trabajos científicos han puesto de relieve que ciertos ingredientes naturales de los alimentos proporcionan beneficios y resultan extraordinariamente útiles para la prevención de enfermedades e incluso para su tratamiento terapéutico (Bello, 2000). Los productos o suplementos alimenticios y preparaciones farmacéuticas que contienen cepas probióticas viables son suministrados en el mercado como alimentos fermentados o en forma liofilizada.

La relación entre dieta y enfermedad no es algo nuevo, por lo que es importante resaltar el lugar que ocupan los alimentos nutracéuticos.

Los nutracéuticos son sustancias biológicas extraídas de fuentes naturales, que se caracterizan mediante procesos biotecnológicos anti desnaturalizantes conservando sus propiedades originales sin hacer algún tipo de manipulación química, cuando sus propiedades han sido documentadas, se comercializan para consumo por humanos como complementos nutricionales, sin sustituir la dieta diaria (Birute y col. 2009).

La Fundación para la Innovación en Medicina de los EE.UU. fue la primera institución científica que utilizó en 1989 el nombre de nutracéuticos al definir a estos productos como «*cualquier sustancia* que una vez ingerida produce efectos beneficiosos en la salud, incluidas la prevención y el tratamiento de enfermedades» (Sanz, 2009).

Los nutracéuticos no son nutrientes asociados con deficiencias en la dieta, sin embargo, son compuestos cuyo consumo ha sido asociado con la prevención y el tratamiento de enfermedades (Hernández y Serna 2003).

Según Hasler (2000) algunos ejemplos de nutracéuticos (componentes de alimentos funcionales) son: **carotenoides** (Beta caroteno, luteína, licopeno), **Fibras dietéticas** (fibra insoluble, Beta glucano), **ácidos grasos** (omega 3, ácido graso DHA, ácido linoléico), **flavonoides** (catequinas, flavonas), **esteroles vegetales** (ester estanol), **prebióticos/probióticos** (fructooligosacáridos, lactobacilos), **fitoestrógenos** (isoflavonas).

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

En 1995 el Consejo Internacional de Información Alimentaria de los EE.UU. redefinió a los nutraceuticos como «*alimentos* que contienen niveles significativos de compuestos biológicamente activos que debidamente consumidos producen efectos beneficiosos nutritivos ». Psczola en 1999 dió una definición, mucho más concreta, al decir que son «*productos alimenticios* de cuyos ingredientes forman parte fotoquímicos, extractos vegetales, vitaminas y minerales que se destinan a conservar o mejorar la salud».

México, debido a su alta biodiversidad y gran gama de alimentos autóctonos o tradicionales, puede ser un importante proveedor de nuevos alimentos nutraceuticos. Los conquistadores españoles al llegar a Mesoamérica se encontraron con una gran variedad de nuevos alimentos (diferentes tipos de maíz, amaranto, aguacate, zapote, hierbas medicinales, etcétera); algunos fueron gradualmente incorporados a sus dietas de tal manera que hoy se consideran como alimentos universales. Sin embargo, muchos productos típicos son todavía desconocidos y únicamente explotados por diversos grupos étnicos del país por lo que representan una oportunidad importante como nuevas fuentes de aditivos nutraceuticos (Hernández y Serna 2003).

Shahidi (2002) describe a los nutraceuticos como «*productos alimenticios industriales*, elaborados a partir de alimentos naturales y/o de sustancias diversas de carácter no alimenticio, que se consumen como píldoras, cápsulas, caramelos, chicles, chocolatinas, galletas, chupa-chups, bebidas refrescantes y nutritivas, que se piensa que son beneficiosas para la salud».

Los nutraceuticos persiguen la prevención o curación de alguna enfermedad o alteración metabólica. Son los que llaman en Japón *Foshu* o «alimentos con aplicaciones sanitarias específicas».

Es así como el concepto de alimento nutracéutico ha sido recientemente reconocido como "aquel suplemento dietético que proporciona una forma concentrada de un agente presumiblemente bioactivo de un alimento, presentado en una matriz no alimenticia (píldoras, capsulas, polvo, etc.) y utilizado para incrementar la salud en dosis que exceden aquellas que pudieran ser obtenidas del alimento normal" (Zeisel, 1999).

2.5 Alimentos Funcionales

Aunque la relación entre la dieta y la salud fue reconocida por la medicina china hacia el año 1,000 A.C., Hipócrates, médico griego del siglo V-VI a.C, dejó en su legado una frase mítica: "Que el alimento sea tu medicina y la medicina tu alimento" (Astiasarán y Martínez, 1999). Por lo que situados en el siglo XXI, ésta filosofía del "alimento como medicina" es la base del paradigma de los *alimentos funcionales*. Actualmente existen muchos alimentos funcionales en el mundo (Hasler, 2000).

El término Alimento Funcional fue propuesto por vez primera en la década de los 80's en Japón con la publicación de la reglamentación de los "Alimentos para uso específico de salud" ("Foods for specified health use" o FOSHU) y que se refiere a aquellos alimentos procesados, los cuales contienen ingredientes que desempeñan un efecto específico en las funciones fisiológicas del organismo humano, más allá de su contenido nutricional. Hay sólo dos definiciones para alimentos saludables que son reconocidos por la ley japonesa: FOSHU (alimentos para uso específico en salud) y FNFC por sus siglas en inglés (food with nutrient functional claims) (alimentos con mensajes de nutrientes funcionales). Los alimentos o suplementos dietéticos que no pertenecen a estas categorías son denominados por ley simplemente "alimentos", sin importar su forma, contenido o función (Palou y Serra 2000).

En Europa se define alimento funcional a "aquel que satisfactoriamente ha demostrado afectar benéficamente una o más funciones específicas en el cuerpo, más allá de los efectos nutricionales adecuados en una forma que resulta relevante para el estado de bienestar y salud o la reducción de riesgo de una enfermedad" (Roberfroid, 2000). Es así que en Europa se utilizan rótulos que indican "Valor aumentado", así como en Alemania se comercializan golosinas adicionadas con vitamina Q10 y vitamina E. En Italia las góndolas de los supermercados ofrecen yogures con omega 3 y vitaminas; Francia ofrece azúcar adicionada con fructo-oligosacaridos para fomentar el desarrollo de la flora benéfica intestinal (Bello, 1995).

En general, se define que los alimentos deben tener tres funciones: la primera es "nutricional", esencial para la supervivencia del individuo. La segunda es una función "sensorial", esto es que su consumo produzca una sensación placentera a partir de su sabor, olor, textura, entre otras. La tercera es una función "fisiológica" con lo cual el alimento debe producir un efecto favorable en la nutrición, el biorritmo, el sistema nervioso, en la capacidad de defensa corporal, entre otras, de quien lo consume. En el concepto japonés, los alimentos funcionales deberían enmarcarse precisamente en esta última función (Durán y Valenzuela, 2010).

Aunque el término alimentos funcionales no es una categoría de alimento legalmente reconocida por la Administración de alimentos y Drogas (FDA) de los Estados Unidos, recientemente sucedieron algunos cambios legislativos acerca de la información que deben contener las etiquetas de los productos relacionados con beneficios funcionales de los alimentos. Las regulaciones en la NLEA (Ley de Etiquetado y Regulación Nutricional) y de la DSHEA (Ley de Suplementos Dietéticos Salud y Educación) se encaminan a preparar el camino legal en que se debe fundamentar el uso de estos productos (Vasconcellos, 2000). Por lo que la posición oficial de la U.S. Food & Drugs Administration (FDA) es: "Las sustancias específicas de los alimentos pueden favorecer la salud como parte de una dieta variada" (Bello 1995).

Shahidi en 2002, añade una definición más concreta «Alimentos funcionales son todos aquellos que, además de proporcionar nutrientes y energía, aportan otros beneficios al mejorar la salud y prevenir ciertas enfermedades crónicas degenerativas, especialmente las cardiovasculares, cáncer, diabetes, desórdenes autoinmunes, artritis y otras».

En México, aunque el término de alimentos funcionales se utiliza familiarmente entre la comunidad científica, a la fecha no hay leyes que reglamenten específicamente el uso de estos alimentos.

En los países occidentales la historia de este tipo de alimentos se remonta a las primeras prácticas de fortificación con vitaminas y minerales, así como también a la práctica de incluir ciertos componentes en los alimentos procesados con el objeto de complementar alguna deficiencia de la población. La búsqueda de terapias alternas para algunas enfermedades, el envejecimiento de la población mundial, los avances en la tecnología, así como los cambios reglamentarios de diversos países han provocado un gran interés en el desarrollo de los alimentos funcionales alrededor del mundo.

Actualmente una categoría de alimento funcional de mucha relevancia es la de los denominados alimentos probióticos y los más utilizados sin lugar a duda son las bacterias formadoras de ácido láctico (Tomasik y Tomasik, 2003).

2.6 Micro encapsulación de microorganismos probióticos.

Las bacterias probióticas presentan un crecimiento pobre en la fermentación de leche debido la baja concentración de aminoácidos libres y péptidos pequeños, los cuales son insuficientes para soportar el crecimiento de estos microorganismos. Por lo tanto, adicionando caseína o hidrolizados de proteína de suero, extracto de levadura, glucosa y vitaminas puede mejorar el crecimiento de probióticos en leche (Desai, 2004). Para mejorar la sobrevivencia de microorganismos probióticos la adición de proteína de leche incrementa la

capacidad amortiguadora de leches fermentadas (Tamime y col., 2005). Ha sido investigada la protección de probióticos por micro encapsulación en glóbulos de hidrocoloides para mejorar la viabilidad en productos alimenticios y en el tracto GI (Rao y col., 1989).

Como un medio de protección de células vivas en condiciones extremas de calor, humedad, o condiciones del tracto GI, ha sido usada la micro encapsulación, técnica que está incrementando su uso en la industria alimentaria con probióticos (O’Riordan y col., 2001). Esta técnica permite que un núcleo con un ingrediente activo, o sustrato, sea separado de su ambiente por una película protectora o cubierta, esta separación ocurre hasta que la liberación del ingrediente funcional es deseada. La micro encapsulación ofrece protección en forma de partículas finas para la incorporación de probióticos dentro de los productos alimenticios (Ross y col., 2005).

La micro encapsulación de probióticos ha sido una práctica común que ha permitido una forma de uso. Existen varias técnicas de encapsulación entre las que se mencionan: gelificación, secado por aspersion, extrusión, separación de fases y emulsiones (Khalil & Mansour, 1998; Sultana y col., 2000; Siuta-Cruce & Goulet, 2001; Kaisalapathy, 2002; Hou y col., 2003).

2.7 Emulsiones, emulsificante y estabilizante

Las emulsiones son sistemas dispersos termodinámicamente inestables constituidos por al menos dos componentes inmiscibles entre sí, estando uno de ellos disperso dentro del otro en forma de gotas estabilizadas por un tensoactivo (Becher, 1965) las cuales suelen llamarse emulsiones simples, donde se encuentra una fase dispersa y otra continua, por ejemplo agua y aceite. Hay dos tipos de emulsiones simples dependiendo de cuál sea la fase dispersa o continúa: aceite en agua (O/W) y agua en aceite (W/O) (Charcosset y col., 2004; McClements,

1999). La inversión de fases sucede cuando una emulsión O/W es convertida en una emulsión W/O o viceversa (Garti y Aserín, 1996).

Las emulsiones se formulan con dos ingredientes: el agente emulsificante y estabilizante. El agente emulsificante conocido como surfactante (Kobayashi y col., 2002) es una mezcla de agentes químicos que promueven la formación de la emulsión en un corto periodo de estabilización por la acción interfacial; y el agente estabilizante, es un compuesto único (o mezcla) que confiere un largo periodo de estabilidad en la emulsión por mecanismo de adsorción, aunque, no en todos los casos (Dickinson, 2011).

Un surfactante por definición es una molécula anfifílica que tiene una “cabeza” con un grupo hidrofílico, con alta afinidad por el agua, gracias a la presencia de una cadena poliéter del tipo polióxido de etileno y una “cola” con un grupo lipofílico con alta afinidad por el aceite (Hasenhuettl, 1997) que consta de una o más cadenas hidrocarbonadas de entre 10 y 20 átomos de carbono (Bergensstahl, 1997). En las pequeñas moléculas de surfactantes las colas hidrocarbonadas se proyectan dentro de la fase oleosa, mientras que, la cabeza del grupo hidrofílico se proyecta dentro de la fase acuosa. Para una buena estabilización estérica se necesita que se adsorba fuertemente en el polímero una pequeña fracción hidrofóbica (para mantener a la macromolécula permanentemente fija a la superficie) y la fracción mayoritaria de un segmento hidrofílico no adsorbido (para proveer una capa protectora y espesar el medio (Garti, 1997). Los surfactantes reducen la tensión superficial entre el aceite y el agua lo cual facilita la distribución de los glóbulos y estabilizan los glóbulos en contra de la coalescencia y/o agregación. Por lo tanto los emulsificantes, tienen propiedades espesantes, que sirven para incrementar la viscosidad de la fase continua de la emulsión y refuerzan la estabilidad retardando el movimiento de los glóbulos (McClements, 1999).

El fenómeno de agregación de glóbulos mostrados en la floculación depende de varios factores tales como cobertura de la superficie de los glóbulos por un polímero, espesor de la capa, densidad de la carga superficial, y las

condiciones de la solución acuosa (especialmente pH, la fuerza iónica, y el contenido de iones divalentes) y se puede presentar cuando dos o más glóbulos forman un conglomerado conservando su integridad individual; y la coalescencia tiene lugar cuando al chocar dos o más glóbulos se fusionan generando un glóbulo de mayor tamaño. Cuando una emulsión contiene glóbulos pequeños usualmente tiene mayor vida de anaquel (estabilidad cinética más grande) que una que contenga glóbulos grandes, aunque sea más inestable termodinámicamente (porque tiene un área interfacial mayor) (McClements, 1999).

Para causar agregación de los glóbulos las fuerzas de Van der Waals son suficientemente fuertes, excepto si existe una fuerte interacción repulsiva que prevenga el acercamiento de los glóbulos (McClements, 1999). Cuando los glóbulos de una emulsión están rodeados por una capa de moléculas de emulsificante eléctricamente cargadas (biopolímeros), los glóbulos se estabilizan contra la agregación por la repulsión electrostática. Por lo tanto es necesario evaluar los materiales de pared a utilizar para que tenga efecto la protección por encapsulación (Krasaekoopt y col., 2003).

Las emulsiones son sistemas termodinámicamente inestables, aunque pueden existir en estado meta estable y por lo tanto ser cinéticamente estables. Una emulsión cinéticamente estable (meta estable) es aquella en la que no se presentan cambios marcados en su estado de agregación o en la distribución del tamaño de los glóbulos y/o el arreglo espacial en la escala del tiempo de observación. Esta escala de tiempo puede variar de horas a meses dependiendo de la situación (Dickinson, 2003). A pesar del hecho de que las emulsiones existen en un estado termodinámicamente inestable, muchas de ellas permanecen cinéticamente estables (meta estables) por meses o incluso años. El cambio de energía libre asociada con la formación de la emulsión determina si una emulsión es o no termodinámicamente estable, pero no indica la velocidad con la que las propiedades de una emulsión cambian a través del tiempo, tampoco los mecanismos físicos responsables de estos cambios, ni el tipo de cambios que pueden ocurrir. En cuanto a los mecanismos de inestabilidad química en una

emulsión simple, se pueden dar debido a la oxidación y la hidrólisis de los componentes. Así también existe una variedad de mecanismos fisicoquímicos reconocidos como los responsables de las alteraciones en las propiedades de la emulsión o en la inestabilidad de una emulsión simple. Al emplear emulsificantes previo a la homogenización se pueden obtener emulsiones cinéticamente meta estables de mediano o largo plazo. Durante la homogenización los emulsificantes son adsorbidos en la superficie de los glóbulos debido a que son moléculas con actividad superficial formando una membrana protectora que previene la agregación de los glóbulos y además disminuyen la tensión superficial en la interface. Lo que dificulta obtener una emulsión cinéticamente estable es que puedan presentarse más de uno de los mecanismos de inestabilidad de manera simultánea en una emulsión simple. Las propiedades fisicoquímicas de la emulsión se ven afectadas debido a que el contacto entre moléculas de agua y aceite no es favorable termodinámicamente, es decir, ocurren movimientos e interacciones continuas en el tiempo (son altamente dinámicas) por ello las emulsiones son sistemas inestables (Dickinson, 2003). La estabilidad cinética de una emulsión puede atribuirse a la presencia de una barrera; esto es, una emulsión que es cinéticamente estable debe tener una energía de activación (G^*) significativamente más grande que la energía térmica del sistema (kT). Otros factores importante en la estabilidad de la emulsión son: pH (el óptimo es de 4 a 8); resistencia a altas fuerzas de corte; presencia de sales o cationes solubles; tamaño de partícula, tamaño muy grande de gota de aceite. Cuando la suspensión del aceite en agua se dificulte, el tamaño de la gota de aceite puede ser disminuido incrementando el tiempo de mezclado, utilizando agitación moderada cuando se está preparando la emulsión. Además también tiene influencia el método de emulsificación; el tipo y concentración de emulsificante, la temperatura y la viscosidad (Dickinson, 2011).

Las emulsiones dobles son los sistemas con una emulsión simple como fase dispersa, donde la fase interna y externa son parecidas químicamente y una fase inmiscible intermedia separa físicamente las dos fases parecidas (Dickinson,

2011) ejemplo, agua-en-aceite-en-agua (por sus siglas en inglés, water-in-oil-in-water, $W_1/O/W_2$) o aceite-en-agua-en-aceite ($O_1/W/O_2$). Debido a su membrana oleosa que separa dos fases acuosas las emulsiones dobles $W_1/O/W_2$ pueden ser consideradas como sistemas de membranas líquidas (Tokgoz y col., 1996). Las emulsiones dobles se pueden formar por emulsificación de una o dos etapas. En la primera etapa, una emulsión W/O se prepara empleando un exceso de emulsificante lipofílico, y aplicando una fuerte homogenización, para formar las gotas o glóbulos más pequeños posibles. La importancia de los efectos cinéticos se destaca al comparar la estabilidad a largo plazo de las emulsiones con la misma composición pero con diferentes tamaños de glóbulos. En la segunda etapa, una emulsión doble $W_1/O/W_2$ se forma por la adición de una emulsión W/O al agua, en la cual, un emulsificante hidrofílico ha sido disuelto. Una emulsión $W_1/O/W_2$ estabilizada por emulsificantes monoméricos consta de glóbulos internos de la emulsión W/O con un tamaño de 0.5-2 μm y la doble (fase externa) de 10–60 μm . En la emulsión doble, los mecanismos de inestabilidad ocurren en la emulsión primaria y en la doble, por lo que la probabilidad de que sea una emulsión estable se minimiza. Varios estudios han analizado los posibles mecanismos de inestabilidad de las emulsiones dobles (Florence & Whitehill, 1981; Geiger y col., 1998). Las emulsiones dobles al ser más inestables, en algún momento, se invierten en emulsiones simples (Matsumoto, 1987). Por lo que el rompimiento de la emulsión en este caso, se lleva a cabo en dos procesos: agregación y rompimiento de las gotas múltiples. Este fenómeno se explica por la presencia de un gradiente osmótico entre los dos lados de la capa oleosa, lo cual causa el hinchamiento de las gotas internas de agua, las cuales llegan a romper la capa oleosa resultando en la unificación de la fase acuosa interna y externa. Sin embargo las relaciones cuantitativas de los componentes más importantes aún no están definidas (concentración del primer emulsificante) y la estabilidad de estos sistemas (Csóka & Erős, 1997). La formación y estabilidad de las emulsiones dobles $W_1/O/W_2$ son principalmente influenciadas por dos factores: (I) la estructura de la interface agua/aceite y su saturación por el emulsificante; y (II) el número de

las gotas múltiples y las posibles interacciones entre ellas lo cual fue confirmado por Erős y col. (1990).

