

# INSTITUTO TECNOLÓGICO Y DE ESTUDIOS SUPERIORES DE MONTERREY

CAMPUS MONTERREY

DIVISIÓN DE BIOTECNOLOGÍA Y ALIMENTOS  
PROGRAMA DE GRADUADOS EN BIOTECNOLOGÍA



**TECNOLÓGICO  
DE MONTERREY®**

**“ECOLOGÍA MICROBIANA DE YOGUR: DETERMINACIÓN DE LA DINÁMICA  
POBLACIONAL DE *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* Y *Streptococcus  
thermophilus* POR MEDIO DE TÉCNICAS TRADICIONALES Y MOLECULARES”**

**TESIS**

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER  
EL GRADO ACADÉMICO DE:**

**MAESTRA EN CIENCIAS  
CON ESPECIALIDAD EN BIOTECNOLOGÍA**

**POR:**

**DIANA LUCÍA SEVILLA KLEEN**

**INSTITUTO TECNOLÓGICO Y DE ESTUDIOS SUPERIORES DE MONTERREY**

**CAMPUS MONTERREY**

**DIVISIÓN DE BIOTECNOLOGÍA Y ALIMENTOS  
PROGRAMA DE GRADUADOS EN BIOTECNOLOGÍA**

Los miembros del comité de tesis recomendamos que el presente proyecto de tesis presentado por la MVZ Diana Lucía Sevilla Kleen, sea aceptado como requisito parcial para obtener el grado académico de:

**Maestra en Ciencias con  
Especialidad en Biotecnología**

Comité de Tesis:

---

Dra. Adriana Pacheco  
Asesora

---

Dr. Mario Moisés Álvarez  
Asesor

---

Dr. Manuel Zertuche  
Sinodal

Aprobado:

---

Dr. Mario Moisés Álvarez  
Director de Posgrado de la  
División de Biotecnología y Alimentos  
Diciembre 2009

**Dedico esta tesis a mi adorada familia.**

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Dra. Adriana Pacheco, a el Dr. Mario Moisés Álvarez y a el Dr. Manuel Zertuche por aceptar ser parte de mi comité de tesis, por todos sus consejos y recomendaciones; en especial a mis asesores por compartir conmigo sus conocimientos y por su apoyo incondicional.

A la Dra. Alicia Ramírez por su ayuda en el análisis cromatográfico de las muestras de yogur, a la Dra. Rocío Morales Rodríguez por su ayuda en el análisis estadístico de los datos de esta investigación y a la Dra. Erandi Escamilla por su apoyo en bioreactores y análisis microbiológico.

A la M.C. Yuriana Oropeza, a la Q.I. Marisol Pecina y a el T.S.U.B. Felipe López por su apoyo y por estar siempre al pendiente de que todo en el Laboratorio de Biotecnología estuviera en orden y en excelente estado; a la Srita. Myriam Robledo por su agradable compañía y disposición en todo momento y a el Sr. Francisco Galaviz por cuidarnos en el Centro de Biotecnología – FEMSA.

A el M.C. Enrique Hernández, a el Dr. Gilberto Armienta, a el Dr. Manuel Zertuche, a el Dr. Óscar González, a el M.C. Ignacio Moreno, a el M.C. Juan Gerardo Cantú, a la Sra. Beatriz Nelson y a la Sra. Marina Gaona por su amistad y apoyo durante el tiempo que laboré en el Departamento de Ingeniería Biológica y Agronegocios.

A mis amigos y compañeros del Lab, Mony, Ira, Lupis, Esther, Alberto, María Luisa, Cristy, Fernando, Roxana, Dianita, Jonathan, Jennifer, Ale, Janet, Jezabel, Grissel, Chefy, Leydi, Caro, Cecy, Paty, Roberto, Lucía, Karlita, Sandra, Ernesto, Jorge, David, Chema, Johari y Claudia, porque de una u otra forma hicieron que mi estancia en el Tec fuera maravillosa.

A mis amigos de Monterrey, Chio, Pablo, David y Toño, infinitas gracias por su cariño y por estar siempre a mi lado.

A mi querida maestra y amigos del Coro Brahms, gracias por iluminar mi vida.

## RESUMEN

El yogur es considerado un alimento de alto valor nutritivo, ya que contiene proteínas, calcio y azúcares. Además le provee al consumidor bacterias probióticas que le brindan grandes beneficios a su salud.

En la presente investigación se caracteriza el comportamiento microbiano durante la producción del yogur en distintos escenarios de fermentación tales como fermentaciones agitadas y fermentaciones no agitadas, con el fin de establecer la dinámica de las bacterias ácido lácticas (BAL) en ambientes micro-aeróbicos.

Se observó que la población activa determinada mediante conteos en placa de *Lb. bulgaricus* y *Str. thermophilus* se va modificando en el tiempo; en un inicio *Str. thermophilus* comienza su proceso de crecimiento y alcanza su fase exponencial alrededor de la hora de haber sido inoculada; durante este tiempo *Str. thermophilus* produce ácido láctico el cual brinda un ambiente adecuado para el desarrollo de *Lb. bulgaricus*. El análisis en cuenta directa permitió observar cambios morfológicos en dichas especies, de las cuales el inóculo estaba conformado por diplococos y cocos sencillos en cadenas de tres a cuatro células. Los bacilos eran grandes y largos. En el tiempo 1 (1 h transcurrida desde la inoculación) se observan cadenas de cocos formadas por 6, 8 y hasta 10 células agrupadas. Sin embargo, los bacilos no mostraron cambios durante la primera hora de fermentación siendo iguales que en el inóculo. En la hora 2 y hora 3 desde la inoculación, se observan cocos en cadena conformadas de tres a cuatro células; los bacilos son de tamaño mediano. De la hora 4 a la hora 6 se observan cocos en cadenas cortas de 1, 2 y 3 células agrupadas, predominando los cocos sencillos y diplococos. Se observan bacilos grandes, medianos y pequeños. Así mismo, se observan glóbulos de grasa y conglomerados de caseína. Los glóbulos de grasa se observan como gotas iridiscentes del tamaño aproximado a 2 cocos, los

conglomerados de caseína aparentan bloques blanquecinos que envuelven a los microorganismos, los cuales al ir transcurriendo el tiempo de fermentación van creciendo en tamaño y aumentando en cantidad, esto dificulta la observación y cuantificación de ambas bacterias ácido lácticas en especial *Str. thermophilus*.

El mejor tipo de fermentación para las dos bacterias ácido lácticas con descenso de pH y crecimiento de microorganismos uniformemente, fue la fermentación agitada micro-aeróbica, sin importar el volumen ni la velocidad a la que fue agitado el yogur. En este tipo de fermentación se consiguió reducir en una hora (de 6 a 5 h de fermentación) el proceso de elaboración del yogur agitado.

Hubo un consumo mayor de lactosa en las fermentaciones no agitadas, se consumió alrededor de  $13.5 \text{ mg ml}^{-1}$  en comparación con  $2 \text{ mg ml}^{-1}$  en las fermentaciones agitadas. En la producción de ácido láctico también se observó este comportamiento ya que la producción de este metabolito fue  $0.85 \text{ mg ml}^{-1}$  mayor en las fermentaciones no agitadas que en las agitadas.