Las relaciones de fracción volumétrica (k) entre la emulsión primaria (W1/O) con la emulsión doble (W1/O/W2) para obtener un sistema estable se encuentran entre 0.2 a 0.5 μm (Dickinson & McClements, 1996); la relación de agente emulsificante hidrofílico-lipofílico debe encontrarse entre 2-20 μm para obtener el mejor rendimiento (Sholmo y col., 1984); el tamaño de partícula de la emulsión W1/O debe ser muy pequeño (0.5-2 μm) y entre más pequeño mayor estabilidad; el tamaño de partícula de la emulsión doble W1/O/W2 en relación a la emulsión primaria W1/O debe ser sustancialmente mayor (10-60 μm) de otro modo con lleva a la inversión de fases de la emulsión doble (Garti & Aserín, 1996).

Lo que implica el uso de muy bajas concentraciones de agente surfactante en la fase acuosa externa (ya que a mayor concentración menor tamaño de partícula) y bajas velocidades de agitación, sin embargo estos resultados están en contraposición con las características para la obtención de emulsiones dobles estables, que involucran el uso de biopolímeros como material de pared en muy altas concentraciones. Por lo tanto para permitir una emulsión doble W1/O/W2 se recomienda el uso de una mezcla de un surfactante lipofílico en la fase oleosa y un polímero hidrofílico en la fase acuosa externa. Los mecanismos de inestabilidad en una emulsión tanto simple como doble, son influenciados por la concentración de los emulsificantes en las fase acuosa, y en mayor grado, por la concentración del emulsificante liposoluble, la naturaleza y viscosidad de la fase oleosa, naturaleza y concentración de los ingredientes que se encapsulan en la fase acuosa interna, o de aquellos que se piensan separar en la fase acuosa externa, así como la adsorción de moléculas en las interfaces. La fase acuosa puede contener una variedad de ingredientes solubles en agua, incluyendo azúcares, sales, ácidos, bases, surfactantes, proteínas y carbohidratos. La fase oleosa usualmente contiene una mezcla compleja de compuestos solubles en lípidos, como triacilglicerol, ácidos grasos libres, esterol, y vitaminas y la región interfacial puede contener una mezcla de varios compuestos con actividad

superficial, incluyendo proteínas, fosfolípidos, surfactantes, alcoholes y partículas sólidas. Por lo que todos estos componentes pueden formar varios tipos de entidades estructurales en el aceite, agua, o regiones interfaciales, tales como cristales grasos, cristales de hielo, agregados proteínicos, burbujas de aire, cristales líquidos y micelas de surfactante.

La formación de emulsiones estables se ha favorecido con el uso de sustancias macromoleculares tales como gomas, proteínas y polímeros sintéticos (Garti, 1997). Los biopolímeros más importantes usados como ingredientes en las emulsiones son las proteínas y los polisacáridos (Damodaran, 1996). Las emulsiones son estabilizadas por proteínas en parte por razones nutrimentales y también debido a la naturaleza altamente funcional, lo que las hace buenos surfactantes y agentes estabilizantes contra la floculación o coalescencia de las gotas de la emulsión durante el almacenamiento (Dalglish, 1996; Hunt & Dalglish, 1994). La capacidad de las proteínas de generar interacciones repulsivas (e. g. estéricas y electrostáticas) entre glóbulos de aceite y formar una membrana interfacial que es resistente a la ruptura, juega un rol importante en la estabilidad de los glóbulos contra la floculación y la coalescencia, durante largos periodos de almacenamiento (Wilde y col., 2004).

La información acerca de la dependencia del tiempo en la estabilidad de la emulsión es particularmente importante para los científicos en alimentos quienes necesitan crear productos alimentarios que retengan sus propiedades deseables por un tiempo suficientemente largo bajo una variedad de diferentes condiciones ambientales. Por esta razón, los investigadores se interesan más en la estabilidad cinética de las emulsiones, que en su estabilidad termodinámica (McClements, 1999). Por lo tanto las emulsiones dobles $W_1/O/W_2$ han sido empleadas como vehículos potenciales para medicinas, sin embargo se pueden aplicar en materiales alimenticios funcionales, donde los materiales son depositados en la fase acuosa interna de la emulsión $W_1/O/W_2$ para prevenir su inactivación debido a la conversión enzimática o física en el canal alimentario (Adachi y col., 2003). Por ello en la formulación de cosméticos, farmacéuticos, pinturas, alimentos, y, en los

últimos tiempos, en el área ambiental, las emulsiones juegan un papel importante. También se aplican en la industria del petróleo (en la producción de aceite crudo y en algunos procesos de extracción de solventes) (Vladislavjevic & Schubert, 2002) e incluso en la encapsulación de microorganismos. Las emulsiones dobles $W_1/O/W_2$ permiten la protección de sustancias atrapadas en el área farmacéutica y de cosméticos, sin embargo, su caracterización aún es difícil debido a su estructura compleja (Tokgoz y col., 1996).

2.8 Lactosuero

El lactosuero es el líquido claro de color amarillento que se separa de la cuajada (Amiot, 1991) después de la acidificación, calentamiento o por coagulación enzimática de cuajo en los procesos de manufactura de quesos (Madureira y col., 2005) representa alrededor del 90% del volumen de la leche usada en la transformación de los productos lácteos y contiene la mayor parte de los compuestos solubles de la leche (Campos, 2007), se considera que por cada 10 L de leche coagulada durante la manufactura de queso, el rendimiento está entre 6 y 9 L de suero dependiendo del tipo de queso (Almeida y col., 2008). Según el procedimiento utilizado para separar la cuajada del queso, se obtendrá lactosuero dulce o lactosuero ácido (tabla 2.4) (Spreer, 1991).

La composición de los principales constituyentes del lactosuero difiere de acuerdo al tipo de queso y al tipo de leche de la cual están hechos, en la manufactura de queso por acidificación se produce lactosuero ácido (Pintado y col., 2001) con un pH de 5 (Spreer, 1991) o por enzimas, como en la manufactura de queso cuajado produciéndose lactosuero dulce (Pintado y col., 2001) con pH de 6.45 (Spreer, 1991). El lactosuero dulce es generalmente más rico en lactosa, mientras que el lactosuero ácido tiene mayor concentración de minerales debido a la solubilización del fosfato de calcio coloidal de las micelas de caseína que actúan con la acidificación (Pintado y col., 2001). Por lo tanto como el lactosuero contiene

un alto contenido de lactosa y minerales, ha sido concentrado por varias técnicas de filtración para obtener ingredientes funcionalmente superiores (Cheryan, 1986; Gillies, 1974).

Tabla 2.4. Composición química de lactosuero líquido dulce y ácido

| Componente | Suero dulce % | Suero ácido % |
|-----------------|------------------|------------------|
| Agua | 93 - 95 | 93 - 95 |
| Extracto seco | 5 - 7 | 5 - 7 |
| Lactosa | 4.5 - 5.3 | 3.8 - 5.2 |
| Proteína | 0.6 - 1.1 | 0.2-1.1 |
| Grasa | 0.1 - 0.4 | 0.1-0.5 |
| Sales minerales | 0.5 - 0.7 | 0.5-1.2 |
| Ácido láctico | 0.1 - 0.2 | 0.2-1.2 |

Fuente: Spreer, 1991

El lactosuero es el mayor subproducto de la industria del queso y caseína, y causa impacto ambiental debido a la presencia de altas concentraciones de sustancias orgánicas disueltas. Donde la demanda bioquímica de oxígeno (DBO) varía de 30,000 a 50,000 $\mu\text{g/l}$ dependiendo de los restos orgánicos en el suero (Mukhopadhyay y col., 2003).

En México y otros países, el lactosuero es aún depositado en grandes volúmenes dentro de los sistemas de aguas residuales, especialmente por industrias lácteas pequeñas y medianas (Vernon-Carter & Pimentel-González, 2007). Por tanto la descarga de lactosuero en el ambiente constituye una significativa pérdida de una fuente de energía y proteína. El tratamiento del lactosuero como un efluente es muy costoso, sin embargo procesarlo está llegando a ser atractivo en la industria láctea debido a su valor nutricional, a la simplicidad del proceso y a las excelentes propiedades funcionales de las

proteínas del lactosuero en la conversión del lactosuero líquido en bebidas (fermentadas o no) para consumo humano, (Gandhi & Patel, 1994).

Dentro del valor nutricional del lactosuero se encuentran las proteínas las cuales son globulares y solubles en cualquier pH (Britten & Giroux, 1991). Dentro de las proteínas del lactosuero se encuentran α -lactoalbúmina, β -lactoglobulina, lactoferrina, lactoperoxidasa, inmunoglobulinas y glicomacropéptidos (Baró y col., 2001). La mayor parte de las proteínas (α -lactoalbúmina, β -lactoglobulina) muestran altos niveles de aminoácidos que contienen sulfuro, responsables de propiedades gelificantes a través de la formación de puentes S-S (Britten & Giroux, 1991). Por tanto las proteínas y los polisacáridos son dos de los biopolímeros más importantes usados como ingredientes en emulsiones (Damodaran, 1996). Por ello las proteínas aisladas del lactosuero, se han venido usando para formar las paredes de las microcápsulas cuando se encapsula en seco por aspersión. Es así como algunas proteínas (e. g., proteínas de lactosuero) en las emulsiones una vez que están adsorbidas, pueden interactuar para formar una fuerte capa interfacial que estabiliza la emulsión contra la coalescencia (Dickinson & Matsumura, 1991).

2.9 Lactosuero como medio de cultivo

El lactosuero ha demostrado ser buen medio de cultivo para bacterias lácticas. Las bacterias ácido lácticas (BAL) son exigentes en los requerimientos nutricionales, por tanto es requerido un medio rico para un buen crecimiento (Rogosa y col., 1961; Aasen y col., 2000). González y col. (2005), afirmaron que el lactosuero ácido proveniente de la elaboración de queso Oaxaca obedece a las necesidades nutrimentales de *L. rhamnosus*. Macedo y col. (2002), utilizaron lactosuero permeado, previamente desproteinizado y extracto de levadura para el crecimiento y la producción de exopolisacáridos por *L. rhamnosus* RW-9595M. Rebollo y col. (1994), utilizaron lactosuero como medio de cultivo para el

desarrollo de dos cultivos iniciadores comerciales que contenían BAL; Yogurmet (*L. bulgaricus*, *L. acidophilus* y *Streptococcus thermophilus*) y Ezal MY800 (*L. bulgaricus*, *L. lactis* y *Streptococcus thermophilus*) considerados probióticos.

En general, el crecimiento de microorganismos depende de algunos factores tales como disponibilidad de nutrientes, actividad de agua, pH, fuerza iónica, temperatura, entre otros (Pintado y col., 2001). Actualmente, limitados datos se encuentran disponibles en los parámetros de fermentación de microorganismos probióticos en lactosuero (Almeida y col., 2008).

La posibilidad de utilizar lactosuero como medio de cultivo para varios microorganismos que tengan la capacidad de utilizar lactosa como única fuente de carbono, el número de células viables reportadas coinciden con lo que algunos autores mencionan para aquellos productos considerados como probióticos (Salminen y col., 1996; FAO-WHO, 2001).

Capítulo 3

Objetivos

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Determinar el efecto de la bacteria probiótica libre y encapsulada en la conservación de lactosuero.

3.2 Objetivos particulares

- ❖ Caracterizar fisicoquímica y microbiológicamente el lactosuero ácido para el crecimiento de *L. rhamnosus*.
- ❖ Determinar viabilidad de *L. rhamnosus* libre y encapsulado en emulsiones dobles.
- ❖ Determinar la conservación del lactosuero libre y encapsulado.

Capítulo 4

Hipótesis

4. HIPÓTESIS

El uso de emulsiones múltiples con la bacteria probiótica *L. rhamnosus* en el lactosuero lo conservará como un alimento nutracéutico.

Capítulo 5

Justificación

5. JUSTIFICACIÓN

En los últimos años, algunos alimentos además de su valor nutritivo, tienen el equilibrio adecuado de los ingredientes que desempeñan una actividad específica en las funciones fisiológicas del organismo, por lo que han sido llamados «nutracéuticos», éstos tienen componentes naturales y/o adición de probióticos los cuales mejoran el equilibrio de microorganismos en el intestino promoviendo un balance de la población autóctona microbiana en el tracto gastrointestinal, cuyo propósito es que tenga un efecto benéfico en el ser humano, lo que nos ayuda directamente en la prevención y el tratamiento de enfermedades. En 1908 Metchnikoff promovió productos lácteos fermentados por sus beneficios a la salud.

Para que las bacterias probióticas contribuyan a la salud del ser humano es necesario asegurar su sobrevivencia a través del tracto gastrointestinal. Son pocos los trabajos sobre la utilización de subproductos de la agroindustria, como principales sustratos para estas fermentaciones. El crecimiento de bacterias ácido lácticas (BAL) es afectado por las condiciones de fermentación tales como pH, temperatura, composición del medio y otros factores (Tseng & Montville, 1993). Han sido propuestos diferentes métodos que incrementan la resistencia a estos microorganismos entre los que se encuentra la microencapsulación (Gismondo y col., 1999) proceso en el cual las células son retenidas dentro de una matriz o membrana (Anal & Singh, 2007). Es así que la microencapsulación facilita la manufactura de los productos lácteos fermentados en los cuales la bacteria tiene características consistentes y una estabilidad más alta en el almacenamiento y productividad que las no encapsuladas. Como los microorganismos probióticos pueden ser afectados durante el proceso de la microencapsulación un método alternativo para proteger a los probióticos es su inclusión en una emulsión doble agua-en-aceite-en-agua ($W_1/O/W_2$) (Shilma y col., 2006). Dado que el lactosuero a menudo ha sido usado como un agente emulsificante/microencapsulante (Britten & Giroux, 1991; Young y col., 1993). El alto contenido de lactosa y proteína en el

lactosuero del Valle de Tulancingo probablemente pueda ser usado como sustrato base para la formulación de medios de cultivo de bacterias ácido lácticas (Campos y col., 2007).

Actualmente en México y otros países la industria láctea es una de las principales fuentes de contaminación, debido a que el lactosuero obtenido de la manufactura de queso es depositado en grandes volúmenes a las alcantarillas dentro de los sistemas de aguas residuales, por tanto la eliminación de este subproducto acarrea serios problemas al ambiente debido a su alta demanda química y bioquímica de oxígeno. El Valle de Tulancingo, Hidalgo enfoca su principal producción en queso Oaxaca (Campos y col., 2007). Por tanto empleando el lactosuero ácido obtenido de la elaboración de queso Oaxaca, se propone comparar la conservación de lactosuero en una doble función: como medio de cultivo de la bacteria ácido láctica *L. rhamnosus* y como agente emulsificante en la formación de emulsiones dobles en las que se entrampe esta bacteria, para posteriormente poder ser usada la fermentación de *L. rhamnosus* como un alimento funcional debido a la actividad probiótica que la bacteria presenta.

Capítulo 6

Materiales y Métodos

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Condiciones de cultivo de *L. rhamnosus*

L. rhamnosus LC705 fue proporcionado en forma liofilizada por HOLDBAC™ (DANISCO, Niebüll, Alemania). El cultivo fue hidratado usando 1% p/v de inóculo en lactosuero ácido (LA) estéril usado como medio de cultivo, y fue incubado por 18 h a 37 °C sin agitación y sin control de pH. El cultivo de *L. rhamnosus* fue transferido en MRS usando 3% (v/v) de inóculo para activación (37 °C, 18 h), una vez más fue inoculado en suero estéril (1 % v/v) en 100 mL a 37 °C por 18 h, para adaptación del de la bacteria (*L. rhamnosus*). Posteriormente se inoculan 10 mL (1 % v/v) del cultivo adaptado en 1000 mL de suero estéril, el cual fue incubado 24 horas a 37 °C, para observar los parámetros cinéticos y encontrar el final de la fase logarítmica para su cosecha (Adhikari y col., 2000; Picot & Lacroix, 2004) y ser usado en los diferentes tratamientos.

6.2 Preparación de *L. rhamnosus* por entrampamiento en emulsiones

Las células de *L. rhamnosus* crecidas en lactosuero ácido (LA), fueron removidas y centrifugadas en la fase logarítmica 10^9 en tubos estériles de 50 mL, se midieron 26 mL en 7 tubos usando una centrifuga Hermle Z36K a 12000 rpm durante 15 minutos, obteniendo 104 mL. El sobrenadante fue descartado, y las bacterias concentradas fueron re-suspendidas en 31.5 mL de LA pasteurizado a 85 °C por 10 min (Lobato-Calleros y col., 2004).

Las emulsiones dobles $W_1/O/W_2$ fueron preparadas a temperatura ambiente (21 ± 2 °C) por el método de las dos etapas (Rodríguez-Huezo y col., 2004). En la primera etapa, una emulsión agua-en-aceite (W_1/O) fue preparada incorporando una fase acuosa interna (W_1) constituida por LA conteniendo 2.1×10^{10} ufc mL⁻¹ de *L. rhamnosus*, dentro de una fase oleosa (O) formada por aceite de canola

(Capullo®, Unilever de México, S.A. de C.V., Tultitlán, Edo. de México, México) con una concentración total de emulsificantes de 8 % p/p (una parte de emulsificante hidrofílico y cuatro partes de emulsificante hidrofóbico). El emulsificante hidrofílico fue Panodan SDK (ésteres de mono glicéridos y di glicéridos de ácido di acetil tartárico) y el emulsificante hidrofóbico fue Grindsted PGPR 90 (ésteres de ácidos grasos de poli glicerol y poliricinoleato), ambos distribuidos por Danisco México, S.A. de C.V. El proceso de emulsificación fue llevado a cabo con ayuda de un homogeneizador Virtis 220 (Virtis Company, Gardiner, NY, EUA) a 5000 rpm durante 10 min. La emulsión W_1/O tuvo una fracción volumétrica de fase dispersa de 0.3. En la segunda etapa, 50 mL de la emulsión primaria W_1/O fue re-emulsificada en 220.5 mL de LA o LAC como fase acuosa externa (W_2) y 24.5 g de suero en polvo, usando el homogeneizador Virtis operado a 5000 rpm por 5 min, produciendo emulsiones dobles $(W_1/O/W_2)^{LA}$ o $(W_1/O/W_2)^{LAC}$, respectivamente.



Figura 6.1 Homogeneizador Virtis operado a 5000 rpm

6.3 Condiciones experimentales

Se establecen tres tratamientos, lactosuero ácido pasteurizado (LAP), lactosuero ácido pasteurizado inoculado (LAPI) al 10% (v/v) con *Lactobacillus rhamnosus* LC705 de DANISCO-HOLDBAC™ cosechado, y entrapamiento de *Lactobacillus rhamnosus* LC705 de DANISCO-HOLDBAC™ en emulsiones dobles ($W_1/O/W_2$), los cuales se almacenaron a temperatura ambiente ($21\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$) por hasta 32 días, tomando las variables de estudio de (0, 1, 2, 4, 8, 16 y 32 días), por duplicado en el (LAP) y (LAPI).

Tratamientos:

1. Se depositarán 50 mL de suero pasteurizado (85°C por 10 min.) en 14 frascos de vidrio.
 2. Se inocularán 5 mL (10% v/v) de cultivo cosechado, en frascos de vidrio que contenían 45 mL de suero pasteurizado a 85°C por 10 minutos.
 3. Se colocarán 50 mL de emulsión doble en 7 frascos
- En todos los casos los frascos estaban previamente estériles (121°C, 15 min.).



Figura 6.2 Tratamientos de lactosuero pasteurizado, lactosuero pasteurizado inoculado y emulsiones.

6.4 Caracterización experimental del lactosuero

Se empleó lactosuero ácido (LA) que se obtuvo como subproducto de la coagulación enzimática (quimosina, relación 1:10 000, Cuamex, S. A. de C. V., México) de leche durante la manufactura de queso Oaxaca (Lobato-Calleros y col., 2006) proporcionado de la planta PROUNILAC-UAEH (Tulancingo, Estado de Hidalgo, México).

A los tratamientos se les hizo una caracterización fisicoquímica y microbiológica determinando: sólidos totales, azúcares, proteína soluble, materia grasa, pH, acidez, cuantificación de microorganismos mesófilos aerobios (NOM-092-SSA1-1994), bacterias ácido lácticas en agar De Man Rogosa y Sharpe (MRS) por la técnica De Man y col. (1960), y coliformes totales en agar de Mac Conkey (NOM-113-SSA1-1994).

6.5 Análisis fisicoquímicos

6.5.1 Determinación de proteína soluble.

La determinación de proteína soluble se realizó de acuerdo a la metodología propuesta por Bradford (1976). Se colocó 0.1 mL de la muestra en cada tubo, se le adicionó 3 mL de reactivo de Bradford, se agitó en un vórtex (Thermolyne, M37615, Grovecity, PA, EUA) y se dejaron reposar 30 min en la oscuridad. Se midió la absorbancia a 595 nm, en un espectrofotómetro (Spectronic Instruments, Genesys 5, Rochester, NY, EUA). Se calculó la cantidad de proteína tomando como base la curva patrón de albumina purificada en solución de NaCl 0.15 M a concentración de 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1 mg/mL. (Figura 6.3).

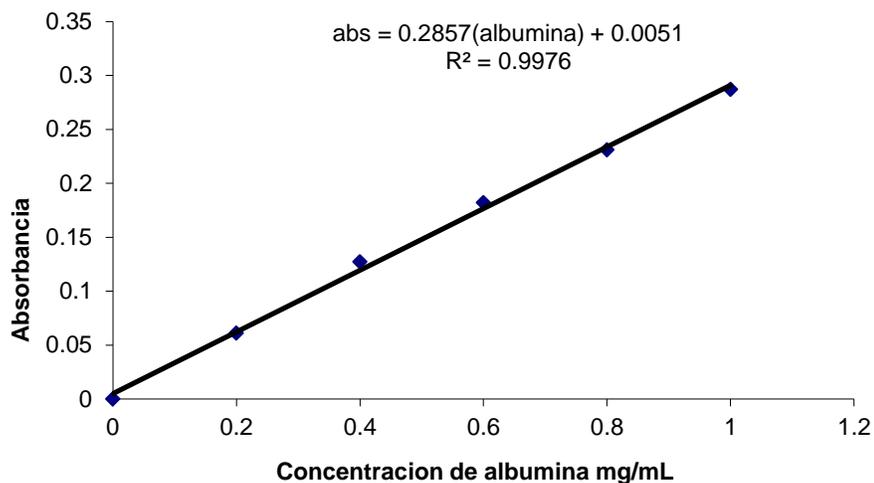


Figura 6.3 Curva patrón para determinación de proteína soluble por el método de Bradford).

6.5.2 Determinación de materia grasa.

La determinación materia grasa se realizó por el método de Gerber mediante la metodología mencionada en la NOM-035-SSA1-1993.

Se adicionaron 10 mL de ácido sulfúrico con una densidad de 1.54 g/L y a una concentración de 90 % en butirómetros Gerber, se prosiguió agregar 11 mL de muestra lentamente por las paredes del butirómetro. Posteriormente se agregó 1 mL de alcohol isoamílico con una densidad de 0.188 g/L. Se tapó el butirómetro. Se agitó enérgicamente hasta que se mezcló, se centrifugó por 10 minutos, colocando el butirómetro de forma invertida en la centrifuga. El butirómetro se colocó en baño María a 65 ± 2 °C por 10 minutos de manera que el tapón quedara en la parte inferior y que toda la columna de grasa estuviera sumergida. Se realiza el procedimiento por repetidas ocasiones. Se tomó la lectura del porcentaje de grasa.

6.5.3 Determinación de sólidos totales.

Los sólidos totales fueron cuantificados por el método de la AOAC 925.23 (AOAC, 1995). Se pesaron de 3-4 g de la muestra y se colocaron en un crisol puesto a peso constante. Se desecó en estufa, posteriormente se secó en mufla a 550 °C hasta peso constante. Al término de esta etapa se pesó la cápsula con los sólidos totales. El contenido de sólidos totales en la muestra se calculó con la ecuación 1:

$$\% \text{ de sólidos totales} = \frac{\text{Peso de residuo}}{\text{g de muestra}} \times 100 \quad \text{Ecuación 1}$$

6.5.2 Determinación de azúcares totales

Se determinaron azúcares totales por el método de la antrona (Travelyan y Harrison, 1952) se hicieron diluciones de las muestras de los extractos 1:100 en lactosuero ácido pasteurizado inoculado (LAPI), 1:10000 en el encapsulado de emulsiones y en lactosuero ácido pasteurizado (LAP) sin dilución, en un tubo de ensayo se tomó 1 mL de muestra y se le adicionaron 2 mL de reactivo de antrona según la técnica de la Antrona (Travelyan y Harrison, 1952). Inmediatamente después los tubos se agitaron vigorosamente usando un agitador vórtex (Thermolyne, M37615, GroveCity, PA, EUA) después se colocaron en Baño María a ebullición por 10 minutos. Se dejó enfriar y se leyó absorbancia a 625 nm en espectrofotómetro (Spectronic Instruments, Genesys 5), frente a un testigo usando únicamente agua destilada como muestra. Se calculó la cantidad de azúcares tomando como base la curva patrón de glucosa a concentración de 0 a 50 mg/mL. (Figura 6.4)

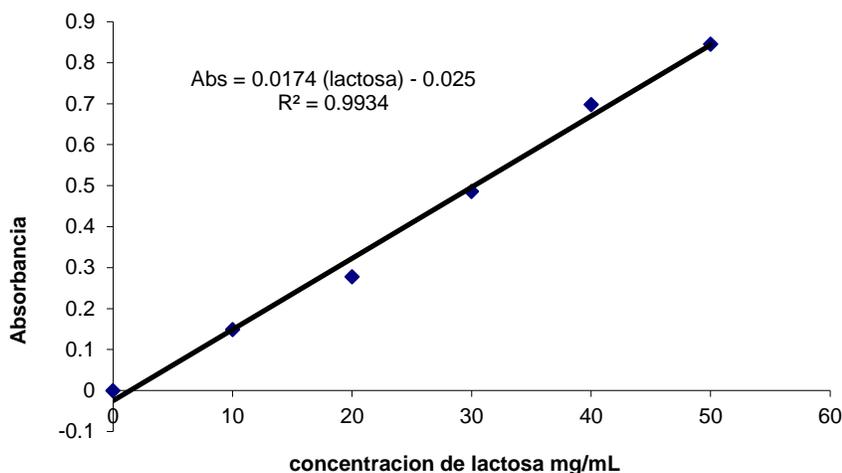


Figura 6.4. Curva patrón de azúcares totales (Método Antrona)

6.5.3 Determinación de pH

Se calibró el potenciómetro (modelo 410 A, Orión Research, Inc., Beverley, MA, EUA) con las soluciones buffer 4 y 7 en el orden correspondiente, se introduce el electrodo en la muestra y se registró la lectura, posteriormente se lavó el electrodo con agua destilada (NMX-AA-008-SCFI-2011).

6.5.4 Determinación de acidez titulable

En un vaso de precipitado de 25 mL se colocaron 9 mL de suero, medidos con pipeta volumétrica, se adicionaron de 2-3 gotas de fenolftaleína y se procedió a la titulación con NaOH 0.1 N (AOAC, 1999).

1°D = 1mg de ácido láctico en 10 mL de muestra (0.1 g/L ó 0.01 % de ácido láctico) (Alais, 1985)

6.6 Análisis microbiológicos

6.6.1 Cuantificación de mesófilos aerobios, bacterias ácido lácticas y coliformes totales.

La determinación de la concentración de mesófilos aerobios se realizó mediante la metodología establecida en la NOM-092-SSA1-1994, utilizando agar para métodos estándar (BIOXON). Para los coliformes totales se utilizó agar de Mac Conkey (BIOXON). Y en la determinación de bacterias ácido lácticas (BAL) se empleó agar De Man, Rogosa y Sharpe (MRS) (Difco, Sparcks, MD).

Todos los medios fueron disueltos en agua destilada según las recomendaciones del proveedor y se esterilizaron a 121 °C durante 15 minutos. Se depositaron aproximadamente 20 mL de medio de cultivo en cajas de Petri, se dejaron secar y una vez gelificados los medios, se depositaron 25 µL de muestra diluida en agua peptonada al 0.1%, posteriormente se incubaron a 37 °C ± 2 °C, durante 48 h. Se realizó el conteo del número de unidades formadoras de colonias por mililitro (ufc ml⁻¹) con la ayuda de un contador de colonias (Leica, 3327) estimando la viabilidad celular.

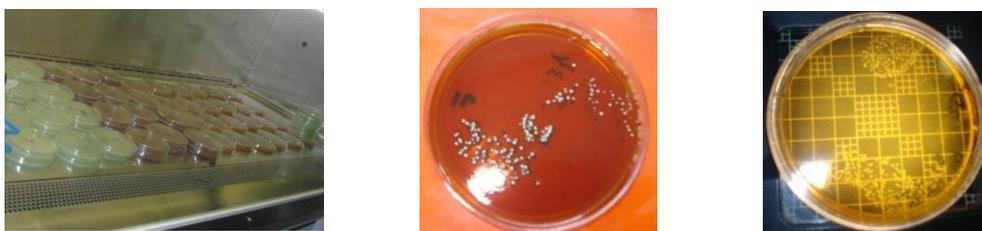


Figura 6.5. Medios de cultivo de microorganismos

Las emulsiones simples (W/O) y dobles (W₁/O/W₂) conteniendo las células entrampadas fueron centrifugadas por 9 minutos en muestras de 1 mL. Bajo estas condiciones, las emulsiones W₁/O/W₂ fueron rotas y las células entrampadas fueron liberadas. Las muestras de 1 mL de emulsión rota fueron suspendidas en 9 mL de agua peptonada al 0.1%, (en diluciones desde 10⁻¹ hasta 10⁻⁷). Posteriormente fueron depositados 25 µL de muestra diluida en cajas Petri con

medio de cultivo de agar De Man, Rogosa y Sharpe (MRS), según las recomendaciones del proveedor, se incubaron a $37\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$, durante 48 h.

Se realizó el conteo del número de unidades formadoras de colonias por mililitro (ufc mL^{-1}) con la ayuda de un contador de colonias (Leica, 3327) estimando la viabilidad celular de emulsión simple y emulsiones dobles en las diferentes variables de estudio.

Capítulo 7

Resultados y Discusión

7. RESULTADOS Y DISCUSIONES

7.1 Cultivo de *L. rhamnosus*

La concentración máxima de biomasa viable de *Lactobacillus rhamnosus* crecido en lactosuero ácido (LA) estéril como medio de cultivo al final de la fase logarítmica fue de 2.9×10^9 ufc ml⁻¹ a las 24 h. El conteo celular se realizó en placa de agar MRS. Son muy pocas las investigaciones donde se utiliza el lactosuero como único medio de cultivo para la producción de este tipo de microorganismos, pues la mayoría de los trabajos se basan en la utilización de medios complejos y algunos medios definidos, los cuales son muy caros y por lo tanto elevan los costos de producción. *L. rhamnosus* RW-9595M puede utilizar lactosa como única fuente de carbono, y su crecimiento se ve favorecido por la presencia de otros componentes importantes para el desarrollo celular (aminoácidos, vitaminas y sales). Rebollo y col. (1994), son de los pocos autores que han utilizado lactosuero como medio de cultivo, para la propagación de algunas cepas bacterianas de cultivos iniciadores de marca comercial: Yogurmet (*L. bulgaricus*, *L. acidophilus* y *Streptococcus thermophilus*) y Ezal MY800 (*L. bulgaricus*, *L. lactis* y *Streptococcus thermophilus*) consideradas como probióticas. La cantidad recomendada de microorganismos probióticos, según la Asociación Japonesa de Leches Fermentadas y Bebidas con BAL, requiere un mínimo de 10^7 ufc mL⁻¹ viables (Tamime y col., 2005). En este estudio se encontraron concentraciones superiores a 10^7 log ufc ml⁻¹ cuando se utilizó lactosuero estéril como medio de cultivo. Sin embargo esta alta concentración de microorganismos en el medio de cultivo no necesariamente indica que los microorganismos lleguen en concentraciones suficientes al intestino, si se quieren usar como probióticos. El crecimiento y acidificación de las BAL puede ser monitoreado por medio de la cuantificación del ácido láctico producido, debido a que la principal propiedad de las BAL es la producción de ácido (Walstra y col., 1999).

7.2 *L. rhamnosus* atrapada en emulsiones dobles $W_1/O/W_2$

La eficiencia de encapsulación fue calculada de acuerdo a la concentración viable de *Lactobacillus rhamnosus* crecido en lactosuero ácido (LA) estéril como medio de cultivo al final de la fase logarítmica a las 24 horas con 2.9×10^9 ufc mL^{-1} , se concentró 7 veces, obteniendo la máxima biomasa en la emulsión primaria (W_1/O) de 1×10^8 ufc mL^{-1} . La emulsión W_1/O fue diluída en suero pasteurizado para obtener la emulsión $W_1/O/W_2$, obteniendo así el número de células de 6×10^5 ufc mL^{-1} en la emulsión ($W_1/O/W_2$) inicial. La fracción de fase dispersa de las emulsiones formuladas fue de 0.3 debido a que es la fracción más adecuada para que las bacterias tengan una mejor viabilidad (Shima y col., 2006). La estabilidad de las emulsiones ha sido positivamente correlacionada al contenido de proteína encontrado en el estudio inicial 66.54 ± 0.99 y final de 48.69 ± 2.97 g/L elevada debido a la concentración de biomasa la cual le permite dar esa estabilidad a la emulsión. La fase dispersa tiene menor densidad que la fase continua por lo que las formas de separación gravitacional están representados por el cremado donde se observan dos regiones – crema y suero – y la sedimentación, en la cual, los glóbulos dispersados se precipitan debido a una densidad mayor que la fase continua (Figura 7.1).



Figura 7.1 Emulsiones $W_1/O/W_2$ a los 0,1,2,4,8,16 y 32 días

La correlación positiva entre el contenido de proteína y la estabilidad de la emulsión podría ser atribuida a un posible incremento en la viscosidad de la fase acuosa continua y a la cantidad de proteína adsorbida en la superficie de la gota de grasa (Patel & Kilara, 1990). Esto está relacionado al observar los primeros tratamientos que presenta mayor viscosidad por lo tanto mayor estabilidad. El parámetro cuantitativo para determinar la estabilidad fue la relación de $[(D_{1,0})W/O/(D_{1,0}) W_1/O/W_2]$ con respecto al tiempo (Pimentel-González y col., 2008). Por lo que basados en ésto, fue elegida la formulación de la emulsión doble con lactosuero ácido concentrado para la encapsulación de *L. rhamnosus*.

Los resultados encontrados en este estudio son comparables a los reportados por Guerin y col. (2003) quienes mostraron sobrevivencia a pH de 2.5 por 2 horas. De acuerdo a los datos de la tabla 1 los resultados de pH se observó un descenso, los cuales sugieren buena sobrevivencia por la cantidad de biomasa conforme transcurren los días.

| Días | pH |
|------|-------------|
| 0 | 5.03 ± 0.02 |
| 1 | 4.96 ± 0.04 |
| 2 | 4.68 ± 0.01 |
| 4 | 4.26 ± 0.03 |
| 8 | 3.90 ± 0.01 |
| 16 | 3.69 ± 0.02 |
| 32 | 3.61 ± 0.13 |

Tabla 7.1. pH observado en 7 variables

Estos resultados sugieren que el entrapamiento en la emulsión doble $W/O/W_{LAC}$, brinda la protección para que *L. rhamnosus* pueda atravesar el tracto gastrointestinal y que además, las células puedan mantenerse en cantidades adecuadas ($11 \log \text{ cfu mL}^{-1}$) para su función como probiótico. Los datos expuestos concuerdan con investigaciones realizadas por Shima y col. (2006), los cuales sugieren que las emulsiones dobles pueden tener efectos protectores en la bacteria incluida en su fase interna en una solución de pH ácido. En el este

estudio se obtuvo una sobrevivencia significativamente más alta en emulsiones que la observada en las células control no atrapadas lo cual concuerda con lo reportado por Lian y col., (2003); Picot & Lacroix, (2004). La presencia de microorganismos encapsulados en la emulsión múltiple $W_1/O/W_2$ no afecta significativamente la estabilidad de la emulsión. Por lo tanto de acuerdo al pH ácido obtenido en este estudio se puede concluir que la emulsión doble actuó como barrera protectora de los microorganismos lo cual permitieron sobrevivir por 32 días, además de tener un conteo ufc mL^{-1} considerable que permite favorecer el efecto probiótico de la bacteria *L. rhamnosus*.