Además de la utilización de los métodos tradicionales microbiológicos se evaluó la estructura de la comunidad microbiana por medio del análisis de la unidad 16S ribosomal de las bacterias ácido lácticas por medio de la técnica molecular de electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (DGGE). Los resultados obtenidos en el DGGE realizado a las muestras del yogur A1N2 (agitado micro-aeróbico) muestran como con el paso de las horas de la fermentación, va aumentando la intensidad de la banda correspondiente a *Str. thermophilus* en comparación con la de *Lb. bulgaricus* que es más clara lo que representa menos concentración de ADN bacterial de esta última BAL.

**Palabras clave:** yogur, ecología microbiana, *Lactobacillus bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, DGGE.

## TABLA DE CONTENIDO

<b>AGRADECIMIENTOS</b>	ii
<b>RESUMEN</b>	iii
<b>TABLA DE CONTENIDO</b>	v
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	x
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b>	xii
<b>ABREVIATURAS</b>	xiii
<b>INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>OBJETIVOS E HIPÓTESIS</b>	3
<b>CAPITULO 1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b>	4
<b>I. LECHE</b>	4
<b>A. Composición de la leche</b>	5
<b>1. Lactosa</b>	5
Estructura de lactosa	5
Biosíntesis de lactosa	6
Utilización de lactosa en productos fermentados	7
Aspectos nutritivos de lactosa	7
<b>2. Lípidos de la leche</b>	9
<b>3. Proteínas de la leche</b>	10

4. Sales de la leche	12
<b>B. Propiedades físicas de la leche</b>	12
1. Leche acidificada (cultivada) – Fermentación ácido láctica	13
a. Cultivos Estárteres Lácteos	14
i. Cultivos Mesófilos	15
ii. Cultivos Termófilos	15
iii. Cultivos Artesanales	16
b. Taxonomía de BAL	16
i. Género BAL	17
1. <i>Streptococcus</i>	17
2. <i>Lactobacillus</i>	18
c. Metabolismo de los azúcares: La fermentación láctica	19
i. Metabolismo de la lactosa en <i>Str. thermophilus</i>	19
ii. Metabolismo de la lactosa en <i>Lb. bulgaricus</i>	20
d. Producción de Polisacáridos por <i>Str. thermophilus</i> y <i>Lb. bulgaricus</i>	21
<b>II. PROBIÓTICOS</b>	21
<b>III. YOGUR</b>	24
1. Estandarización o normalización del contenido graso de la leche	25
2. Estandarización del extracto seco magro de la leche	25
3. Adición de estabilizantes / emulsionantes	27



4. Adición de azúcares y/o agentes edulcorantes	29
5. Homogeneización	31
6. Tratamiento Térmico	32
7. Proceso de fermentación	33
8. Enfriamiento	34
9. Adición de aromatizantes y colorantes	35
10. Envasado	36
<b>A. Tipos de Yogur</b>	36
<b>1. Yogur Tradicional</b>	36
<b>2. Yogur Líquido o Yogur para beber</b>	37
a. Elaboración de yogur en reactores biológicos	39
Efecto del O <sub>2</sub> durante la producción de yogur líquido o para beber en reactores biológicos	40
<b>IV. TECNICAS MICROBIOLÓGICAS DE CUANTIFICACIÓN</b>	41
<b>A. Conteos en Placa</b>	41
Dilución del cultivo de bacterias	43
<b>B. Conteo de Células Totales</b>	43
<b>C. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)</b>	44
<b>D. Reacción en cadena de la polimerasa – Electroforesis de gel de gradiente desnaturante (PCR-DGGE)</b>	46
a. Realización de la PCR	47

b. Genes de interés para la reacción de la PCR	48
c. Realización del DGGE	48
d. Análisis de datos	49
e. Retos y limitantes en el Método de DGGE	49
Aplicaciones del DGGE en Ecología Microbiana Láctea	50
<b>CAPITULO 2. METODOLOGÍA</b>	<b>52</b>
<b>I. AISLAMIENTO DE CEPAS BACTERIANAS</b>	<b>52</b>
<b>II. FERMENTACIONES DE YOGUR</b>	<b>55</b>
1. Tratamiento 1 (Tx1)	55
a. Enumeración microbiológica	57
b. Análisis cromatográfico	57
c. Análisis molecular de subunidad ribosomal 16S región V4-V5	58
2. Tratamiento 2 (Tx2)	59
a. Enumeración microbiológica	60
b. Análisis cromatográfico	61
<b>III. ANALISIS ESTADÍSTICO</b>	<b>61</b>
<b>CAPITULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>63</b>
<b>A. AISLAMIENTO DE CEPAS BACTERIANAS</b>	<b>63</b>
1. Identificación de colonias	63
2. Identificación molecular del gen 16S ADNr	63

3. Determinación de parámetros cinéticos	64
4. Descripción celular	65
<b>B. FERMENTACIONES DE YOGUR</b>	66
1. Tratamiento 1 (Tx1)	67
2. Tratamiento 2 (Tx2)	70
a. Análisis cromatográfico por HPLC	73
b. PCR-DGGE	75
<b>C. ANÁLISIS ESTADÍSTICO</b>	78
<b>CAPITULO 4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES</b>	80
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	83

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura de la lactosa (Fox & McSweeney, 1998)	6
Figura 2. Biosíntesis de la lactosa (Tucker, 1994)	7
Figura 3. Metabolismo de lactosa de las bacterias homofermentativas (Monnet et al., 1996)	20
Figura 4. Diagrama de flujo de pasos en el análisis de comunidades microbianas usando PCR-DGGE (Nakatsu, 2007)	47
Figura 5. Proceso de aislamiento de <i>Lb. bulgaricus</i> y <i>Str. thermophilus</i>	52
Figura 6. Proceso para la elaboración de yogur en el tratamiento 1	55
Figura 7. Proceso para la elaboración de yogur en el tratamiento 2	59
Figura 8. Cuadrícula central de cámara de Neubauer (Madigan et al., 2000)	60
Figura 9. Placa Petri de agar LAPTg con inóculo YO814Q sembrado a una dilución $10^{-8}$ durante 72 h a 42°C	63
Figura 10. Gel de agarosa con productos del gen 16S ribosomal amplificados por PCR; para identificación de género de <i>Lb. bulgaricus</i> y de especie de <i>Str. thermophilus</i>	64
Figura 11. Curvas de crecimiento de <i>Lb. bulgaricus</i> y <i>Str. thermophilus</i> cultivadas a 42°C, no agitación y en medio MRS y LAPTg respectivamente	65
Figura 12. Relación de pH y número de células de <i>Lb. bulgaricus</i> durante los diferentes tipos de fermentación de yogur	68
Figura 13. Relación de pH y número de células de <i>Str. thermophilus</i> durante los diferentes tipos de fermentación de yogur	69