7.3 Caracterización fisicoquímica y microbiológica del lactosuero ácido.

7.3.1 Proteína soluble.

La concentración de proteína encontrada en este estudio (tabla 7.2) es inferior a los encontrados por Moras y col., (2010) en un estudio similar. Vernon-Carter y Pimentel-González (2007), encontraron que existe una variación en la concentración de proteína presente en el lactosuero del Valle de Tulancingo Hgo., debido a que los productores no reutilizan el lactosuero en la producción de requesón. Mientras que en el tratamiento de emulsiones se esperaban estos resultados de concentración alta de proteína, por la alta concentración de microorganismos presentes en el atrapamiento.

De acuerdo con Hartman (1976), los carbohidratos y las proteínas son los compuestos orgánicos que se metabolizan principalmente en estos sistemas anaerobios por lo que se observa una disminución de concentración de proteína después de 32 días. El lactosuero completamente desproteinizado disminuye sustancialmente sus propiedades como medio de cultivo (Alais, 1985). Por lo tanto podemos concluir que el tratamiento en emulsiones dobles a los 32 días contiene un alto contenido de proteína lo cual es un indicador para que tengan mayor efecto las bacterias probióticas.

Tabla 7.2 Concentración de proteína después de 32 días en tres tratamientos.

| proteína (g/L) | | | | | |
|-----------------|-------------|---------------|-------------|--------------|--------------|
| LA pasteurizado | | LAP inoculado | | Emulsiones | |
| Inicial | final | inicial | final | inicial | final |
| 4.83 ± 0.35 | 4.67 ± 0.17 | 5.32 ± 1.78 | 4.15 ± 0.02 | 66.54 ± 0.99 | 48.69 ± 2.97 |

7.3.2 Materia grasa.

La materia grasa observada en este estudio es de 2% en los tratamientos de lactosuero ácido pasteurizado y lactosuero ácido pasteurizado e inoculado con *lactobacillus rhamnosus*, mientras que en emulsiones se presenta un porcentaje mayor (7%), el cual se explica por el empleo de aceite de canola en el entrapamiento de microorganismos.

Sin embargo la materia grasa no tuvo cambios al final del tiempo en ninguno de los tratamientos.

7.3.3 Sólidos totales.

La figura 7.2 muestra los resultados de sólidos totales a los cero días y después de 32 días en tres diferentes tratamientos, observando un incremento de sólidos totales en los tratamientos de lactosuero pasteurizado y lactosuero inoculado con *L. rhamnosus*, mientras que en la emulsión se presenta una disminución. Un suero con alto contenido de extracto seco, por contener alta concentración de sales fosfato, está fuertemente tamponada evitando variaciones del pH debido a la fermentación de la lactosa por lo que mientras mayor cantidad de sólidos retrasa su alteración (Alais, 1985). Se puede observar en la figura 7.3 la cantidad de sólidos en la fase final del estudio, en lactosuero pasteurizado se

encuentra una concentración de 65 ± 0.11 mientras que en la emulsión fue de 56 ± 0.01 y el lactosuero inoculado termina con una concentración de 55 ± 0.00

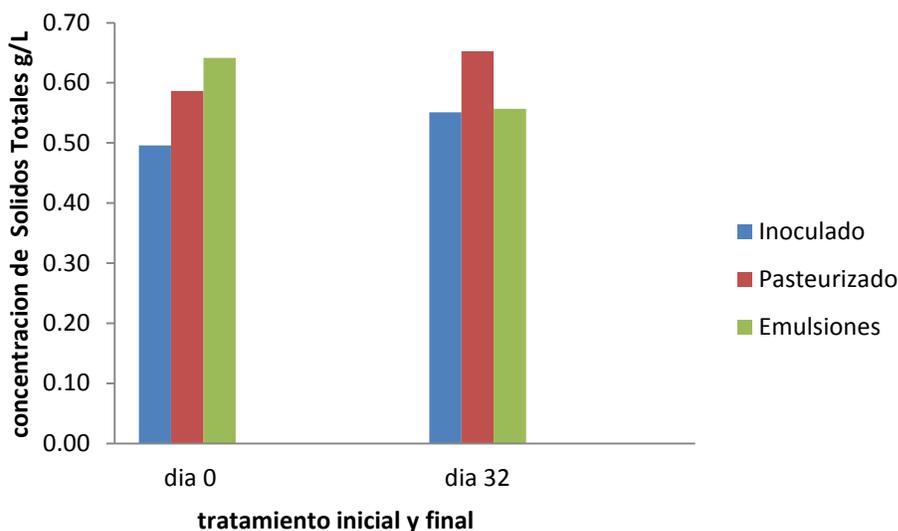


Figura 7.2. Sólidos totales suspendidos en lactosuero pasteurizado, inoculado y en emulsiones.

7.3.4 Azúcares totales

En el tabla 7.3. se presenta una alta concentración de azúcares en la emulsión en comparación con los otros dos tratamientos. La lactosa es el principal azúcar en la leche (Robison, 2002), se encuentra en la proporción de 40-50 g/L (Alais 1985), sin embargo la mayor parte de la lactosa queda disuelta en el suero. La cantidad encontrada en este estudio en los tratamientos de suero pasteurizado y suero pasteurizado inoculado con la bacteria *L. rhamnosus* están muy por debajo de los citados por Alais (1985). Vogel y Todaro (1996), consideraron que la lactosa puede ser utilizada como fuente de carbono por cualquier microorganismo que tenga la capacidad de desdoblar dicho disacárido. Entre los

microorganismos que pueden degradar la lactosa se encuentran las bacterias ácido lácticas, ya que éstas cuentan con un sistema específico de degradación del disacárido. La mayor degradación de la lactosa se acompaña de producción de ácido láctico lo cual indica que al tener un alto contenido de ácido láctico probablemente por ello se explique la concentración muy baja de azúcares totales en estos tratamientos, mientras que en la emulsión se observa que tiene una alta concentración en función a la concentración contenida en dicho tratamiento, lo cual es favorable por el alto contenido de nutrientes para la conservación del probiótico encapsulado.

Tabla 7.3. Azúcares totales en tres diferentes tratamientos en la observación inicial y final de los tratamientos después de 32 días.

| azúcares (g/L) | | | | | |
|-----------------|--------------|---------------|--------------|-------------|-------------|
| LA pasteurizado | | LAP inoculado | | Emulsiones | |
| Inicial | final | inicial | final | inicial | final |
| 9.68 ± 0.12 | 12.76 ± 0.09 | 11.29± 0.32 | 15.98 ± 0.04 | 25.86± 1.05 | 15.97± 1.86 |

7.3.5 pH

Los resultados obtenidos en este estudio (figura 7.3) están dentro del rango de los reportados por Spreer (1991) en lactosuero ácido con un pH de 5. Hernández y col., (2003), mencionan que el lactosuero del valle de Tulancingo tiene en promedio un pH de 5.5. por lo que podemos decir que los tratamientos de este estudio están dentro de un pH ácido. El entrapamiento de la bacteria *L. rhamnosus* en la emulsión doble presento pH inicial 5.03 ± 0.02 y final 3.61 ± 0.13 . Shima y col., (2006) sugieren que las emulsiones dobles pueden tener efectos protectores en la bacteria incluida en la fase interna en una solución de pH ácido. Lian y col., (2003); Picot & Lacroix (2004) en investigaciones previas demostraron un efecto protector ejercido por la encapsulación de bacterias probióticas, cuando

se exponen a pH ácidos, obteniéndose una sobrevivencia significativamente más alta que la observada en las células no entrampadas.

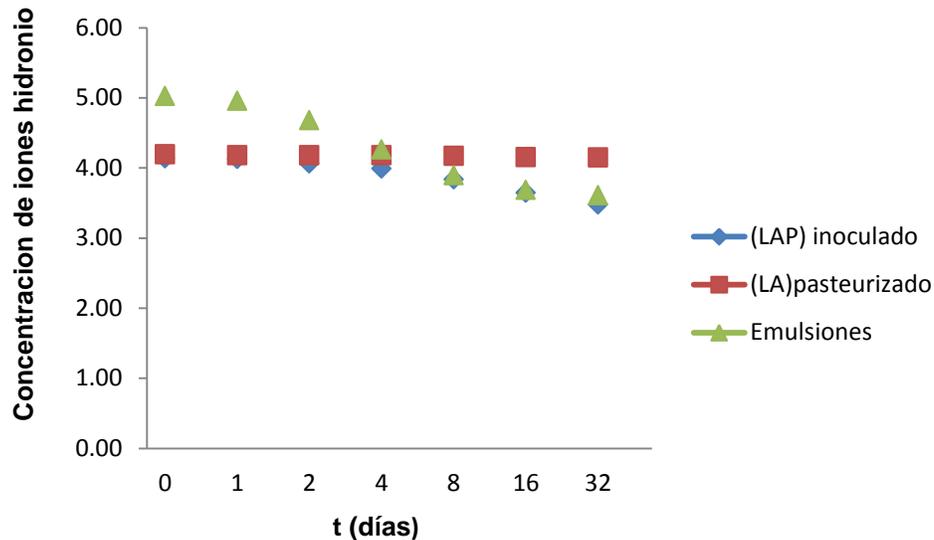


Fig. 7.3 Concentración de pH en el estudio de lactosuero ácido en tres tratamientos.

En el tratamiento de lactosuero pasteurizado e inoculado con *L. rhamnosus* se observaron datos iniciales de 4.14 ± 0.01 y finales 3.48 ± 0.01 mientras que Moras y col., (2010) reportan en un estudio similar de 22 días en lactosuero un pH inicial de 5.68 ± 0.03 y final de 4.47 ± 0.02 . Según Fox y McSweeney (1998) el pH es altamente dependiente de la temperatura. El pH disminuye en promedio 0.01 unidades por cada $^{\circ}\text{C}$ que aumenta por lo que las variaciones de la temperatura causan muchos cambios en el sistema buffer del suero, principalmente se ve afectada la solubilidad del fosfato de calcio.

El equilibrio ácido-base es influenciado por las operaciones de procesamiento. De esta manera, la pasteurización causa algunos cambios en el pH debido a la pérdida de CO_2 y a la precipitación de fosfato de calcio. Tratamientos térmicos severos (superiores a 100°C) resultan en una disminución del pH debido a la degradación de la lactosa a varios ácidos orgánicos,

especialmente en ácido fórmico (Fox y McSweeney, 1998). Por lo que la variación de pH en este estudio se explica por estos factores, hubo una pasteurización y posteriormente los tratamientos se expusieron a temperatura ambiente seguramente con variaciones de temperatura externa del sistema. Sin embargo podemos establecer que el descenso de pH se presenta en los tres tratamientos de forma muy homogénea conforme transcurrían los días, lo cual es favorable para la conservación del lactosuero con efecto de la bacteria probiótica.

7.3.6 Determinación de acidez titulable

En este trabajo el porcentaje de ácido láctico en datos iniciales están muy disparados en comparación con los reportados por Spreer (1991) quién reportó en promedio 20.95° Dornic (°D) en suero ácido, mientras que en este estudio se tiene en promedio una acidez de 41.5°D en tratamientos iniciales. Moras y col., (2010) presentan en promedio 21.5°C en tratamientos similares a los realizados en este estudio (lactosuero pasteurizado inoculado con *L. rhamnosus*). Sin embargo se observa en este trabajo una acidez en los tres tratamientos muy homogénea, aunque con una concentración relativamente alta (figura 7.4) con una acidez inicial de 41°Dornic (D) y final de 83°D en lactosuero ácido inoculado con *L. rhamnosus*; inicial de 42°D y 41°D final en lactosuero ácido pasteurizado, mientras que en las emulsiones dobles presentaron 53°D inicial y 234°D final. La acidez desarrollada es debida al ácido láctico y a otros ácidos procedentes de la degradación microbiana de la lactosa, y eventualmente de los lípidos. Como la acidez desarrollada es consecuencia de la acción de bacterias fermentadoras de la lactosa (bacterias lácticas) que producen un aumento de la concentración de ácido láctico, puede utilizarse la medición conjunta de pH y acidez titularle para estimar la acidez desarrollada, por lo que valores de acidez titularle por encima de 22° D y pH inferiores a 6,5 ponen en evidencia leche en vías de alteración por acción de microorganismos (Alais, 1985). Según Tamine y Robinson (1988) la supervivencia

de la cepa y, por tanto, la vida útil del producto, dependen del contenido de ácido (alrededor de 0,65 % de ácido láctico) y de la temperatura menor de 5 °C, por lo que afirman que la flora probiótica, debe sobrevivir en los productos fermentados, soportar el pH ácido del estómago y sobrevivir y, si es posible, implantarse y multiplicarse en el intestino. Por tanto la acidez titularle obtenida es un buen indicativo para el efecto de las bacterias probióticas en la conservación del lactosuero, observando una mayor viabilidad en las emulsiones dobles. El efecto probiótico de las bacterias ácido lácticas se debe a la producción de algunos ácidos orgánicos como el ácido láctico, y presentan mayor resistencia a estos ácidos que otros microorganismos (Gonçalves y col., 1997), así como también a la producción de bacteriocinas, competencia con patógenos y fortalecimiento del sistema inmunológico (Gulahmadov y col.,2006). Por lo general *L. rhamnosus* produce L-ácido láctico exclusivamente.

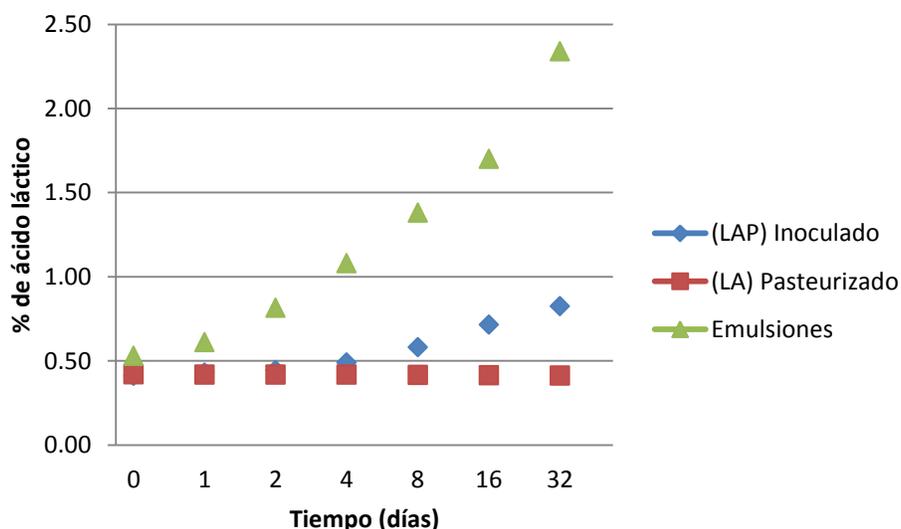


Figura 7.4. Curva de crecimiento de ácido láctico en tres tratamientos

Gatje y Gottschalk (1991), mencionan que el mecanismo de inhibición del crecimiento microbiano por ácido láctico aún no es muy claro, pero la forma no disociada de ácidos orgánicos podría ser tóxica para algunos microorganismos.

Sin embargo, el mecanismo de inhibición por ácidos orgánicos débiles, está relacionado con la solubilidad de la forma no disociada, dentro de la membrana del citoplasma y la insolubilidad de la forma ácida ionizada. Esto causa la acidificación del citoplasma y el colapso de las fuerzas motrices, produciendo la inhibición del transporte de nutrientes (Kashket, 1987)

7.4 Caracterización microbiológica

El número de unidades formadoras de colonias (ufc) de microorganismos coliformes totales encontrados en este estudio fue mayor en el tratamiento inoculado, esto puede deberse al mal manejo sanitario, siguiendo la emulsión y por último el tratamiento pasteurizado, sin embargo la presencia de estos microorganismos se encontró nula al final del estudio (figura 7.5).

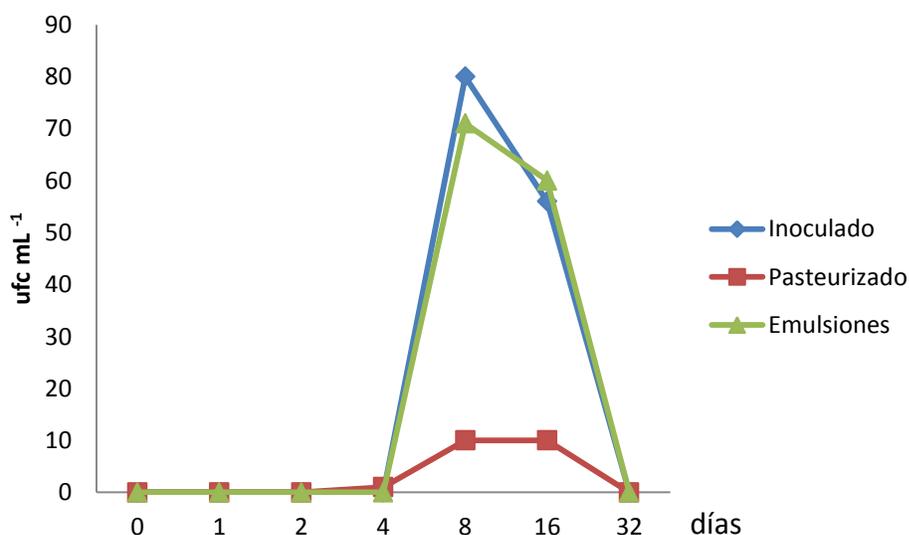


Figura 7.5. Curva de crecimiento de coliformes totales en tres tratamientos a) lactosuero ácido pasteurizado, b) lactosuero ácido pasteurizado e inoculado con *L. rhamnosus* c) entrapamiento de *L. rhamnosus* en emulsiones dobles.