Figura 14. Relación de pH y número de células de <i>Lb. bulgaricus</i> durante los diferentes tipos de fermentación de yogur	71
Figura 15. Relación de pH y número de células de <i>Str. thermophilus</i> durante los diferentes tipos de fermentación de yogur	72
Figura 16. Lactosa, glucosa, galactosa y ácido láctico de la fermentación en tubos rotatorios	74
Figura 17. Gel de agarosa al 0.7% de PCR preparativa de 16S ADNr región V4-V5	76
Figura 18. Gel de con un gradiente desnaturizante de 40-80% de la región V4-V5 del 16S ADNr de <i>Lb. bulgaricus</i> , <i>Str. thermophilus</i> y muestras de yogur en reactor agitado no aeróbico (A1N2)	77

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición (%) de la leche de varias especies de mamíferos (Fox & MacSweeney, 1998)	4
Tabla 2. Contenido de grasa ( $\text{g L}^{-1}$ ) en la leche de varias especies animales (Fox & McSweeney, 1998)	9
Tabla 3. Contenido de proteína (%) en la leche de varias especies animales (Fox & McSweeney, 1998)	11
Tabla 4. Diferencias de importancia industrial de las proteínas de la leche (Fox & McSweeney, 1998)	12
Tabla 5. Propiedades físicas y químicas de la leche (Fox & McSweeney, 1998)	13
Tabla 6. Productos lácteos acidificados (Fox & McSweeney, 1998)	14
Tabla 7. Beneficios a la salud aportados por productos probióticos	23
Tabla 8. Clasificación de estabilizantes/emulsionantes según la técnica de procesamiento empleada para su obtención (Tamime & Robinson, 1991)	28
Tabla 9. Composición de yogur líquido o para beber (Tamime & Robinson, 1991)	39
Tabla 10. Velocidad específica de crecimiento de <i>Lb. bulgaricus</i> y <i>Str. thermophilus</i> durante las fermentaciones en bioreactor (Tx1) y tubos rotatorios (Tx2)	66
Tabla 11. Variación de la población “Ln(UFC/ml)” de <i>Str. thermophilus</i> en las fermentaciones de los tratamientos en la elaboración de yogur con inóculo YO814Q	78
Tabla 12. Variación de la población “Ln(UFC/ml)” de <i>Lb. bulgaricus</i> en las fermentaciones de los tratamientos en la elaboración de yogur con inóculo YO814Q	78

## ABREVIATURAS

<b>ADN</b>	Ácido Desoxirribonucleico
<b>ADNr</b>	Ácido Desoxirribonucleico Ribosomal
<b>ARN</b>	Ácido Ribonucleico
<b>ARNr</b>	Ácido Ribonucleico Ribosomal
<b>ATP</b>	Adenosíntrifostato
<b>A<sub>w</sub></b>	Actividad de Agua
<b>BAL</b>	Bacterias Ácido Lácticas
<b>c/u</b>	Cada Uno
<b>CO<sub>2</sub></b>	Dióxido de Carbono
<b>Da</b>	Dalton
<b>DGGE</b>	Electroforesis en Gel con Gradiente Desnaturalizante (por sus siglas en inglés)
<b>dH<sub>2</sub>O</b>	Agua destilada (bi-destilada)
<b>EPS</b>	Exopolisacáridos
<b>FAO</b>	Organización de Alimentos y Agricultura
<b>FRET</b>	Transferencia Energética de Fluorescencia por Resonancia
<b>g</b>	Gramos
<b>g/L</b>	Gramos/Litro

<b>h</b>	Horas
<b>HePS</b>	Heteropolisacáridos
<b>HPLC</b>	Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento (por sus siglas en inglés)
<b>ITESM</b>	Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey
<b>Kb</b>	Kilobases
<b>meq</b>	Miliequivalentes
<b>mg</b>	Miligramos
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	Cloruro de Magnesio
<b>ml</b>	Mililitros
<b>mM</b>	Milimolar
<b>MRS</b>	Medio de Cultivo Man Rogosa Sharpe
<b>NaCl</b>	Cloruro de Sodio
<b>N<sub>2</sub></b>	Nitrógeno
<b>nm</b>	Nanómetros
<b>No.</b>	Número
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>pb</b>	Pares de Bases
<b>PCR</b>	Reacción en Cadena de la Polimerasa
<b>pH</b>	Potencial de Hidrógeno
<b>PTS</b>	Fosfotransferasa



<b>p/v</b>	Peso/Volumen
<b>qPCR</b>	Reacción en Cadena de la Polimerasa Cuantitativa
<b>rpm</b>	Revoluciones por Minuto
<b>td</b>	Tiempo de Duplicación
<b>UHT</b>	Leche de larga duración (por sus siglas en inglés)
<b>v/v</b>	Volumen/Volumen
<b>μ</b>	Velocidad Máxima de Crecimiento
<b>μg</b>	Microgramo (un μg equivale a $1 \times 10^{-3}$ mg)
<b>μl</b>	Microlitro (un μl equivale a $1 \times 10^{-3}$ ml)
<b>°C</b>	Grados Centígrados

## INTRODUCCIÓN

En la actualidad, todas las culturas humanas están relacionadas con los alimentos fermentados y con los microorganismos que los producen. La fermentación no es solo una tecnología utilizada por los seres humanos como forma de preservación alimentaria, sino también es un proceso ecológico por sí mismo. Las investigaciones microbiológicas realizadas durante los últimos 150 años han sido dirigidas a la producción de metabolitos secundarios y no a la interacción existente en una comunidad biológica, como en el yogur (Scott & Sullivan, 2008).

Los ecosistemas microbianos en los alimentos fermentados no son estáticos. Las dinámicas de crecimiento, sobrevivencia y actividad bioquímica de los microorganismos en el yogur son la respuesta de los microorganismos a cambios en las condiciones físicas y químicas (pH, temperatura y sustrato) que ocurren en el medio (Giraffa & Carminati, 2008). La habilidad de los microorganismos de colonizar la matriz alimentaria y crecer dentro de la heterogeneidad espacial y la interacción ecológica *in situ* célula – célula que ocurre en las matrices complejas de las fases sólidas y semi-sólidas determinan la dinámica de las poblaciones de microorganismos. Investigaciones microbiológicas cuantitativas fiables deben tomarse en consideración en el estudio de dinámicas de los microorganismos en los ecosistemas alimentarios. Esta información es de suma importancia, especialmente para la comprensión del comportamiento de las bacterias ácido lácticas (BAL) en yogur y otros alimentos fermentados (Giraffa & Carminati, 2008).

Aguirre-Ezkauriatza y colaboradores (2008) realizaron una investigación en yogur agitado, teniendo como resultado que en el yogur agitado la población de *Lactobacillus bulgaricus* se veía afectada por el ambiente micro-aeróbico. En la presente investigación, se modificó el ambiente micro-aeróbico existente en las fermentaciones agitadas al incorporar nitrógeno como espacio de cabeza en el fermentador, demostrando que la población de *Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus*

*thermophilus* se desarrollan de una forma estable y en mayor cantidad que en ambientes agitados aeróbicos.

La identificación de especies de BAL con el uso de métodos de identificación fenotípica como los patrones de fermentación de azúcares resulta complicado además de que consumen mucho tiempo en el análisis; a esto se suma que muchas de las especies de BAL dan resultados iguales en estas pruebas. Por esta razón, la utilización de métodos moleculares de identificación ha ido en aumento para simplificar los procesos de caracterización, proveyendo una rápida y confiable identificación microbiana. Entre los métodos utilizados en el análisis de los microorganismos en los alimentos se encuentran los métodos de determinación fenotípica y métodos moleculares, por ejemplo, la electroforesis de gel de gradiente desnaturante (DGGE por sus siglas en inglés). Esta técnica se desarrolló con el propósito de analizar comunidades microbiales de forma rápida mediante la separación de secuencias específicas de fragmentos amplificados por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) (Ercolini et al., 2001).

La aplicación de DGGE en investigaciones realizadas en yogur, están enfocadas en el control de calidad en el punto de venta, mediante la confirmación del tipo de bacteria presente en la etiqueta del producto corresponde con las encontradas en el yogur (Temmerman et al., 2003); en el caso de la presente investigación, además de corroborar la información de la etiqueta del inóculo en lo que corresponde a que existen dos géneros diferentes de BAL, se pretende analizar en el tiempo la ocurrencia de las dos BAL durante la elaboración de yogur.

## OBJETIVOS E HIPÓTESIS

### OBJETIVOS

#### Objetivo general

Estudiar la dinámica poblacional de los microorganismos presentes en yogur elaborado a base de leche de vaca en diferentes condiciones de cultivo (agitado aeróbico, agitado no aeróbico, no agitado aeróbico y no agitado no aeróbico) pertenecientes a dos tratamientos (Tx1: fermentaciones en bioreactor y Tx2: fermentaciones en tubos rotatorios).

#### Objetivos específicos

\* Comprobar que el proceso de agitación no afecta las características probióticas del yogur, concentración final de bacterias ácido lácticas (BAL)  $\geq$  a  $1 \times 10^8$  UFC ml<sup>-1</sup>, mediante el conteo en placas de *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*.

\* Caracterizar la dinámica poblacional de los microorganismos en el tiempo durante la elaboración de yogur mediante la técnica molecular de electroforesis en gel de gradiente desnaturalizante (DGGE) utilizando el gen ribosomal 16S ADNr.

### HIPÓTESIS

Ho (A): No existe variación poblacional de BAL entre tratamientos (Tx1: fermentaciones en bioreactor y Tx2: fermentaciones en tubos rotatorios).

Ho (B): No existe variación poblacional de BAL entre fermentaciones (agitada aeróbico, agitada micro-aeróbico ó no aeróbico, no agitada aeróbico y no agitada no aeróbico).

## CAPÍTULO 1

### REVISIÓN BIBLIGRÁFICA

#### I. LECHE

La leche es un fluido secretado por las hembras de los mamíferos a través de sus glándulas mamarias; su principal función es proporcionar una nutrición completa a los neonatos. Los fundamentos nutricionales están dados por proteínas y péptidos incluyendo las inmunoglobulinas, enzimas e inhibidores de enzimas, proteínas de unión y acarreadoras, factores de crecimiento y agentes antimicrobiales (Fox & McSweeney, 1998).

La Tabla 1 enlista la composición (%) de la leche de varias especies de mamíferos:

Tabla 1. Composición (%) de la leche de varias especies de mamíferos (Fox & MacSweeney, 1998).

Especie	Sólidos totales	Grasa	Proteína	Lactosa	Ceniza
Humano	12.2	3.8	1.0	7.0	0.2
Vaca	12.7	3.7	3.4	4.8	0.7
Cabra	12.3	4.5	2.9	4.1	0.8
Oveja	19.3	7.4	4.5	4.8	1.0
Cerdo	18.8	6.8	4.8	5.5	-
Caballo	11.2	1.9	2.5	6.2	0.5
Burro	11.7	1.4	2.0	7.4	0.5
Reno	33.1	16.9	11.5	2.8	-
Conejo doméstico	32.8	18.3	11.9	2.1	1.8
Bisonte	14.6	3.5	4.5	5.1	0.8
Elefante indio	31.9	11.6	4.9	4.7	0.7
Oso polar	47.6	33.1	10.9	0.3	1.4
Foca gris	67.7	53.1	11.2	0.7	-

## A. Composición de la leche

### 1. Lactosa

La lactosa es el principal carbohidrato de la mayoría de las especies productoras de leche (Tabla 1). Además de lactosa, la leche contiene pequeñas cantidades de otros azúcares: glucosa ( $50 \text{ mg L}^{-1}$ ), fructosa, glucosamina, galactosamina, ácido neuramínico y oligosacáridos ácidos y neutros (Fox & McSweeney, 1998).

Conocer el contenido de lactosa en la leche es de importancia debido a lo siguiente:

- a. Es un constituyente esencial en la elaboración de productos lácteos fermentados.
- b. Contribuye al valor nutritivo de la leche y sus subproductos, además que las personas adultas no europeas tienen poca a cero habilidades para digerir la lactosa, síndrome conocido como intolerancia a la lactosa.
- c. Afecta la textura de varios subproductos lácteos concentrados y congelados.
- d. Está relacionada con los cambios inducidos por calor en el color y sabor de productos y subproductos lácteos que son sometidos a altas temperaturas (Fox & McSweeney, 1998).

#### Estructura de lactosa

La lactosa es un disacárido constituido por una galactosa y una glucosa, unidos por un puente  $\beta$ 1-4 glucosídico (Figura 1). Su nombre sistemático es  $\beta$ -O-D-galactopiranosil-(1-4)- $\beta$ -D-glucopiranososa ( $\beta$ -lactosa) ó  $\beta$ -O-D-galactopiranosil-(1-4)- $\alpha$ -D-glucopiranososa ( $\alpha$ -lactosa). El grupo hemiacetal de la porción glucosa es potencialmente libre (ej. la lactosa es un azúcar reducido) y puede existir en dos formas como un anómero  $\alpha$  ó un anómero  $\beta$  (Fox & McSweeney, 1998).

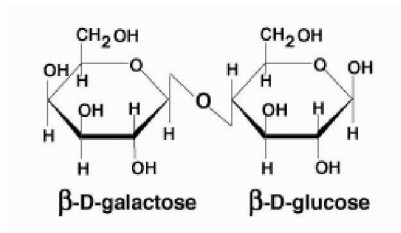


Figura 1. Estructura de la lactosa (Fox & McSweeney, 1998).