La presencia de coliformes en suero está asociada con malas prácticas higiénicas en la manufactura de queso, especialmente con las condiciones de limpieza y desinfección del equipo (Nikolaou y col., 2002). Además, algunos autores mencionan que un elevado recuento de coliformes puede indicar que las temperaturas de almacenamiento de suero superaron los 7 °C. En México, no existen normas para regular microbiológicamente el lactosuero como subproducto. Sin embargo, existen algunas normas que regulan la calidad de algunos productos lácteos como es el caso de los quesos (NOM-121- SSA1, 1994), en donde no se permiten más de 3 log ufc g⁻¹.

En la emulsión el número de microorganismos mesófilos fue elevado, 3.1 x 10⁸ ufc ml⁻¹, (Figura 7.6.) sin embargo esto no significa que se deba a un mal manejo sanitario durante el proceso de elaboración de quesos; ya que en los quesos, se utilizan bacterias conocidas como microorganismos iniciadores, tanto mesófilas como termófilas (Petersson, 1988).

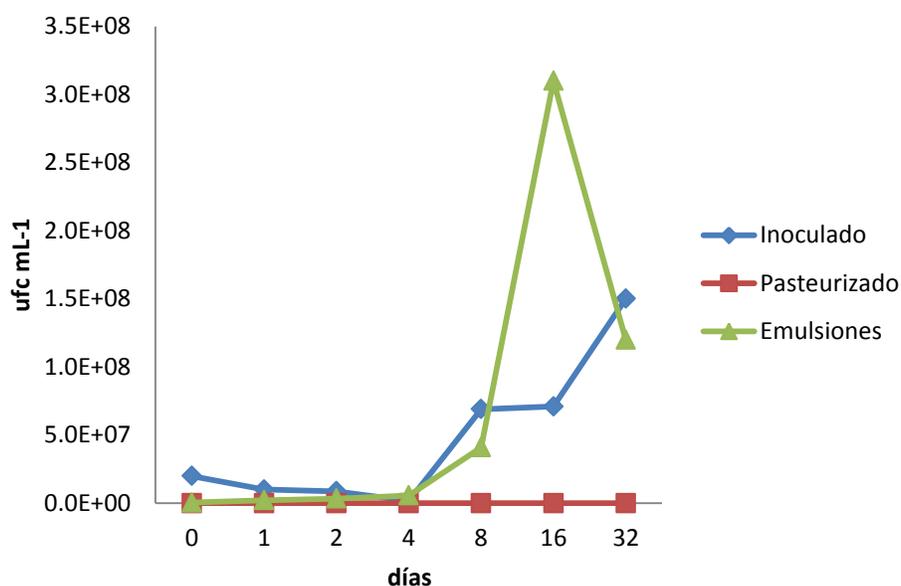


Figura 7.6. Comportamiento de bacterias mesófilas en tres tratamientos a) lactosuero ácido pasteurizado b) lactosuero ácido pasteurizado e inoculado con *L. rhamnosus* c) entrapamiento de *L. rhamnosus* en emulsiones dobles.

Sin embargo a los 32 días tuvo un descenso considerable, probablemente por la competencia de nutrientes con las bacterias ácido lácticas por encontrarse en mayor concentración. Mientras que en el tratamiento inoculado en las bacterias mesófilas se observa un ascenso durante el estudio. Además en el tratamiento pasteurizado se encontró menor número de microorganismos mostrando una curva de crecimiento al finalizar el estudio.

El mayor crecimiento de bacterias ácido lácticas en los tratamientos de lactosuero ácido pasteurizado (2.2×10^5 ufc ml⁻¹) y lactosuero ácido pasteurizado inoculado con *L. rhamnosus* (1.05×10^{11} ufc ml⁻¹) se presenta a los 16 días de estudio. (figura 7.7). Mientras que en la emulsión se observa una cinética de crecimiento ascendente durante el estudio teniendo un alto contenido de microorganismos a los 32 días con 1.9×10^{11} ufc ml⁻¹

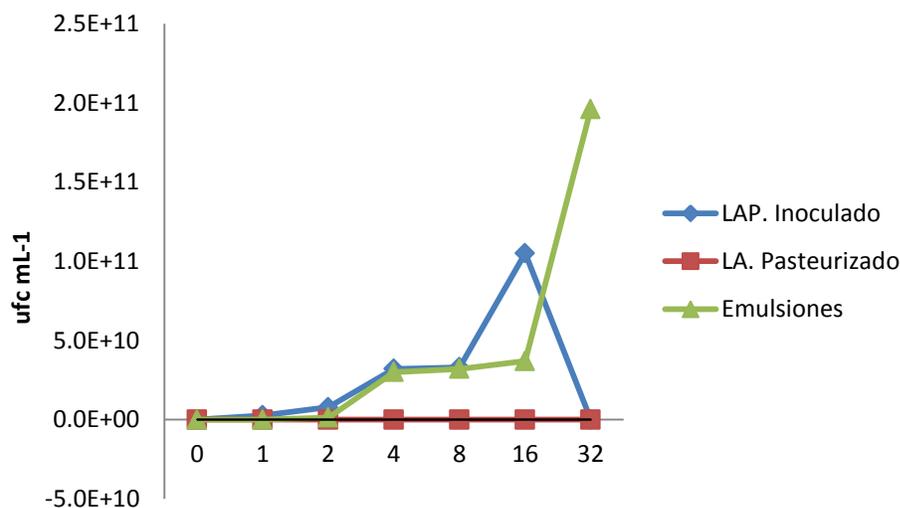


Figura 7.7 Cinética de crecimiento de bacterias ácido lácticas en tres tratamientos. a) lactosuero ácido pasteurizado b) lactosuero ácido pasteurizado e inoculado con *L. rhamnosus* c) entrampamiento de *L. rhamnosus* en emulsiones dobles.

De acuerdo a lo anterior podemos establecer que la bacteria probiótica si tiene efecto de conservación del suero. Aunque se puede afirmar que el entrampamiento del probiótico tiene una mayor viabilidad en el crecimiento de microorganismos como en el tiempo de conservación.

Este estudio muestra, como se indica en la literatura, que el producto puede tener cualidades probióticas, debido a que la proporción de microorganismos es mayor a 1×10^7 ufc por mililitro (González, Romero y Jiménez, 1994). Según el INTA (2007), los productos probióticos, deben contener 10^7 bacterias por mililitro, valor que es menor al encontrado en este trabajo. Por lo que se puede afirmar que es apropiado utilizar *L. rhamnosus* como probióticos, en la conservación de lactosuero ácido. Lo cual también concuerda con lo expresado por Haines (2000) y Health Professionals (2000).

Capítulo 8

Conclusiones

8. CONCLUSIONES

Con el uso de emulsiones múltiples para encapsular la bacteria probiótica *L. rhamnosus* e inocular el lactosuero se conservaron las propiedades nutricionales de este subproducto lácteo, con una mayor concentración de bacterias probióticas, de azúcares y proteínas en comparación con los otros tratamientos (LAP y LAP).

El entrapar *L. rhamnosus* en emulsiones dobles influyó positivamente en la conservación del lactosuero a temperatura ambiente. Por lo tanto por la concentración encontrada de la bacteria *L. rhamnosus* encapsulada de 1.9×10^{11} ufc/mL en el tratamiento LAE puede ser considerado un alimento funcional.

Capítulo 9

Recomendaciones

9. RECOMENDACIONES

Se recomienda:

- Realizar pruebas con animales de consumo con el alimento funcional (probióticos entrampados)
- Así como pruebas de rendimiento en peso de animales.
- Y Pruebas *invitro* de lactosuero en bacterias de *Escherichia coli*.

Capítulo 9

Referencias

10. REFERENCIAS

- Aasen, I. M., Møretrø, T., Katla, T., Axelsson, L., & Størrø, I. (2000). Influence of complex nutrients, temperature and pH on bacteriocin production by *Lactobacillus sakei* CCUG 42687. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 53, 159-166.
- Adachi, S., Imaoka, H., Hasegawa, Y., & Matsuno, R. (2003). Preparation of a water-in-oil-in-water (W/O/W) type microcapsules by a single-droplet-drying method and change in encapsulation efficiency of a hydrophilic substance during storage. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 67(6), 1376-1381.
- Adhikari, K., Mustapha, A., Grün, I. U., & Fernando, L. (2000). *Viability of microencapsulated bifidobacteria in set yogurt during refrigerated storage. Journal of Dairy Science*, 83, 1946-1951.
- Alais Ch. (1985). *Ciencia de la leche. Principios de técnicas lecheras*. Reverté, S.A. Barcelona, España 873 pp.
- Almeida, K. E., Tamime, A. Y., Oliveira, M. N. (2008). Acidification rates probiotic bacteria in Minas frescal cheese whey. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie – Food Science and Technology*, 41(2), 311-316.
- Alvarez-Olmos.M.I.,Oberthelma.R.A. (2001). *Probiotic agents and infectious diseases: A modern perspective on a traditional therapy*. Clin Infect Dis; 32: 1567-1576.
- Amiot, J. (1991). *Ciencia y tecnología de la leche*. Traducción al español de Oria, R. Ed. Acribia, S.A. Zaragoza, España.
- Amores R., A. Calvo, J.R Maestre y Martínez –Hernández D. (2004). Probióticos. *Quimioterapia. Prous Science, S.A. Sociedad Española de Quimioterapia*. 17 (2): 131-139.
- Anal, A. K., & Singh, H. (2007). Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. *Trends in Food Science & Technology*, 18, 240-251.

- AOAC(1995). *Official methods of analysis of AOAC*, 16th ed., Arlington, VA: Association of Official Analytical Chemists, pp. 12-14.
- AOAC(1999). pH-metric Acid Value Determination in Oilseeds without Titration. *Official methods of analysis of AOAC, Association of Official Analytical Chemists*.
- Armuzzi, A., Cremonini, F., Bartolozzi, F., Canducci, F., Candelli, M., Ojetti, V., Cammarota, G., Anti, M., De Lorenzo, A., Pola, P., Gasbarrini, G., & Gasbarrini, A. (2001). The effect of oral administration of *Lactobacillus GG* on antibiotic-associated gastrointestinal side effects during *Helicobacter pylori* eradication therapy. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 15, 163-169.
- Astiasarán I y A. Martínez (1999). *Alimentos, Composición y Propiedades*. Mc.Graw-Hill. Interamericana España, 1ª edición.
- Axelsson, L. (1998). Lactic acid bacteria: classification and physiology. En: Salminen, S., Von Wright, A., eds. *Lactic acid bacteria: microbiology and functional aspects*. 2a. ed. Nueva York: Marcel Dekker Inc, pp. 1–72.
- Baró, L., Jiménez, J., Martínez-Feréz, A., & Bouza, J. J. (2001). *Bioactive milk peptides and proteins*. *Ars Pharmaceutica*, 42 (3-4), 135-145.
- Becher, P. Emulsion: *Theory and Practice*. Reinhold, New York, (1965).
- Bello J. (1995). Los alimentos funcionales o nutracéuticos. Nueva gama de productos en la industria alimentaria. *Alimentaria*. 265: 25-29.
- Bello, J. (2000). Alimentos con propiedades saludables especiales. En *Alimentos composición y propiedades*. Ed. Mc.Graw-Hill. Interamericana España, 1ª edición. Astiasarán I, Martínez A. Cap15: 343-355.
- Bergenstahl, G. (1997). Physicochemical aspects of emulsifier functionality. En: Hasenhuettl, G. L. y Hartel, R. W. (Eds.), *Food Emulsifiers and Their Applications*, Chapman and Hall, Nueva York, chap. 6. pp. 147-172.
- Bernet, M. F., Brassart, D., Neeser, J.-R., & Servin, A. L. (1994). *Lactobacillus acidophilus* LA-1 binds to cultured human intestinal cell lines and inhibits

- cell-attachment and cellinvasion by enterovirulent bacteria. *Gut*, 35, 483–489.
- Biruete G.A., E. Juárez H., P. Romero V. y J.L. Silencio B. (2009). Los nutracéuticos, lo que es conveniente saber. *Mexicana de Pediatría*. 76 (3): 136-145.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248
- Britten, M., & Giroux, H. J. (1991). Emulsifying properties of whey protein and casein composite blends. *Journal of Dairy Science*, 74, 3318-3325.
- Brook. I. (1999) Bacterial interference. *Crit Rev Microbiol*; 25: 155-172.
- Campos, M. R. G. (2007). Alternativas para el tratamiento de lactosuero para un desarrollo sostenible en el valle de Tulancingo, Hidalgo. Editado por Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Pachuca, Hidalgo, México. pp. 24-40.
- Chandan.R.C.(1990). Enhancing market value of milk by adding cultures. *J. Dairy Sci*; 82: 2245-2256.
- Charcosset, C., Limayem, I., & Fessi, H. (2004). The membrane emulsification process –a review-. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 79, 209-218.
- Charteris, W. P., Kelly, P. M., Morelli, L., & Collins, J. K. (1998). Development and application of an in vitro methodology to determine the transit tolerance of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in the upper human gastrointestinal tract. *Journal Applied of Microbiology*, 84, 759–768.
- Cheryan, M. (1986). *Ultrafiltration Handbook*. Technomic Publ. Co., Inc., Lancaster, PA. p. 243.
- Csóka, I. y Erős, I. (1997). Stability of multiple emulsions I. Determination of factors influencing multiple drop breakdown. *International Journal of Pharmaceutics*, 156,119-123.

- Dalgleish, D. G. (1996). Food emulsions. En: J. Sjöblom, (ed.), *Emulsion and Emulsion stability*, Marcel Dekker, Nueva York, NY, p. 287.
- Damodaran, S. (1996). Amino acids, peptides and proteins. En: Fennema, O. R. (ed.), *Food Chemistry*. 3a. ed., Marcel Dekker, Nueva York. pp. 321.
- De Man, J.C., Rogosa, M y Sharpe, M.E (1960). A médium for the cultivation of lactobacillus. *Journal of applied Bacteriology*. 23(1): 130-135.
- Desai, A. R., Powell, I. B., & Shah, N. P. (2004). Survival and activity of probiotic lactobacilli in skim milk containing prebiotics. *Journal of Food Science*, 69, FMS57-FMS60.
- De Roos NM., B. Katan M.(2000). Effects of probiotic bacteria on diarrhoea, lipid metabolism and carcinogenesis: a review of papers published between 1988-1998. *Am J Clin Nutr*;71:405-11.
- Dickinson, E. (1989). Surface and emulsifying properties of caseins. *Journal of Dairy Research*, 56, 471.
- Dickinson, E. (2011). Protein-polysaccharide interactions in food colloids. En: *Food colloids and polymers: stability and mechanical properties* (ed. E. Dickinson & P. Walstra), pp. 77-93. Cambridge: Woodhead Publishing Limited
- Dickinson, E. (2003). Hydrocolloids at interfaces and the influence on the properties of dispersed systems. *Food Hydrocolloids*, 17, 25-39.
- Dickinson, E., & Matsumura, Y. (1991). Time-dependent polymerization of κ lactoglobulin through disulphide bonds at the oil-water interface in emulsions. *International Journal of Biological Macromolecules*, 13, 26-30.
- Dickinson, E. & McClements, D.J. (1996). *Advances in Food Colloids*. Blackie Academic & Professional, Londres, Inglaterra, pp 333.
- Durán C R. Valenzuela B. (2010). La experiencia japonesa con los alimentos FOSHU: ¿Los verdaderos alimentos funcionales? [citado 2012 Ene 04]; 37(2): 224-233.http://www.scielo.cl/scielo.phpscript=sci_arttext&pid.
- Erős, I., Balázs, J., Csóka, I., & Mustafa, Sz. (1990). Investigation of the stability of drug containing multiple phase emulsions. *Acta Physica et Chemica Universitatis Szeged*, 36, 16-26.

- Famuralo. G., de Simone, C., Mateeuzzi, D., Pirovano, F. (1999). Traditional and high potency probiotic for oral bacteriotherapy. *Bio-Drugs*; 12: 455-470.
- FAO/WHO. 2001. Food and Agriculture Organization of the United Nations-World Health Organization. Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. *Report of a Joint*
- Ferrer L. B y J. Dalmau S. (2001). Alimentos funcionales: probióticos. Nutrición infantil. *Acta pediátrica española*. 59(3): 150-153
- Florence, A. T., & Whitehill, D. (1981). Some features of breakdown in water-in-oil-in-water multiple emulsions. *Journal of Colloid and Interface Science*. 79, 243-256.
- Fons. M., Gómez., A. Karjalainen, T. (2000). Mechanisms of colonisation and colonisation resistance of the digestive tract. *Microbiol Ecol Health Dis*. Suppl 2: 240-246.
- Forestier Ch, De Champs Ch, Vatoux C, Joly B. (2001). Probiotic activities of *Lactobacillus casei rhamnosus*: in vitro adherence to intestinal cells and antimicrobial properties. *Res Microbiology*; 152:167-73.
- Fox P.F. y McSweeney P.L.H. (1998). Dairy chemistry and biochemistry. Blackie Academic & Professional, Londres, 478 pp.
- Fuller, R. (1989). Probiotics in man and animals. *Journal of Applied Bacteriology*, 66, 365– 378
- Fuller R. (1992). Probiotics: *The Scientific basic*. Chapman and Hall, London, p.1-10.
- Gandhi, D. N., & Patel, R. S. (1994). Technology and keeping quality of fermented whey concentrate. *Cultured Dairy Products Journal*, 29, 25-27.
- Gardiner, G. E., Ross, R. P., Kelly, P. M., & Stanton, C. (2002). Microbiology of therapeutic milks. En: R. K. Robinson (ed.), Dairy microbiology Handbook, 3a. ed. John Wiley & Sons Inc., Nueva York. pp. 431-478.
- Garti, N. (1997). Progress in stabilization and transport phenomena of double emulsions in food applications – review article-. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, 30, 222- 235.