### Biosíntesis de lactosa

Cambios hormonales asociados al parto de los mamíferos (decremento de la progesterona e incremento de glucocorticoides y prolactina) permiten la transcripción del gen  $\alpha$ -lactalbumina (Figura 2). La lactosa es sintetizada a partir de una glucosa que es absorbida de la sangre. Dentro del aparato de Golgi, una molécula de glucosa es isomerizada a UDP-galactosa mediante la ruta Leloir de cuatro enzimas. UDP-Gal se une a otra molécula de galactosa en una reacción catalizada por la enzima de dos componentes, lactosa sintetasa. El componente A es una galactosil transferasa no específica la cual transfiere galactosa de la UDP-Gal a un gran número de aceptores. En presencia del componente B, que es una proteína del suero: la  $\alpha$ -lactalbumina, la transferasa se vuelve altamente específica por glucosa lo cual lleva a la formación de lactosa. La síntesis de lactosa osmóticamente atrae grandes cantidades de agua dentro del aparato de Golgi y sus vesículas secretoras. Este proceso da paso a gran secreción de leche por medio de las glándulas mamarias. Al mismo tiempo que esto sucede, aumenta la síntesis de otros compuestos de la leche (Tucker, 1994).

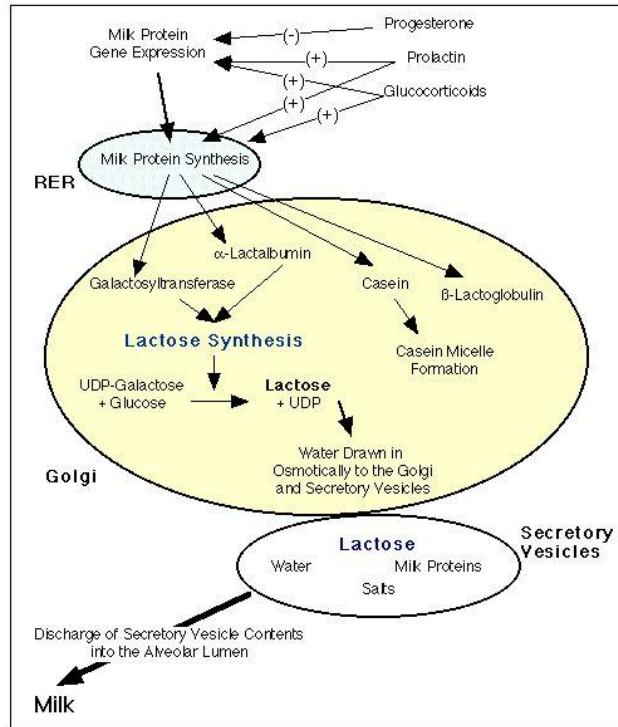


Figura 2. Biosíntesis de la lactosa (Tucker, 1994).

### Utilización de lactosa en productos fermentados

En la elaboración de productos fermentados de la leche la lactosa se fermenta rápidamente por las bacterias ácido lácticas (BAL), como *Lactococcus* spp. y *Lactobacillus* spp., en ácido láctico y por algunas especies de levadura, como *Kluyveromyces* spp., a etanol. El ácido láctico se puede utilizar como acidulante de alimentos (en la elaboración de yogur), componente en la manufactura de plásticos, o puede ser convertido en lactato de amonio para ser utilizado como fuente de nitrógeno en la nutrición animal (Fox & McSweeney, 1998).

### Aspectos nutritivos de la lactosa

La secreción en un disacárido en vez de un monosacárido en la leche es ventajosa ya que se da el doble beneficio a la persona que la consume (Figura 1). La galactosa de la leche o su derivativa la galactosamina son importantes constituyentes de muchas



glicoproteínas y glicolípidos necesarios para la formación de membranas celulares. Sin embargo, la lactosa también posee consecuencias nutricionales indeseables:

- a. Galactosemia, es una enfermedad hereditaria causada por la inhabilidad de metabolizar galactosa debido a falta de de la enzima galactoquinasa o galactosa-1-fosfato (Gal-1-P): uridil transferasa. Por lo tanto la galactosa se acumula y se convierte en galactitol provocando cataratas en personas de edad entre 10-20 años. También, el galactitol interfiere en la formación de glicoproteínas y glicolípidos (formación de membranas celulares, ej. en el cerebro) produciendo retraso mental irreversible en niños que consumen leche y tienen este padecimiento (Fox & McSweeney, 1998).
- b. Intolerancia a la lactosa, es causada por la insuficiencia intestinal de la enzima  $\beta$ -galactosidasa. La lactosa no se hidroliza completamente en el intestino delgado, por lo tanto, estos disacáridos no son absorbidos y pasan al intestino grueso causando la entrada de agua al intestino lo que provoca diarrea. A la vez, estos disacáridos son fermentados por microorganismos intestinales causando cólicos y flatulencia (Fox & McSweeney, 1998).

El 70% de la población adulta del mundo tiene algún grado de intolerancia a la lactosa. Sólo los europeos del norte y algunas tribus africanas pueden consumir leche durante toda su vida sin ninguna consecuencia negativa. La leche puede ser adecuadamente modificada para ser consumida por personas intolerantes a la lactosa:

- a. Fermentación a yogur u otro producto fermentado en el cual el 25% de la lactosa es metabolizada, los cuales contienen  $\beta$ -galactosidasa bacterial; además, el yogur es descargado más lentamente del estómago al intestino debido a su textura.
- b. Conversión a queso, el cual es libre de lactosa.

- c. Tratamiento con  $\beta$ -galactosidasa exógena, ya sea administrada por el consumidor o en la planta lechera, utilizando una enzima libre o inmovilizada (Fox & McSweeney, 1998).

## 2. Lípidos de la leche

La concentración de lípidos en la leche varía según la especie animal de la que proviene (Tabla 2). La principal función nutritiva de los lípidos de la leche es como fuente de energía para el neonato. La cantidad de lípidos contenidos también refiere a los requerimientos de energía según la especie; por ejemplo, los animales que provienen de regiones frías y marinas secretan niveles más altos de lípidos en sus leches (Fox & McSweeney, 1998).

Tabla 2. Contenido de grasa ( $\text{g L}^{-1}$ ) en la leche de varias especies animales (Fox & McSweeney, 1998).

Especie	Contenido de grasa ( $\text{g L}^{-1}$ )
Vaca	33 – 47
Búfalo	47
Oveja	40 – 99
Cabra	41 – 45
Alce	39 – 105
Elefante	85 – 190
Humano	38
Caballo	19
Mink	134
Delfin	62 – 330
Manatee	55 – 215
Oso (cuatro especies)	108 – 331

Los lípidos también son importantes debido a:

- a. Son fuente esencial de ácidos grasos (ácidos grasos que no pueden ser sintetizados por animales mayores como el ácido linoleico, C<sub>18:2</sub>) y vitaminas liposolubles (vitaminas A, D, E y K).
- b. Provee el sabor y las propiedades reológicas a los productos lácteos y subproductos en los que son usados (Fox & McSweeney, 1998).

Durante varios años, el valor económico de la leche estaba determinado por su contenido de lípidos; ya que la mayoría de la leche se utilizaba para la producción de mantequilla (Fox & McSweeney, 1998).

Los triglicéridos representan el 97 – 98% de los lípidos totales en la leche. En comparación los fosfolípidos representan menos del 1%. El colesterol es el principal esteroide de la leche (> 95% del total de esteroides). Existen varios hidrocarburos en la leche a niveles traza, de estos los carotenoides son los más significantes ya que contribuyen del 10 – 50% de la actividad de la vitamina A en la leche y son responsables del color amarillo de la grasa de la leche. A diferencia de la vaca que deriva de la dieta los carotenoides a la leche, las ovejas y las cabras no lo hacen, por tal motivo su leche es más blanca (Fox & McSweeney, 1998).

### **3. Proteínas de la leche**

La función de las proteínas en la leche es dar a los animales pequeños los aminoácidos esenciales requeridos para su desarrollo muscular y de otros tejidos que contienen proteínas. Además, proveen, un número de proteínas activas biológicamente como las inmunoglobulinas, proteínas acarreadoras de vitaminas y minerales, y varias hormonas. Las crías de diferentes especies de mamíferos nacen a distintos estados de madurez, consecuentemente tienen diferentes requisitos fisiológicos. Estas diferencias se ven reflejadas en el contenido de proteína en la leche la cual varía de 1 – 24% dependiendo de la especie (Tabla 3) (Fox & McSweeney, 1998).

Tabla 3. Contenido de proteína (%) en la leche de varias especies animales (Fox & McSweeney, 1998).

Especie	Caseína (%)	Proteína de lactosuero (%)	Total (%)
Bisonte	3.7	0.8	4.5
Oso negro	8.8	5.7	14.5
Vaca	2.8	0.6	3.4
Burro	1	1	2
Cabra	2.5	0.4	2.9
Caballo	1.3	1.2	2.5
Humano	0.4	0.6	1
Oveja	4.6	0.9	5.5
Conejo Jack cola blanca	19.7	4	23.7

Hace alrededor de 100 años se demostró que existen dos tipos bien definidos de proteínas en la leche. En la leche acidificada a un pH 4.6 (pH isoelectrico) a 30° C, el 80% de las proteínas contenidas en la leche de vaca precipitan, esta fracción se conoce como caseína. Las proteínas que a ese pH continúan solubles se les conocen como proteínas del lactosuero ó nitrógeno no caseínico. La persona que realizó este descubrimiento fue el científico alemán Hammarsten, por lo tanto la caseína obtenida a través de su punto isoelectrico es conocida como “caseína nach Hammarsten” (Fox & McSweeney, 1998). Actualmente se ha descubierto que las caseínas tienen un efecto protector contra el cáncer de colon debido a la habilidad de estas proteínas de estimular la fagocitosis y aumentar el número de linfocitos en el sistema inmune del consumidor (Lipkin & Wargovich, 2000).

La Tabla 4 enlista diferencias de importancia industrial de las proteínas de la leche:

Tabla 4. Diferencias de importancia industrial de las proteínas de la leche (Fox & McSweeney, 1998).

Tipo de proteína	Precipitan a pH 4.6	Coagulan en presencia de Reninas (proteínasa) + Ca <sup>2+</sup>	Estabilidad a altas temperaturas	% de fósforo	% de azufre	Se sintetiza en	Estructura	Heterogeneidad
Caseínas	+	+	pH 6.7 a 100° C, no hay coagulación en 24 h	0.85	0.8	Glándula mamaria	Cuaternaria complicada, forma micelas de 10 <sup>6</sup> – 10 <sup>9</sup> Da	Formadas por varias proteínas diferentes
Proteínas del lactosuero	-	-	-	No contiene	1.7	Suero sanguíneo (albúmina e Ig)	En solución o cuaternaria simple	Formadas por varias proteínas diferentes

#### 4. Sales de la leche

Las sales presentes en la leche son principalmente fosfato, citrato, cloro, azufre, carbonato y bicarbonato de sodio, potasio, calcio y magnesio. Aproximadamente otros 20 elementos se encuentran en cantidades trazas, incluyendo cobre, hierro, silicón, cinc y yodo. La concentración de lactosa es inversamente proporcional a la concentración de sales solubles en la leche, esto se debe a que la leche debe ser isotónica en relación con la sangre (Fox & McSweeney, 1998).

#### B. Propiedades físicas de la leche

La leche es una emulsión diluida que consiste de una fase dispersa de aceite/agua y una fase acuosa coloidal continua. Sus propiedades físicas son similares a las del agua pero modificadas por la presencia de varios solutos anteriormente mencionados (lactosa, proteínas, grasas y sales). Estas propiedades son importantes ya que nos dicen que parámetros pueden influir en el diseño y operación de los procesos y equipos

lecheros. Por ejemplo, el color blanco de la leche es producido por la dispersión de la luz visible a través de las micelas de caseína y los glóbulos de grasa. El lactosuero es de color verdusco debido a la presencia de riboflavina (Fox & McSweeney, 1998). Algunas propiedades físicas importantes de la leche son mostradas en la siguiente tabla:

Tabla 5. Propiedades físicas y químicas de la leche (Fox & McSweeney, 1998).

Punto de ebullición	~ 100.15° C
Punto de congelamiento	-0.522° C (aproximadamente)
Densidad (20°C)	~ 1030 kg m <sup>-3</sup>
Fuerza iónica	~ 0.08 M
Coefficiente de viscosidad	2.127 m Pa s
Calor específico	~ 3.931 kJ kg <sup>-1</sup> K <sup>-1</sup>
pH (25° C)	~ 6.6
Acidez titulable	1.3 – 2.0 meq OH <sup>-</sup> por 100 ml (0.14 – 0.16 % como ácido láctico)

### 1. Leche acidificada (cultivada) – Fermentación ácido láctica

Los productos lácteos acidificados existen desde la domesticación de los animales lecheros (Tabla 6). La leche es obtenida asépticamente de una ubre sana; la leche es prácticamente estéril pero se contamina en el ordeño por bacterias ácido lácticas (BAL). Durante el almacenamiento éstas BAL crecen dependiendo de la temperatura. Las bacterias se multiplican rápidamente a temperatura ambiente metabolizando la lactosa en ácido láctico y a su vez reduciendo el pH de la leche al punto isoeléctrico de las proteínas (pH 4.6), por lo cual se forma un gel que se conoce como leche acidificada (Fox & McSweeney, 1998).

Tabla 6. Productos lácteos acidificados (Fox & McSweeney, 1998).

Tipo de bacteria	Producto	Microorganismo
Mesófilos (fermentación entre los 20 – 22° C)	Taetmojolk	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i>
	Folkjolk e Ymer	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> biovar. <i>diacetylactis</i> y <i>Leuconostoc mesenteroides</i> spp. <i>cremoris</i>
	Kefir	Granos Kefir – lactobacilos termofilicos y <i>Kluyveromyces marxianus</i>
Termófilos (fermentación entre los 37 – 42° C)	Yogur	<i>Streptococcus salivarius</i> ssp. <i>thermophilus</i> y <i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i>
	Leche acidófila	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
	Leche A/B	<i>Lactobacillus acidophilus</i> y <i>Bifidobacterium bifidum</i>
	Yogur A/B	Igual que leche A/B + yogur

### a. Cultivos Estárteres Lácteos

Los cultivos estárteres son utilizados en todos los productos derivados de las fermentaciones lácticas: quesos, cremas aciduladas, yogur, etc. La utilización de dichos cultivos en la manufactura de estos productos es muy antigua, mucho antes de que se supiera que las bacterias eran las responsables de dichas fermentaciones (Cogan, 1996).