- Garti, N. & Aserín, A. (1996). Pharmaceutical emulsions, double emulsions, and microemulsions. En: S. Benita (ed.), *Microencapsulation, methods and industrial applications*, Marcel Dekker, Inc., capítulo 15, Nueva York., pp. 411-534.
- Gatje, G. & Gottschalk, G. (1991). Limitation of growth and lactic acid production in batch and continuous cultures of *Lactobacillus helveticus*. *Applied Microbiology Biotechnology*. 34, 446-449.
- Geiger, S., Tokgoz, A., Fructus, A., Jager-Lezer, N., Seiller, M., Lacombe, C., & Grossiord, J. L. (1998). Kinetics of swelling-breakdown of W/O/W multiple emulsions: possible mechanisms for the lipophilic surfactante effect. *Journal of Control Release*. 52, 99-107.
- Gill, H. S., Rutherford, K. J., Cross, M. L., Gopal, P. K. (2001). Enhancement of immunity in the elderly by dietary supplementation with the probiotic *Bifidobacterium lactis* HN019. *American Journal of Clinical Nutrition*, 74, 833-839.
- Gillies, M. T. (1974). Whey processing and utilization economic and technical aspects. *Noyes Data Corp.* Park Ridge, New Jersey, EUA.
- Gismondo, M. R., Drago, L., & Lombardi, A. (1999). Review of probiotics available to modify gastrointestinal flora. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 12, 287-292.
- Godward, G., & Kailasapathy, K. (2003b). Viability and survival of free, encapsulated and coencapsulated probiotic bacteria in ice-cream. *Milchwissenschaft*, 58, 161-164.
- Gonçalves, L. M. D., Ramos, A., Almeida, J. S., Xavier, A. M. R. B., & Carrondo, M. J. T. (1997). Elucidation of the mechanism of lactic acid growth inhibition and production in batch cultures of *Lactobacillus rhamnosus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 48, 346-350.
- González-Flores, T., González-Burgos, A., Guerrero-Legarreta, I., & Zamudio-Maya, M. (2003). Evaluación de la actividad probiótica *in vitro* de bacterias ácido lácticas aisladas de sustratos nativos del Estado de Yucatán. X

- Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. Puerto Vallarta Jalisco, México.
- González, J.I., C. Romero y S. Jiménez. (1994) Control de calidad en la fabricación del yogur. Alimentos. *Equipos Tecnológicos* 13(6):77-81.
- Gopal, P. K., Prasad, J., Smart, J., & Gill H. S. (2001). In vitro adherence properties of *Lactobacillus rhamnosus* DR20 and *Bifidobacterium lactis* DR10 strains and their antagonistic activity against an enterotoxigenic *Escherichia coli*. *International Journal of Food Microbiology*, 67, 207–216.
- Guarner, F., & Schaafsma, G. J. (1998). Probiotics. *International Journal of Food Microbiology*, 39, 237-238.
- Guerin, D., Vuilleumard, J. C., & Subirade, M. (2003). Protection of bifidobacteria encapsulated in polysaccharide-protein gel beads against gastric juice and bile. *Journal of Food Protection*, 66, 2076–2084.
- Gulahmadov, S.G., Batdorj, B., Dalgalarondo, M., Chobert, J.M., Kuliev, A.A. & Haertle, T. (2006) Characterization of bacteriocin-like inhibitory substances (BLIS) from lactic acid bacteria isolated from traditional Azerbaijani cheeses. *European Food Research and Technology*, 224 (2), 229-235.
- Haines, H. 2000. Probiotics: positive actinobacteria delivered through dairy foods. En: <http://www.nutraceuticals.com/apr002.htm>. Consulta: Noviembre 2011.
- Hasenhuettl, G. L. 1997. Overview of food emulsifiers. En: Hasenhuettl, G. L. & Hartel, R. W., (Eds.). *Food Emulsifiers and Their Applications*. Chapman and Hall, Nueva York.
- Hasler CM. (2000). The changing face of functional foods. *J. Am. Coll. Nutr.* 19: 499S-506S.
- Hartman, G (1976). *Sludge Management and Disposal for the Practicing Engineer*, Ed. Lewis publisher Inc. pp. 341, Estados Unidos.
- Hatakka, K., Ahola, A. J., Yli-Knuutila, H., Richardson, M., Poussa, T., Meurman, J. H., Korpela, R. (2007). Probiotics reduce the prevalence of oral candida in

- the elderly - a randomized controlled trial. *Journal of Dental Research*, 86, 125-130.
- Hatakka K, Savilahti E, Pönkä A, Meurman JH, Poussa T, Näse L, (2001). Effect of long term consumption of probiotic milk on infections in children attending day care centres: *double blind, randomised trial*. *BMJ*; 322:1327-9.
- Health Professionals. 2000. Probiotics – friendly bacteria with a host of benefits. En: http://www.dairy.coucilofca.org/hp/hp_pbio.htm. Consulta: Enero 2012.
- Hernández, B.C., S. Serna S. (2003). Tecnología de alimentos nutracéuticos: el futuro de nuestra alimentación. Investigación y extensión del campus Monterrey. 16 (61)
- Hernández, C. P. (2009). Probióticos y Prebióticos. Departamento de Nutrición y Bromatología III. Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid. 201-214.
- Hold, G., Pryde, S., Russell, V., Furrie, E., & Flint, H. (2002). Assessment of diversity in human colonic samples by 16S rRNA sequence analysis. *FEMS Microbiology Ecology*, 39, 33-39.
- Holzapfel, W. H., Haberer, P., Snel, J., Schillinger, U., & Huis in't Veld, J. H. J. (1998). Overview of gut flora and probiotics. *International Journal of Food Microbiology*, 41, 85– 101.
- Holzapfel, W. H., Haberer, P., Geisen, R., Björkroth, J., & Schillinger, U. (2001). Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *American Journal of Clinical Nutrition*, 73, 365S–373S.
- Holzapfel, W. H., & Schillinger, U. (2002). Introduction to pre- and probiotics. *Food Research International*, 35, 109-116.
- Hou, R. C. W., Lin, M. Y., Wang, M. M. C., & Tzen, J. T. C. (2003). Increase of viability of entrapped cells of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* in artificial sesame oil emulsions. *Journal of Dairy Science*, 86, 424-428.
- Hou, W., & Papadopoulos, K. D. (1996). Stability of water-in-oil-in-water type globules. *Chemical Engineering Science*, 51 (22), 5043-5051.
- Hove, H., Nordgaard-Andersen, I, Mortensen, P. B. (1994). Effect of lactic acid bacteria on the intestinal production of lactate and short-chain fatty acids,

- and the absorption of lactose. *American Journal of Clinical Nutrition*, 59, 74–79.
- Hughes, D. B., & Hoover, D. G. (1991). Bifidobacteria: Their potential for use in American dairy products. *Food Technology*, 45 (4), 74-83.
- Hunt, J. A., & Dalgleish, D. G. (1994). Adsorption behaviour of whey protein isolate and caseinate in soya oil-in-water emulsions. *Food Hydrocolloids*, 8:175-187.
- IDF (2002). World Dairy Situation 2002, Document No. 378, *International Dairy Federation*, Bruselas, Bélgica, pp 60,
- Instituto de Nutrición y Tecnología de alimentos. INTA. 2007. ¿Qué son los probióticos?. En: <http://www.inta.cl/consumidor/probioticos.htm>. Consulta: Octubre 2011.
- Jackson K.J., J. Taylor R., M Clossy A. (1999). The effect of the daily intake of inulin and glucose concentration in middle-aged men and women. *Br J Nutr*;82:22-30.
- Jawetz, E. col. (1996). Microbiología médica. 15ava. Edición. Edit. *Manual Moderno. México*.
- Kailasapathy, K. (2002). Microencapsulation of probiotic bacteria: technology and potential applications. *Current Issues in Intestinal Microbiology*, 3, 39–48.
- Kashket, E. R. (1987). Bioenergetics of lactic acid bacteria: cytoplasmic pH and osmotolerance. *FEMS Microbiology Reviews*. 46, 233-244.
- Khalil, A. H., & Mansour, E. H. (1998). Alginate encapsulated bifidobacteria survival in mayonnaise. *Journal of Food Science*, 63, 702–705.
- Krasaekoopt, W., Bhandari, B., & Deeth, H. (2003). Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt. *International Dairy Journal*. 13, 3-13.
- Kobayashi, I., Yasuno, M., Iwamoto, S., Shono, A., Satoh, K., y Nakajima, M. (2002). Microscopic observation of emulsion droplet formation from a polycarbonate membrane. *Colloids Surf A*. 207, 185-196.

- Konema W.E., S Allen D., V. Dowell R., H. Sommers m. (1989). Diagnostico microbiológico. Texto y atlas color. Traducción de editorial Médica Panamericana S.A. por Dra. Aida Victoria Wasserman. Mexico. D.F.
- Kopp-Hoolihan L.(2001) Prophylactic and therapeutic uses of probiotics: a review. *J Am Diet Ass*;101:229-38.
- Kung L. (1999). Productos microbianos para alimentación directa y enzimas en la nutrición de rumiantes. Memorias del seminario de biotecnología para la alimentación animal- Amena. Septiembre 2-3. México, D.F. p 1-6
- Levine, M. M. (1987). *Escherichia coli* that causes diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic, and enteroadherent. *Journal of Infectious Diseases*, 155, 377–389.
- Lian, W. C., Hsiao, H. C., & Chou, C. C. (2003). Viability of microencapsulated bifidobacteria in simulated gastric juice and bile solution. *International Journal of Food Microbiology*, 86, 293-301.
- Liew, S. L., Ariff, A. B., Raha, A. R. y Ho, Y. W. (2005). Optimization of medium composition for the production of a probiotic microorganism, *Lactobacillus rhamnosus*, using response surface methodology. *International Journal of Food Microbiology* 102 137– 142.
- Lilly, D.M., & Stillwell, R. H. (1965). Probiotics: growth promoting factors produced by microorganisms. *Science*, 147, 747–748.
- Lin, D. C. (2003). Probiotics as functional foods. *Nutrition in Clinical Practice*, 18, 497-506.
- Lobato-Calleros, C., Martínez-Torrijos, O., Sandoval-Castilla, O., Pérez-Orozco, J. P., & Vernon-Carter, E. J. (2004). Flow and creep compliance properties of reduced-fat yoghurts containing protein-based fat replacers. *International Dairy Journal*, 14 (9), 777-782
- Lobato-Calleros, C., Ramos-Solís, L., Santos-Moreno, A., & Rodríguez-Huezo, M. E. (2006). Microstructure and texture of panela type cheese-like products: use of low methoxyl pectin and canola oil as milk-fat substitutes. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 5, 71-79.

- Macedo, M. G., Lacroix, C., Gardner, N. J., & Champagne, C. P. (2002). Effect of medium supplementation on exopolysaccharide production by *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595M in whey permeate. *International Dairy Journal*, 12, 419–426.
- Macfarlane, G.T., Cummings, H.J. (1999). Probiotics and prebiotics: Can regulating the activities of intestinal bacteria benefit health. *BMJ* 318: 999-1003.
- Macfarlane, G. T., & Cummings, J. (2002). Probiotics, infection and immunity. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 15, 501-506.
- Madureira, A. R., Gião, M. S., Pintado, M. E., Gomes, A. M. P., Freitas, A. C., & Malcata, X. (2005). Incorporation and survival of probiotic bacteria in whey cheese matrices. *Journal of Food Science*, 70 (3), M160-M165.
- Marteau, P. R., de Vrese, M., Cellier, C. J., & Schrezenmeir, J. (2001). Protection from gastrointestinal diseases with the use of probiotics. *American Journal of Clinical Nutrition*, 73, S430-S436.
- Matsumoto, S. (1987). W/O/W-type emulsions in non-ionic surfactants, science series. En: Schick, M. J. (Ed.), *Nonionic Surfactants: Physical Chemistry*. Marcel Dekker. Nueva York, 23, 549-600.
- McClements, D. J. (1999). *Food emulsions. Principles, practice, and techniques*. CRC Press. EUA. pp. 378.
- McCracken, V. J., & Gaskins, H. R. (1999). Probiotics and the immune system. En *Probiotics: A Critical Review* (Ed. G. W. Tannock), pp. 85–111. Wyomondham: Horizon Scientific Press
- Metchnikoff, E. (1908). *Prolongation of life*. Nueva York: Putnam.
- Moras M. R., L. C. Hernández C., A. Quintero L., C. Pérez A., R. G. Campos M., E. J. Vernon C. y D. J. Pimentel G. (2010). Influencia de *L. rhamnosus* en la conservación de lactosuero para alimento animal. XXXI Encuentro Nacional de AMIDIQ, *Academia Mexicana de Ingeniería Química A.C.*, México 978-970-764-976-7

- Mukhopadhyay, R., Talukdar, D., Chatterjee, B. P., & Guha, A. K. (2003). Whey processing whit chitosan and isolation of lactose. *Process Biochemistry*, 39, 381-385.
- Myllyluoma, E., Veijola, L., Ahlroos, T., Tynkkynen, S., Kankuri, E., & Vapaatalo, H. (2005). Probiotic supplementation improves tolerance to *Helicobacter pylori* eradication therapy - A placebo controlled, double-blind randomized pilot study. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 21, 1263–1272.
- Narayanan, N., Roychoudhury, P. K., & Srivastava, A. (2004). Isolation of adh mutant of *Lactobacillus rhamnosus* for production of L(+) lactic acid. *Electronic Journal of Biotechnology*, 7, 72-84.
- Nikolaou, E. Tzanetakis, N. Litopoulou, T. E., & Robinson, R. K. (2002). Changes in the microbiological and chemical characteristics of an artisanal, low-fat cheese made from raw ovine milk during ripening. *International Journal of Dairy Technology*, 55, 12-17.
- NMX-AA-008-SCFI-2011. Norma Mexicana. Análisis de agua - Determinación del pH - método de prueba.
- NOM-035-SSA1-1993 Norma Oficial Mexicana. Bienes y Servicios, Quesos de suero, Especificaciones sanitarias.
- NOM-092-SSA1-1994 Norma Oficial Mexicana. (1994). Bienes y Servicios. Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa.
- NOM-113-SSA1-1994 Norma Oficial Mexicana. (1994). Bienes y Servicios. Método para la cuenta de microorganismos coliformes totales en placa.
- NOM-121-SSA1-1994 Norma Oficial Mexicana. (1994). Bienes y Servicios. Quesos: Frescos, Madurados y Procesados. Especificaciones Sanitarias.
- O’Riordan, K. O., Andrews, D., Buckle, K., & Conway, P. (2001). Evaluation of microencapsulation of a *Bifidobacterium* strain with starch as an approach to prolonging viability during storage. *Journal of Applied Microbiology*, 91, 1059–1066.

- Otte, J. M., & Podolsky, D. K. (2004). Functional modulation of enterocytes by gram-positive and gramnegative microorganisms. *American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology*, 286, G613-G626.
- Oxman T, Shapiro M, Klein R. (2001). Oral administration of *Lactobacillus* induces cardioprotection. *J Altern Complement Med* ;7:745-54.
- Palou A y F. Serra (2000). Perspectivas europeas sobre alimentos funcionales. *Alimentación, Nutrición y Salud*. 7 (3), 76-90.
- Parker, R., (1974). Probiotics, the other half of the antibiotic story. *Animal Nutrition and Health*, 29, 4–8.
- Patel, M. T., & Kilara, A. (1990). Studies on whey protein concentrates. 2. Foaming and emulsifying properties and their relationships with physicochemical properties. *Journal of Dairy Science*. 73, 2731-2740.
- Pearl S. E., L. Berg R., D. Martin W., C. Ville (1998). *Biología de Ville*. McGraw-Hill Interamerican editores, S.A. de C.V. Cuarta edición. México. D.F
- Petersson, H. E. (1988). Mesophilic starters. *Bulletin International Dairy Federation*. p. 227.
- Phillips, M., Kailasapathy, K. y Tran L. (2006). Viability of commercial probiotic cultures (*L. acidophilus*, *Bifidobacterium sp.*, *L. casei*, *L. paracasei* and *L. rhamnosus*) in cheddar cheese. *International Journal of Food Microbiology* 108, 2, 276-280.
- Picot, A., & Lacroix, C. (2004). Encapsulation of bifidobacteria in whey protein-based microcapsules and survival in simulated gastrointestinal conditions and in yogurt. *International Dairy Journal*, 14, 505-515.
- Pimentel-González D., Revah S., Campos-Montiel R., Monroy-Hermosillo O., & Vernon-Carter E.J. (2008). A laboratory study of the biodegradation of MTBE solubilised in water by a microbial consortium entrapped in a water-in-oil-in-water double emulsion. *Process Biochemistry*. 43, 1239–1243.
- Pintado, M. E., Macedo, A. C., & Malcata, F. X. (2001) Review: Technology, Chemistry and Microbiology of whey cheeses. *Food Science and Technology International*, 7 (2), 105- 116.

- Playne, M. J., Benner, L. E., & Smithers, G. W. (2003). Functional dairy foods and ingredients. *Australian Journal of Dairy Technology*, 58, 242-264.
- Pszczola, D.E. (1999). Nutraceuticals that take the form of candy and snacks. *Food Technol.*, 43 (10), 74-80.
- Rao, A. V., Shivnarain, N., & Maharaj, I. (1989). Survival of microencapsulated *Bifidobacterium pseudolongum* in simulated gastric and intestinal juices. *Journal of Canadian Institute on Food Science and Technology*, 22, 345-349.
- Rebollo, P. O. N., Pérez, M. C., & Leal, T. G. (1994). Producción de probióticos para alimentación animal a partir de residuos agroindustriales: Suero de quesería. V Reunión bienal de nutrición animal. Universidad Autónoma Agrícola Antonio Narro.
- Reid, G. (1999). The scientific basis for probiotic strains of *Lactobacillus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 3763–3766.
- Reid G. (2001). Probiotic agents to protect the urogenital tract against infection. *Am J Clin Nutr*, 73 (Suppl):S437-43.
- Reid, G., Gan, B. S., She, Y. M., Ens, W., Weinberger, S., & Howard, J. C. (2002). Rapid identification of probiotic *Lactobacillus* biosurfactant proteins by ProteinChip tandem mass spectrometry tryptic peptid sequencing. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 977-980.
- Reid, G., Jass, J., Sebulsky, M. T., & McCormick, J. K. (2003). Potential uses of probiotics in clinical practice. *Clinical Microbiology Reviews*, 16(4), 658-672.
- Reuter, G. (1969). Zusammensetzung und Anwendung von Bakterienkulturen fürtherapeutische Zwecke. (Composition and use of bacterial cultures for therapeutical purposes). *Arzneimittelforschung Drug Research*, 50, 951–954
- Reuter, G. (2001). The *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* microflora of the human intestine: composition and succession. *Current Issues in Intestinal Microbiology*, 2, 43-53.
- Roberfroid MB. (2000). Concepts and strategy of functional food science: the European perspective. *Am. J. Clin. Nutr.* 71(6): 1669S-1664S.