Los nómadas en la antigüedad notaron que al dejar leche cruda en la intemperie a temperatura ambiente se coagulaba (transformación de líquido a sólido). Empíricamente se descubrió que al añadir un poco de esta leche coagulada a leche fresca y tras dejarla varias horas a temperatura ambiente se lograba nuevamente la coagulación. Fue hasta mediados del siglo diecinueve con el nacimiento de la

microbiología que se descubrió que los responsables de la coagulación de la leche y su respectiva acidez son las bacterias ácido lácticas (BAL), las cuales son contaminantes benéficos de la leche cruda (Cogan, 1996).

Estas leches coaguladas son los antecesores de los cultivos estárteres utilizados en la actualidad. Son llamados por varios nombres: cultivos tradicionales o mixtos ya que contienen diferentes géneros y especies de microorganismos; cultivos artesanales debido a su origen y cultivos indefinidos porque su composición exacta es desconocida (Cogan, 1996).

Estos cultivos se pueden dividir en tres tipos: mesófilos, termófilos y artesanales.

#### **i. Cultivos Mesófilos**

La temperatura de crecimiento óptimo de estos microorganismos es  $\sim 26^{\circ}$  C. Los organismos responsables de acidificar la leche fueron aislados por vez primera por Lister en 1878 y los llamó *Bacterium lactis* (*lactis* es el Latín para “de leche”); este fue el primer microorganismo aislado en un cultivo puro. El proceso de purificación fue muy sencillo: la leche acidificada fue diluida hasta que en una gota tuviese la probabilidad de contener una sola colonia la mitad de las veces, y la otra mitad del tiempo la gota debía ser agua estéril y no dar origen a ninguna fermentación. Con el paso del tiempo y el avance de la taxonomía esta bacteria se nombró como *Streptococcus lactis*, luego como *Streptococcus lactis* ssp. *lactis* y, recientemente, se le cambió nuevamente el nombre a *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*. Otros microorganismos mesófilos son: *Lc. lactis* ssp. *cremoris* y *Leuconostoc* sp. (Cogan, 1996).

#### **ii. Cultivos Termófilos**

Su temperatura ideal de crecimiento es  $\sim 42^{\circ}$  C. Muchos de estos cultivos estárteres contienen bacterias cocos y bacilares, también por eso se les conoce como cultivos mixtos. Entre las BAL en forma de coco está *Streptococcus thermophilus* y de forma bacilar están *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *lactis* y *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* (Cogan, 1996).



*Str. thermophilus* solamente fermenta la porción glucosa de la lactosa, la galactosa es excretada en relación a la cantidad de lactosa fermentada. Los lactobacilos *Lb. ssp. bulgaricus* y *Lb. ssp. lactis* también excretan galactosa cuando fermentan lactosa; estas especies solamente se utilizan en la elaboración de yogur (Cogan, 1996).

### **iii. Cultivos Artesanales**

El uso de estos cultivos artesanales es tradición de los manufactureros a pequeña escala del sureste de Europa, especialmente de Francia e Italia. Estos cultivos poseen microorganismos termófilos y mesófilos. Algunos de ellos son: *Str. thermophilus*, *Lb. helveticus*, *Lb. ssp. lactis*, *Lb. fermentum*, *Lb. casei* y *Lb. plantarum*; enterococos, lactobacilos, leuconostoc, levaduras, coliformes y micrococos, respectivamente. Por lo tanto, son cultivos extremadamente complicados y sus condiciones de producción son altamente específicas (Cogan, 1996).

### **b. Taxonomía de BAL**

En la década de 1980 ocurrieron avances significativos en la taxonomía de los microorganismos microbianos, incluyendo las BAL. Estos avances se llevaron a cabo con el uso de técnicas moleculares, que incluyen análisis de proteínas celulares por electroforesis de gel sodio dodecil sulfato-poliacrilamida (SDS-PAGE), hibridaciones ADN:ADN y ADN:ARNr, restricción por mapeo cromosomal de ADN y determinación de secuencia nucleotídica de ARN 16S y 23S. Cepas que muestren homología ADN:ADN > 70% son consideradas como idénticas, en cambio las que no muestran ese comportamiento son consideradas como especies distintas (Cogan, 1996).

Debido a que el ADNr está involucrado en la síntesis de proteínas, mucha de sus secuencias han sido conservadas durante la evolución. Comparaciones de estas secuencias, en especial las de ADNr 16S, han sido de mucha utilidad en el estudio de la filogenia entre las bacterias; pero existen regiones pequeñas que son llamadas regiones variables; esa variabilidad es la que permite que podamos clasificar las bacterias por género, especie y subespecie (Cogan, 1996).

## **i. Género BAL**

Los microorganismos que componen los estárteres lácteos de BAL se encuentran distribuidos en cinco géneros: *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus* y *Lactobacillus*. Los primeros cuatro géneros son de forma cocal y los *Lactobacillus* son forma bacilar. Estos cinco géneros son gram positivos, catalasa negativo, no móviles y carecen del sistema membranal de transporte de electrones para generar energía (adenosina tri fosfato, ATP) aerobiamente. Por esto, los azúcares son oxidados en fermentaciones anaerobias a lactato ó a lactato, etanol, acetato y CO<sub>2</sub>. A pesar de la falta del sistema de transporte de electrones, muchos de ellos son aerotolerantes (crecen en presencia de aire) (Cogan, 1996).

La composición de su ADN permite conocer la homogeneidad de las especies que integran éstos géneros: el porcentaje de sus bases Guanina + Citosina (contenido GC %) de su ADN muestra una composición bastante próxima entre los géneros *Streptococcus* (GC 34 – 46 %) y *Leuconostoc* (GC 36 – 43 %). En contraste el género *Lactobacillus* se caracteriza por la heterogeneidad de sus especies en contenido de GC 32 – 53 %, esta variabilidad se encuentra incluso en el interior de las subdivisiones del género (Leveau & Bouix, 2000).

A continuación se describen los géneros más importantes para ésta investigación:

### **1. *Streptococcus***

A este género pertenecen 27 especies, pero solo una de ellas *Str. thermophilus* (37 – 40 % de GC), se considera cultivo estárter. Tiene forma de coco dispuestas en pares o en cadenas. Hibridaciones ADN:ADN demostraron que está emparentada con *Str. salivarius* un habitante común de la boca, por eso fue relegada a nivel de subespecie *Str. salivarius* ssp. *thermophilus*; pero estudios más recientes la elevaron nuevamente a nivel de especie, basados en más detalles encontrados en el análisis de hibridación de ADN. *Str. thermophilus* fermenta azúcares por medio de glucólisis y produce L lactato. Los tipos de azúcares que puede fermentar son muy pocos. Se puede diferenciar de

*Lactococcus* y *Leuconostoc* ya que *Str. thermophilus* puede crecer hasta los 45° C. Por esta característica de crecer a 45° C *Str. thermophilus* puede confundirse con *Enterococcus* que se encuentra generalmente en cultivos artesanales; sin embargo, la mayoría de los *Enterococcus* crecen a 10° C en una solución al 6.5% de NaCl y a un pH de 9.6, contiene el antígeno Lancefield grupo D, y esto no pasa en *Str. thermophilus* (Cogan, 1996; Leveau & Bouix, 2000).