- Robison. K. R. (2002). The microbiology of milk and milk products. Handbook: *Dairy Microbiology*. 3a. edition Wiley-Interscience. Londres, Inglaterra, p. 8-10.
- Rodríguez-Huezo, M. E., Pedroza-Islas, R., Prado-Barragán, L. A., Beristain, C. I. & Vernon- Carter, E. J. (2004). Microencapsulation by spray-drying of multiple emulsions containing carotenoids. *Journal of Food Science*, 69:E351-E359.
- Rodríguez M.J., E. Jiménez, V., Merino, A. Maldonado, M.L. Marín, L. Fernández, R. Martín (2008) Microbiota de la leche humana en condiciones fisiológicas. Nutrición infantil. Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos. Universidad Complutense de Madrid. *Acta Pediátrica*. España. 66(2): 77-82
- Rogosa, M., Franklin, J. G., & Perry, K. D. (1961). Correlation of the vitamin requirements whit cultural and biochemical characters of *Lactobacillus* subsp. *Journal of General Microbiology*, 24, 473-482.
- Ross, R. P., Desmond, C., Fitzgerald, G. F., & Stanton, C. (2005). Overcoming the technological hurdles in the development of probiotic foods. *Journal of Applied Microbiology*, 98, 1410-1417.
- Saarela. M., Mogensen. G., Fondén. R., Mättö. J., Mattila-Sandholm. T. (2000). Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *J Biotechnology*, 84: 197-215.
- Saito, H., Watanabe, T., & Tado, O. (1980). Protective effects of *lactobacilli* on experimental *Escherichia coli* infection. *Medicine and Biology*, 101, 61-64.
- Salminen, S. (1996). Functional dairy foods with *Lactobacillus strain* GG. *Nutrition Reviews*, 54, 99–101.
- Sanders, M. E. (1994). Lactic acid bacteria as promoters of human health. En: Functional foods: designer foods, pharmafoods, nutraceuticals (ed. Goldberg I), pp. 294–322. Nueva York: Chapman & Hall
- Santosa, S., Farnworth, E. y Jones, P.J.H. (2006). Probiotics and their potential health claims. *Nutrition Reviews* 64, 6, 265-274.

- Sanz, B. (2009) Alimentos funcionales y nutraceuticos. El variado mundo de los alimentos funcionales, nutraceuticos y suplementos dieteticos. Instituto de España, p. 167-168
- Scott, R. (1991). *Fabricación de queso*. Editorial Acribia. Zaragoza, España. pp. 313-320.
- Schillinger, U. (1999). Isolation and identification of lactobacilli from novel-type probiotic and mild yoghurts and their stability during refrigerated storage. *International Journal of Food Microbiology*, 47, 79-87.
- Sha, N. P. (2000). Probiotic bacteria: Selective enumeration and survival in dairy foods. *Journal of Dairy Science*, 83, 894-907.
- Shahidi, F. (2002) Research Addresses Bioactive Components. *Food Technol.*, 56 (5), 23
- Shima, M., Morita, Y., Yamashita, M., & Adachi, S. (2006). Protection of *Lactobacillus acidophilus* from the low pH of a model gastric juice by incorporation in a W/O/W emulsion. *Food Hydrocolloids*, 20, 1164–1169.
- Silva. S. G. (1998). Treceavo Curso Nacional de Fabricación de Quesos Naturales. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Tulancingo. Hgo.
- Sholmo, M., Moshe, F., Garti, N. y Rodney, K. (1984). Multiple emulsions II: HLB shift caused by emulsifier migration to external interface. *Journal of Colloid and Interface Science*, 97, 374-379.
- Siuta-Cruce, P., & Goulet, J. (2001). Improving probiotic survival rates: microencapsulation preserves the potency of probiotic microorganisms in food systems. *Food Technology*, 55, 37–39.
- Spreer, D. E. (1991). Lactología industrial. Editorial Acribia S.A. Zaragoza, España. 2a. ed., pp. 527-538.España.
- Stanton, C., Gardiner, G., Lynch, P. B., Collins, J. K., Fitzgerald, G., & Ross, R. P. (1998). Probiotic cheese. *International of Dairy Journal*, 8, 491–496.
- Stanton, C., Gardiner, G., Meehan, H., Collins, K., Fitzgerald, G., Lynch, P. B., & Ross, R. P. (2001). Market potential for probiotics. *American Journal of Clinical and Nutrition*, 73, 476S–483S.

- Sultana, K., Godward, G., Reynolds, N., Arumugaswamy, R., Peiris, P., & Kailasapathy, K. (2000). Encapsulation of probiotic bacteria with alginate-starch and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions and yoghurt. *International Journal of Food Microbiology*, 62, 47-55.
- Tamime, A. Y., Marshall, V. M. E., & Robinson, R. K. (1995). Microbiological and technological aspects of fermented milks by bifidobacteria. *Journal of Dairy Research*, 62, 151-187.
- Tamime, A. Y., Saarela, M., Korslund Søndergaard, A., Mistry, V. V., & Shah, N. P. (2005). Production and maintenance of viability of probiotic micro-organisms in dairy products. En: *Probiotic dairy products* (ed. Tamime A. Y.), pp. 39-72. Oxford: Blackwell Publishing
- Tamine, A.Y. and R.K. Robinson. 1988. Fermented milks with a host of benefits. URL: http://www.dairycount.org/hp/hp_pbio.htm and their future trends: II. Technological aspects. *J. Dairy cilofca.org/hp/hp_pbio.htm*. Consulta: Enero 2012. Res. 55(2):281-30
- Tojo S. R, R. Leis T. y R. Tojo G. (2003). Probióticos y prebióticos en la salud enfermedad del niño. Prebióticos y probióticos: mecanismos de acción y sus aplicaciones clínicas. *Gastroenterol Hepatol*. 26 (1): 37-49
- Tseng, C. P., Montville, T. J. (1993). Metabolic regulation of end product distribution in lactobacilli: causes and consequences. *Biotechnology Progress*, 9, 113-121.
- Tokgoz, N. S., Grossiord, J. L., Fructus, A., Seiller, M., & Prognon, P. (1996). Evaluation of two fluorescent probes for the characterization of W/O/W emulsions. *International Journal of Pharmaceutics*. 141, 27-37.
- Tomasik, P.J., and Tomasik, P. (2003). "Probiotics and prebiotics". *Cereal Chem.*, 80(2):113-117
- Travelyan, W. E. & Harrison, J. S. (1952). Fractionation and microdetermination of cell carbohydrates. *Journal of Biochemistry*. 50, 298
- Van der Wielen, P. W., Lipman, L. J., van Knapen, F., & Biesterveld, S. (2002). Competitive exclusion of *Salmonella enteric* serovar Enteritidis by

- Lactobacillus crispantus and Clostridium lactatifermentans in a sequencing fed-batch culture. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 555-559.
- Vasconcellos JA. (2000). Alimentos funcionales. Conceptos y beneficios para la salud. *World food science*. http://www.worldfoodscience.org/vol1_3/feature1-3a.html. Consulta: 13 de febrero de 2012.
- Vernon-Carter, E.J., & Pimentel-González, D. J. (2007). Problemática ambiental derivada de las empresas queseras en el valle de Tulancingo, Hidalgo. En: Campos-Montiel, R.G. (Ed.), Alternativas para el tratamiento de lactosuero para un desarrollo sostenible en el valle de Tulancingo, Hidalgo. UAEH., Pachuca, Hidalgo, México.
- Vinderola, C. G., Bailo, N., & Reinheimer, J. A. (2000). Survival of probiotic microflora in Argentinian yoghurts during refrigerated storage. *Food Research International*, 33, 97– 102.
- Vladisavljevic, G. T. & Schubert, H. (2002). Preparation and analysis of oil-in-water emulsions with a narrow droplet size distribution using Shirasu-porous-glass (SPG) membranes. *Desalination*. 144:167-172.
- Vogel, H. C. & Todaro, C. L. (1996). Fermentation and biochemical engineering. Handbook. Principles, process design and equipment. 2a. Edition. Noyes. Nueva York, pp. 125-139.
- Walstra, P., Geurts, T. J., Noomen, A., Jellema, A., & Boekel, M. A. J. S. (1999). Dairy technology: *Principles of milk properties and process*. Marcel Dekker, New York, NY.
- Wilde, P., Mackie, A., Husband, F., Gunning, P., Morris, V. (2004). Proteins and emulsifiers at liquid interfaces. *Advances in Colloid Interface Science*. 108-09, 63-71
- Wildman R (2001). Nutracéuticos y Alimentos Funcionales. *CRC Press*, Boca Ratón, FL.

Young, S. L., Sarda, X., & Rosenberg, M. (1993). Microencapsulating properties of whey proteins. 1. Microencapsulation of anhydrous milk fat. *Journal of Dairy Science*, 76, 2868-2877.

Zeisel, S. H. (1999). Regulation of " nutraceuticals". *Science*, 285(5435), 1853-1855.

Capítulo 10

Anexos

XXXI Encuentro Nacional de la AMIDIQ

4 al 7 de Mayo de 2010, Huatulco Oaxaca

INFLUENCIA DE *L. rhamnosus* EN LA CONSERVACION DE LACTOSUERO PARA ALIMENTO ANIMAL

R. Moras-Montiel^a, L. C. Hernández-Cortés^a, A. Quintero-Liraa, C. Pérez-Alonso^b, R. G. Campos-Montiel^a, E. J. Vernon-Carter^c y D. J. Pimentel González^{a*}

^aCICYTA, ICAP-Universidad Autónoma del estado de Hidalgo, Av. Rancho Universitario S/N Km. 1, CP 43600 Tulancingo, Hgo., México, e-mail: dianajpg@gmail.com ^bDepto. de Ingeniería Química, Facultad de Química, Universidad Autónoma del Estado de México, Paseo Colón esq. Paseo Tollocan s/n. Col. Residencial Colón, C. P. 50120, Toluca, Edo. de México, México. ^cDepto. de Ingeniería de Procesos e Hidráulica, Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, Av. San Rafael Atlixco No. 186, Col. Vicentina, México, D.F., 09430, México

Introducción.

El lactosuero representa cerca del 90% del volumen de leche usada en la transformación de los productos lácteos y contiene la mayor parte de los compuestos solubles de la leche [1]. No obstante, su eliminación se ha convertido en uno de los problemas de mayor importancia desde el punto de vista industrial y de la salud pública [2], tan sólo en la región de Tulancingo, Hidalgo, se generan alrededor de 500,000 L diarios, por lo se requiere una alternativa viable de aprovechamiento de este subproducto. En este trabajo se propone utilizar el lactosuero como parte de la dieta de animales monogástrico por sus propiedades nutritivas, sin embargo se requiere observar las condiciones de manejo y conservación en las condiciones de la región y el tiempo de conservación del mismo.

Metodología

Se utilizó lactosuero proveniente de la elaboración de queso tipo Oaxaca. Se realizaron tres tratamientos, el lactosuero no pasteurizado (LNP), lactosuero pasteurizado (LP) y lactosuero pasteurizado inoculado al 1% (p/v) con *Lactobacillus rhamnosus* LC705 (LI) de DANISCOHOLDBAC™, se almacenaron a temperatura ambiente (21 °C) por 22 días y se les determinaron: azúcares totales (Antrona), proteína soluble (Bradford), pH y grasa (Gerber). Las bacterias ácido lácticas (BAL) fueron crecidas en agar MRS. Las mesófilas aerobias con agar para métodos estándar, y para coliformes se usó agar Mac Conkey.

Resultados y Discusión

El máximo crecimiento de mesófilas aerobias se pudo observar a los 8 días de almacenamiento y fue mayor en el LNP (6.77 Log₁₀ UFC/mL) comparado con LI y LP (5.48 y 3.3 Log₁₀ UFC/mL respectivamente). Por otro lado, en las BAL se tuvo una concentración de 5.97 Log₁₀ UFC/mL, indicando que el 100% del crecimiento en LI fueron BAL mientras que en LNP sólo el 40% de mesófilas correspondieron a BAL y en LP no se detectó crecimiento. En la Fig. 1 se muestran los resultados de coliformes totales en los 22 días de observación, al día cero, el LP tuvo una concentración de 0.56 Log₁₀ UFC/mL, mientras que para el LNP, 3.42 Log₁₀ UFC/mL, y en el LI no se detectó crecimiento de esta bacteria patógena en ningún día de observación.

En la tabla 1, se muestran los parámetros fisicoquímicos LNP, LP y LI. En carbohidratos, se observó al inicio una concentración similar en los tres tratamientos, concordando con Varnam [3], que indica que la concentración de azúcares en lactosuero varía entre un 42-50 g/L; se observó sin embargo una disminución significativa al final de 22 días, el LNP tuvo la menor concentración (3.47±0.19), mientras

COMITE ORGANIZADOR

Dr. Agustín Jaime Castro Montoya (Presidente AMIDIQ), Dr. Rubén González Núñez (Vice-Presidente AMIDIQ), Dr. Miguel Morales Cabreara (Secretario AMIDIQ), Dr. Juan Gabriel Segovia Hernández (Tesorero AMIDIQ), Dr. Mauricio Sales Cruz (Vocal Investigación AMIDIQ) y Dra. María del Rosario Enriquez Rosado (Vocal Docencia AMIDIQ)

XXXI Encuentro Nacional de la AMIDIQ

4 al 7 de Mayo de 2010. Huatulco Oaxaca

que el LP y el LI terminaron con 15 y 12 g/L respectivamente. Todo lo anterior debido al consumo de los carbohidratos como fuente de carbono por los microorganismos que crecieron en el lactosuero. En proteína se observó un aumento en los tres tratamientos después de 22 días, debido a la reproducción microbiana. La grasa no tuvo cambios al final del tiempo en ningún tratamiento. La acidez aumentó en todos los tratamientos por la fermentación realizada por los microorganismos en los 3 tratamientos, y se vio reflejado en el pH que disminuyó alrededor de una unidad logarítmica.

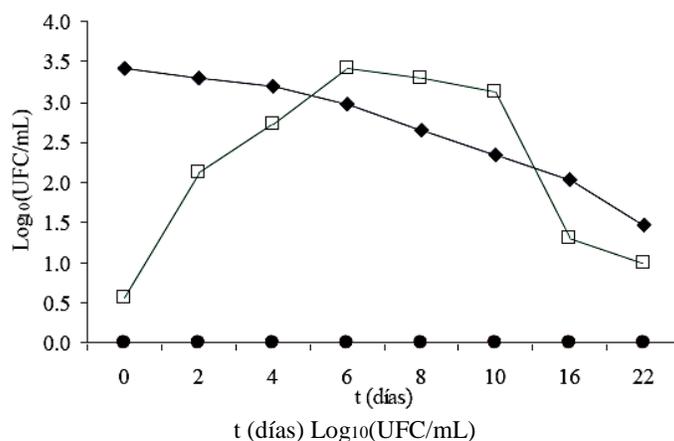


Fig. 1. Crecimiento de coliformes totales en lactosuero (□) pasteurizado, (●) pasteurizado inoculado con *L. rhamnosus*, y (◆) no pasteurizado, monitoreados por 22 días y almacenados a temperatura ambiente.

Tabla 1. Contenido de nutrientes en lactosuero pasteurizado, pasteurizado inoculado con *L. rhamnosus* no pasteurizado, al inicio y después de 22 días, almacenado a temperatura ambiente (21 °C).

| Parámetro | No pasteurizado | | Pasteurizado | | Inoculado | |
|------------------------|-----------------|-------------|--------------|-------------|-------------|-------------|
| | inicial | final | inicial | final | inicial | final |
| Carbohidratos(g/L) | 44.96±1.30 | 3.47±0.19 | 47.00±2.10 | 15.44±2.82 | 47.09±0.92 | 12.19±1.70 |
| proteína (g/L) | 15.76± 2.65 | 21.79± 0.44 | 17.54± 2.51 | 22.28± 1.65 | 16.22± 2.16 | 21.63± 0.45 |
| Grasa (%) | 0.25 ± 0.00 | 0.25 ± 0.00 | 0.25 ± 0.00 | 0.25 ± 0.00 | 0.25 ± 0.04 | 0.25 ± 0.00 |
| pH | 4.13±0.05 | 3.74±0.03 | 5.66±0.06 | 4.82±0.04 | 5.68±0.03 | 4.47±0.02 |
| Acidez (% ác. láctico) | 0.39±0.00 | 0.55±0.07 | 0.22±0.00 | 0.36±0.00 | 0.21±0.00 | 0.49±0.07 |

Conclusiones.

L. rhamnosus inhibió el crecimiento de coliformes totales en el lactosuero, al final del tratamiento se mantuvo la concentración de los microorganismos, obteniéndose un producto fermentado adecuado para complementar la alimentación de animales monogástricos.

Literatura Citada

1. Campos, M. R. G. 2007. Alternativas para el tratamiento de lactosuero para un desarrollo sostenible en el valle de Tulancingo, Hidalgo. Editado por Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Pachuca, Hidalgo, México. pp. 24-40.
2. Scott, R. 1991. Fabricación de queso. Editorial Acribia. Zaragoza, España. pp. 313-320.
3. Varnam, H.A., Sutherland, J.P. 1995. Leche y productos lácteos, tecnología, química y microbiología. Acribia. España. pp. 23 -24.

COMITE ORGANIZADOR

Dr. Agustín Jaime Castro Montoya (Presidente AMIDIQ), Dr. Rubén González Núñez (Vice-Presidente AMIDIQ), Dr. Miguel Morales Cabreara (Secretario AMIDIQ), Dr. Juan Gabriel Segovia Hernández (Tesorero AMIDIQ), Dr. Mauricio Sales Cruz (Vocal Investigación AMIDIQ) y Dra. María del Rosario Enriquez Rosado (Vocal Docencia AMIDIQ)

EFFECTO DE BACTERIAS PROBIOTICAS LIBRES Y ENTRAMPADAS EN LA CONSERVACIÓN DE LACTOSUERO

Mora-Montiel R.a, Pimentel-González D.J.a, Güemes-Vera N.a., Quintero-Lira A.a, Baez González J.G.b y Campos-Montiel R.G.^{a*}

^aUniversidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Instituto de Ciencias Agropecuarias, Avenida Rancho Universitario Km 1, 43600, Tulancingo, Hidalgo, México. ^bDepartamento de Alimentos Facultad de Ciencias Biológicas UANL, Ciudad Universitaria CP 66450 San Nicolás de Garza. Nuevo León.

* ragcamposm@gmail.com.

RESUMEN:

El objetivo de esta investigación fue determinar el efecto de la adición de una bacteria probiótica libre y entrampada en el procesamiento de lactosuero. Se utilizó en lactosuero ácido proveniente de la elaboración de queso Oaxaca y la bacteria probiótica *Lactobacillus. rhamnosus (Lr)*. Se realizaron tres tratamientos: Lactosuero ácido pasteurizado, lactosuero ácido pasteurizado e inoculado con la bacteria libre *Lr* y lactosuero ácido con emulsiones. Se determinaron azúcares, proteína, grasa, pH y viabilidad de *Lr*. En azúcares se observó una menor disminución de azúcares en el tratamiento lactosuero ácido con emulsiones. En proteína el mayor contenido se observó lactosuero ácido con emulsiones. En la grasa no tuvo cambios, el pH que disminuyó alrededor de una unidad logarítmica y el mayor crecimiento de bacterias ácido lácticas fue con LAE con 1.9×10^{11} UFC/mL. Por lo que se concluye que la inoculación de *L. rhamnosus* influyó positivamente en la conservación del lactosuero y el tratamiento del lactosuero ácido con emulsiones fue el mejor.

ABSTRACT:

The objective of this research was to determine the effect of the addition of a probiotic bacteria free and trapped in whey processing. Use in whey from acid processing of Oaxaca cheese and probiotic bacteria *Lactobacillus. rhamnosus (Lr)*. They were three treatments: whey acid pasteurized, acid whey pasteurised and inoculated with the bacteria free and acid whey whit emulsions. Identified sugars, protein, fat, pH and viability of *Lr*. On sugars note a smaller decrease of sugars in the LAE treatment. The protein content higher note with acid whey whit emulsions.. The fat had no changes, pH declined around a logarithmic unit and increased growth of bacteria lactic acid was in acid whey whit emulsions. of 1.9×10^{11} UFC/mL so it can be concluded that inoculation of *L. rhamnosus* positively influenced the preservation of whey and the treatment acid whey whit emulsions was the best.

Palabras clave:

Lactobacillus. rhamnosus, emulsiones múltiples y viabilidad

ÁREA: Lácteos

INTRODUCCIÓN

La industria láctea nacional presenta dos rasgos importantes, su heterogeneidad y su concentración económica y tecnológica de las grandes empresas. Las empresas familiares, micro y pequeñas no tienen tecnologías viables para el procesamiento del lactosuero que se obtiene por la coagulación de la leche en la elaboración del queso, por lo tanto el lactosuero es un alimento muy perecedero ya que se fermenta en forma acelerada y ocupa mucho volumen en las queserías. Por lo que es vertido como residuo aunque contiene una gran

cantidad de nutrientes (Vernon-Carter and Pimentel-González, 2007). En el lactosuero, se encuentran la mayor parte de las sustancias solubles, como la lactosa, las proteínas solubles, las sales minerales solubles y una porción mínima de grasa de la leche. En la actualidad se ha convertido en un problema de gran importancia desde el punto de vista ambiental y de salud pública (Scott, 1991) tan solo en la región de Tulancingo Hidalgo, se generan alrededor de medio millón de litros diariamente. Una opción sería el procesamiento del lactosuero mediante la inoculación por una bacteria probiótica para su conservación y darle propiedades nutraceuticas para mejorar las condiciones intestinales. *Lactobacillus rhamnosus* es una bacteria ácido láctica (BAL) (Myllyluoma et al., 2005) que está dentro del grupo de las bacterias consideradas como probióticas y ha sido ampliamente estudiada por sus propiedades funcionales (Liew et al., 2005). El crecimiento de BAL es afectado por las condiciones de fermentación tales como pH, temperatura, composición del medio y otros factores. Las BAL generalmente tienen limitada capacidad biosintética, requiriendo múltiples aminoácidos y vitaminas para su crecimiento (Tseng and Montville, 1993). La fermentación láctica por esta bacteria y la viabilidad de esta podría ser una opción para conservar el lactosuero. Un método alternativo para proteger a las bacterias probióticas es su inclusión en una emulsión agua-en-aceite-en-agua (W1/O/W2) (Shima et al., 2006). El lactosuero a menudo ha sido usado como un agente emulsificante/microencapsulante (Britten and Giroux, 1991; Young y col., 1993).

En el presente trabajo se propone la conservación de lactosuero mediante el procesamiento con la bacteria probiótica *Lactobacillus rhamnosus* libre y atrapada en una emulsión doble W1/O/W2.

MATERIALES Y MÉTODOS

Procesamiento

Se utilizó lactosuero proveniente de la elaboración de queso tipo Oaxaca del valle de Tulancingo, Hidalgo con las siguientes características: azúcares 45.9 g/L, proteína soluble 9.1 g/L, acidez 20.9 y pH de 5.7. La bacteria probiótica *Lactobacillus rhamnosus* LC705, fue obtenida de un liofilizado de DANISCO-HOLDBAC™, (Niebuß, Alemania). Un inóculo de 1% (p/v) de *L. rhamnosus* fue preparado en lactosuero estéril proveniente de la elaboración de queso Oaxaca de la región del Valle de Tulancingo, se incubó a 37 °C por 18 h, el cultivo activado 1% (v/v) se transfirió dos veces sucesivamente en lactosuero. Doseos de 200 microlitros de inóculo de cultivo de *L. rhamnosus* diluido 10⁻⁴ con buffer de fosfatos (J. T. Baker, Xalostoc, Edo. México, México) 0.05 M (pH 7.2) fueron depositados en 20 mL de lactosuero y se incubó hasta alcanzar el final de la fase logarítmica para obtener el cultivo. No se controló el pH. Emulsiones dobles Las células de *L. rhamnosus* crecidas en lactosuero ácido (LA), fueron removidas y centrifugadas en la fase logarítmica en tubos estériles de 50 mL, se miden 26 mL en 7 tubos usando una centrifuga Hermle Z36K a 12000 rpm durante 15 minutos, obteniendo 104 mL. El sobrenadante fue descartado, y las bacterias concentradas fueron resuspendidas en 31.5 mL de LA pasteurizado a 85°C por 10 min (Lobato-Calleros y col., 2004).

Las emulsiones dobles W1/O/W2 fueron preparadas a temperatura ambiente (21 ± 2 °C) por el método de las dos etapas (Rodríguez-Huezo y col., 2004). En la primera etapa, una emulsión agua-en-aceite (W1/O) fue preparada incorporando una fase acuosa interna (W1) constituida por LA conteniendo 2.1X10¹⁰ ufc mL⁻¹ de *L. rhamnosus*, dentro de una fase

570

oleosa (O) formada por aceite de canola (Capullo®, Unilever de México, S.A. de C.V., Tultitlán, Edo. de México, México) con una concentración total de emulsificantes de 8 % p/p (una parte de emulsificante hidrofílico y cuatro partes de emulsificante hidrofóbico). El emulsificante hidrofílico fue Panodan SDK (ésteres de monoglicéridos y diglicéridos de ácido diacetil tartárico) y el emulsificante hidrofóbico fue Grindsted PGPR 90 (ésteres de ácidos grasos de poliglicerol y poliricinoleato), ambos distribuidos por Danisco México, S.A. de C.V. El proceso de emulsificación fue llevado a cabo con ayuda de un homogenizador Virtis 220 (Virtis Company, Gardiner, NY, EUA) a 5000 rpm durante 10 min. La emulsión W₁/O tuvo una fracción volumétrica de fase dispersa de 0.3. En la segunda etapa, 50 mL de la emulsión primaria W₁/O fue re-emulsificada en 220.5 mL de LA o LAC como fase acuosa externa (W₂) y 24.5 g de suero en polvo, usando el homogenizador Virtis operado a 5000 rpm por 5 min, produciendo emulsiones dobles (W₁/O/W₂)_{LA} o (W₁/O/W₂)_{LAC}, respectivamente.

Determinaciones fisicoquímicas

Todos los tratamientos se almacenaron a temperatura ambiente (20°C) por 32 días, a éstos se les determinó: azúcares totales, proteína soluble, grasa y pH. La determinación de los carbohidratos se realizó mediante el método colorimétrico conocido como el de antrona, se prosiguió a un calentamiento en baño maría a una temperatura de ebullición de las muestras por 10 minutos. Se cuantificó la intensidad de color por medio de un espectrofotómetro modelo EL04083749 (Varian, Cary) a 625nm, frente a un testigo usando únicamente agua destilada como muestra. La determinación de proteína soluble se realizó de acuerdo a la metodología propuesta por Bradford. La determinación de grasa se realizó por el método de Gerber mediante la metodología mencionada en la Norma Oficial Mexicana. La medición de pH se realizó utilizando un potenciómetro PH301 (HANNA Instruments), el cual fue calibrado con soluciones buffer pH 7 y 4 respectivamente.

Análisis microbiológico

La cuantificación de *Lactobacillus rhamnosus* se empleó agar De Man, Rogosa y Sharpe (MRS) (Difco, Sparks, MD), contando el número de unidades formadoras de colonia por mililitro (UFC/mL).

Análisis estadístico

En las determinaciones fisicoquímicas se utilizó en diseño completamente azar, cuando existieron diferencias significativas ($P < 0.05$) entre los tratamientos se empleó la técnica de Tukey para la comparación de medias.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En carbohidratos se observaron diferencias significativas ($P < 0.05$) entre los tratamientos. El tratamiento con emulsiones fue el que conservó mejor el lactosuero en una disminución del 37% en comparación del lactosuero pasteurizado con una degradación de 70% (Tabla 1). La concentración de proteína encontrada en este trabajo (Tabla 1) es inferior a los encontrados por Moras y col., (2010) en un estudio similar. Vernon-Carter y Pimentel-González (2007), encontraron que existe una variación en la concentración de proteína presente en el lactosuero del Valle de Tulancingo Hgo. El tratamiento con emulsiones se

encontró una concentración alta de proteína de más de 13 veces en comparación de los tratamientos con lactosuero pasteurizado y lactosuero inoculado con bacterias libres. Esto se debe a la alta concentración de microorganismos presentes en el entrapamiento de *Lactobacillus rhamnosus*.

Tabla 1. Contenido de nutrientes en lactosuero pasteurizado, lactosuero inoculado bacterias libres *L. rhamnosus* y lactosuero con emulsiones dobles de *L. rhamnosus*, al inicio y después de 32 días.

| Parámetro | Lactosuero pasteurizado | | Lactosuero inoculado | | Lactosuero emulsiones | |
|--------------------|-------------------------|------------------------|----------------------|-------------|-----------------------|-------------|
| | Inicial | Final | inicial | Final | Inicial | final |
| Carbohidratos(g/L) | 44.96±1.3 | 13.47±0.2 | 47.00±2.1 | 15.44±2.8 | 48.09±0.9 | 30.19±1.7 |
| proteína (g/L) | 4.83±0.4 | 4.67± 0.2 | 5.32±1.8 | 4.15 ±0.02 | 66.54±0.9 | 48.69±2.9 |
| Grasa (%) | 0.25 ± 0.02 | 0.25 ± 0.2 | 0.25 ± 0.04 | 0.25 ± 0.01 | 0.72 ± 0.08 | 0.72 ± 0.09 |
| pH | 4.13±0.05 ^b | 3.74±0.03 ^a | 4.14 ± 0.01 | 3.48 ± 0.01 | 5.03±0.02 | 3.61 ± 0.13 |

Las diferentes letras en el sobreíndice en las líneas muestran diferencias significativas ($P < 0.05$) entre los tratamientos según la técnica de Tukey.

La materia grasa observada (Tabla 1) en este estudio es de 2% en los tratamientos de lactosuero pasteurizado y lactosuero inoculado con bacterias libres, mientras el lactosuero con emulsiones el porcentaje fue mayor (7%), el cual se explica por el empleo de aceite de canola en el entrapamiento de microorganismos. Sin embargo la materia grasa no existieron diferencias significativas ($P > 0.05$) entre los tratamientos (Tabla 1).

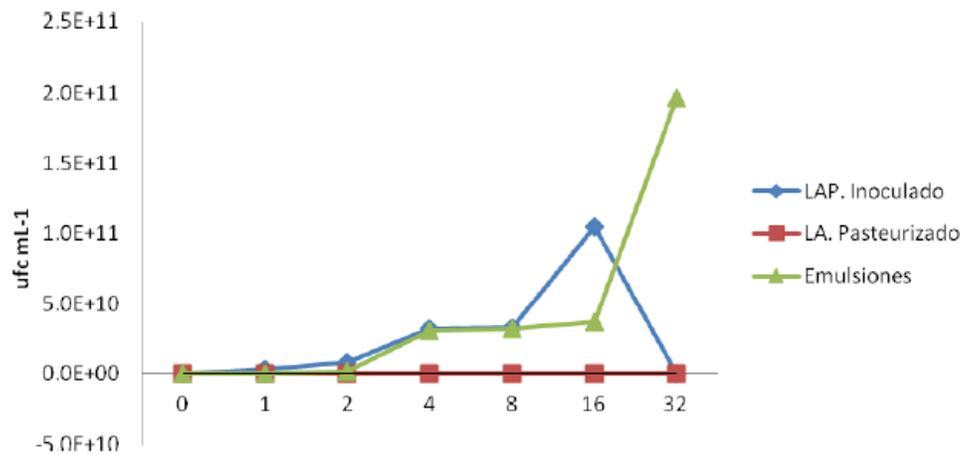


Fig. 1 Cinética de crecimiento de bacterias acidolacticas en tres tratamientos: a) Lactosuero pasteurizado (LA) b) Lactosuero pasteurizado e inoculado con la bacteria libre (LAP) c) Lactosuero con emulsiones.

Los resultados obtenidos en este estudio (Tabla 1) en pH están dentro del rango de los reportados por Spreer (1991), mencionan que el lactosuero del valle de Tulancingo. El

entrapamiento de la bacteria *L.rhamnosus* en la emulsión doble presento pH inicial 5.03 ± 0.02 y final 3.61 ± 0.13 . Shima y col., (2006) sugieren que las emulsiones dobles pueden tener efectos protectores en la bacteria incluida en la fase interna en una solución de pH ácido. Lian et al.,, 2003; Picot and Lacroix, 2004 en investigaciones previas demostraron un efecto protector ejercido por la encapsulación de bacterias probióticas, cuando se exponen a pH ácidos, obteniéndose una sobrevivencia significativamente más alta que la observada en las células no atrapadas como se observa en la Figura 1. El mayor crecimiento de bacterias en los tratamientos de lactosuero pasteurizado (2.2×10^5 UFC/ mL) y lactosuero inoculado bacterias libres (1.05×10^{11} UFC/ mL) se presenta a los 16 días de estudio. (Figura 1). Mientras el lactosuero ácido con emulsiones se observa una cinética de crecimiento ascendente durante el estudio teniendo un alto contenido de microorganismos a los 32 días con 1.9×10^{11} UFC/mL. De acuerdo a lo anterior podemos establecer que la bacteria probiótica atrapada mantiene una mayor viabilidad que los otros tratamientos. Aunque se puede afirmar que el atrapamiento del probiótico tiene una mayor viabilidad en el crecimiento de microorganismos como en el tiempo de conservación. Este estudio muestra, como se indica en la literatura, que el producto puede tener cualidades probióticas, debido a que la proporción de microorganismos es mayor a 1×10^7 ufc por mililitro (González et al.,1994). Según el INTA (2007), los productos probióticos, deben contener 107 bacterias por mililitro, valor que es menor al encontrado en este trabajo. Por lo que se puede afirmar que es apropiado utilizar *L. ramosus* como probióticos, en la conservación de lactosuero ácido. Lo cual también concuerda con lo expresado por Haines (2000).

CONCLUSIONES

El uso de bacterias probióticas influye positivamente la conservación del lactosuero encontrando el mejor tratamiento con lactosuero ácido con emulsiones.

REFERENCIAS

- González, J.I., C. Romero y S. Jimenez. (1994) Control de calidad en la fabricación del yogur. Aliment. Equipos Tecnol. 13(6):77-81. Haines, H. 2000. Probiotics: positive actinobacteria delivered through dairy foods. En: <http://www.nutraceuticals.com/apr002.htm>. Consulta: Noviembre 2011.
- Instituto de Nutrición y Tecnología de alimentos. INTA. 2007. ¿Qué son los probióticos?. En: <http://www.inta.cl/consumidor/probioticos.htm>. Consulta: Octubre 2011. Lian, W. C., Hsiao, H. C., & Chou, C. C. (2003). Viability of microencapsulated bifidobacteria in simulated gastric juice and bile solution. International Journal of Food Microbiology, 86, 293-301. Liew, S. L., Ariff, A. B., Raha, A. R. y Ho, Y. W. (2005). Optimization of medium composition for the production of a probiotic microorganism, *Lactobacillus rhamnosus*, using response surface methodology, International Journal of Food Microbiology 102 137– 142.
- Moras M. R., L. C. Hernández C., A. Quintero L., C. Pérez A., R. G. Campos M., E. J. Vernon C. y D. J. Pimentel G. (2010). Influencia de *L. Rhamnosus* en la conservación de

lactosuero para alimento animal. XXXI Encuentro Nacional de AMIDIQ academia mexicana de ingeniería química A.C, Mexico 978-970-764-976-7 Myllyluoma, E., Veijola, L., Ahlroos, T., Tynkkynen, S., Kankuri, E., & Vapaatalo, H. (2005). Probiotic supplementation improves tolerance to *Helicobacter pylori* eradication therapy - A placebo controlled, double-blind randomized pilot study. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 21, 1263–1272. Picot, A., & Lacroix, C. (2004). Encapsulation of bifidobacteria in whey protein-based microcapsules and survival in simulated gastrointestinal conditions and in yogurt. *International Dairy Journal*, 14, 505-515. Rodríguez-Huezo, M. E., Pedroza-Islas, R., Prado-Barragán, L. A., Beristain, C. I. & Vernon- Carter, E. J. (2004). Microencapsulation by spray-drying of multiple emulsions containing carotenoids. *Journal of Food Science*, 69:E351-E359. Scott, R. (1991). *Fabricación de queso*. Editorial Acribia. Zaragoza, España. pp. 313-320. (5), 23 Shima, M., Morita, Y., Yamashita, M., & Adachi, S. (2006). Protection of *Lactobacillus acidophilus* from the low pH of a model gastric juice by incorporation in a W/O/W emulsion. *Food Hydrocolloids*, 20, 1164–1169. Spreer, D. E. (1991). *Lactología industrial*. Editorial Acribia S.A. Zaragoza, España. 2a. ed., pp. 527-538. España. Tseng, C. P., Montville, T. J. (1993). Metabolic regulation of end product distribution in lactobacilli: causes and consequences. *Biotechnology Progress*, 9, 113-121. Vernon-Carter, E.J., & Pimentel-González, D. J. (2007). Problemática ambiental derivada de las empresas queseras en el valle de Tulancingo, Hidalgo. En: Campos-Montiel, R.G. (Ed.), *Alternativas para el tratamiento de lactosuero para un desarrollo sostenible en el valle de Tulancingo, Hidalgo*. UAEH., Pachuca, Hidalgo, México.--