## **2. *Lactobacillus***

El grupo *Lactobacillus* es muy grande, todas las especies poseen una forma bacilar (bastón o caña) los cuales pueden ser cortos o esbeltos, a veces curvos, corineformes ó cocobacilar (Cogan, 1996).

El género está conformado por 64 especies; los cuales están divididos en tres grupos dependiendo de su metabolismo de los azúcares. El Grupo 1 está formado por especies que son homofermentativos obligados de hexosas a lactato, y no fermentan pentosas. El Grupo 2 son especies heterofermentativos facultativas de hexosas (ej. fermentan hexosas a lactato por medio de glucólisis, pero cuando están limitadas en glucosa, lo convierten en lactato, acetato, etanol y formato) o de pentosas que son fermentadas por la ruta fosfoquetolasa a lactato y acetato. Por último, el Grupo 3 de estas especies son heterofermentativos obligados de azúcares (Cogan, 1996), fermentan las hexosas a ácido láctico, ácido acético, etanol y dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), a su vez fermentan las pentosas hasta ácido láctico y ácido acético. En general, ambas vías involucran a la fosfoquetalosa (Samaniego & Sosa, 2000).

Los lactobacilos presentes en cultivos estériles son: *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *Lb.* ssp. *lactis* y *Lb. helveticus* pertenecientes al Grupo 1. Estas bacterias son termófilas, crecen a temperaturas de 45° C o mayores. Producen mucho más ácido láctico en leche (como máximo 27 g L<sup>-1</sup>) que los otros géneros de BAL (Cogan, 1996). El tipo de ácido láctico que producen es D (-) ácido láctico (Germond et al., 2003).

### **c. Metabolismo de los azúcares: La fermentación láctica**

Los azúcares utilizados por las BAL son fermentados esencialmente hasta ácido láctico. En la fermentación homoláctica, la producción de lactato pasa por la vía Embden – Meyerhof – Parnas (EMP) (Leveau & Bouix, 2000).

La concentración de lactosa en la leche es grande: la leche de vaca contiene de 40 a 50 g L<sup>-1</sup> y es prácticamente el único azúcar en estado libre. Al final del crecimiento de las BAL en leche, la tasa de ácido láctico y el pH final varían con el tipo de bacterias (Leveau & Bouix, 2000).

#### **i. Metabolismo de la lactosa en *Str. thermophilus***

\* La permeación de la lactosa y la enzima de hidrólisis: existen investigadores que afirman encontrar los dos tipos de enzimas, la  $\beta$ -galactosidasa ( $\beta$ -Gal) en 28 cepas, la fosfo- $\beta$ -galactosidasa (P-  $\beta$ -Gal) en una cepa únicamente y las dos enzimas en 3 cepas. Lo que implicaría el funcionamiento ya sea de una permeasa específica de los  $\beta$ -galactósidos, ya sea del sistema fosfotransferasa (PTS), ya sea de los dos (lo que no ha sido demostrado). En realidad la enzima de hidrólisis parece ser la  $\beta$ -Gal (Leveau & Bouix, 2000).

\* La excreción de la galactosa: la galactosa producida por hidrólisis de la lactosa no es fermentada por la mayoría de las cepas de esta especie y sería excretada por las células, al menos cuando la lactosa no está en cantidad limitante. En esta especie la no utilización de la galactosa podría ser debida a la ausencia de galactoquinasa o más probablemente a la represión de sus síntesis por la glucosa y/o la lactosa (Leveau & Bouix, 2000).

Cultivando cepas Gal<sup>-</sup> en condiciones de limitación de lactosa, se pueden obtener células Gal<sup>+</sup> capaces de utilizar la galactosa gracias a una actividad inducida de todas las enzimas de la vía Leloir exclusivamente (de Vin et al., 2005).

## ii. Metabolismo de la lactosa en *Lb. bulgaricus*

\* La permeación de la lactosa y la enzima de hidrólisis: posee una  $\beta$ -Gal, y puede que también una P- $\beta$ -Gal de actividad más débil. La lactosa debe penetrar por acción de una permeasa ya que *Lb. bulgaricus* no posee sistema PTS ni para lactosa ni para galactosa. Las especies Gal<sup>-</sup> solo utilizan la mitad correspondiente a la glucosa de la molécula de lactosa. La  $\beta$ -Gal tiene un pH óptimo de 7.0 y es activada por cationes: Mg<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup> y Fe<sup>2+</sup> (Leveau & Bouix, 2000).

\* La excreción de la galactosa: igual que en *Str. thermophilus*, la galactosa no es fermentada y es excretada por la célula (Leveau & Bouix, 2000).

En la siguiente figura (Figura 3) se puede observar el metabolismo de lactosa de las bacterias homofermentativas (*Str. thermophilus* y *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*):

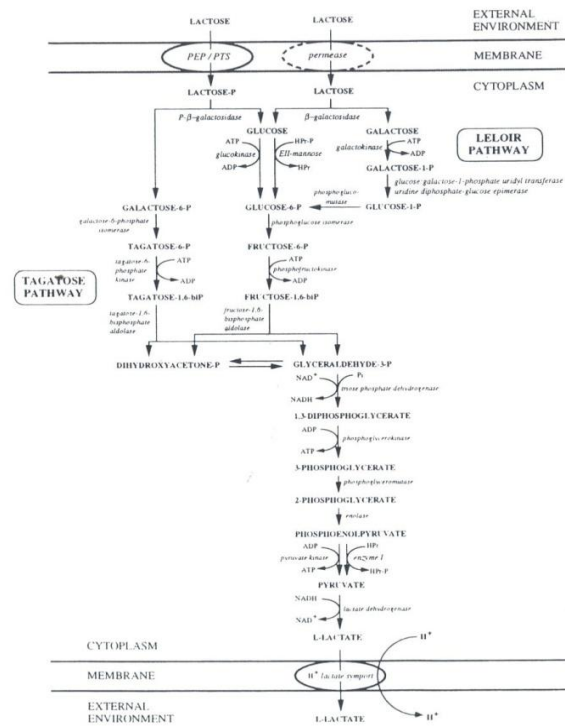


Figura 3. Metabolismo de la lactosa de las bacterias homofermentativas (Monnet et al., 1996).

#### **d. Producción de Polisacáridos por *Str. thermophilus* y *Lb. bulgaricus***

Cepas de *Str. thermophilus* y *Lb. bulgaricus*, tras crecimiento en leche son consideradas responsables de la viscosidad del yogur obtenido (Mozzi et al., 2006).

Los exopolisacáridos (EPS) de las BAL se dividen en homopolisacáridos, que son polímeros compuestos de un solo tipo de monosacárido y heteropolisacáridos (HePS) que son polímeros de unidades repetidas que pueden estar compuestas por dos o más tipos de monosacáridos (Mozzi et al., 2006).

La función de los EPS es dar viscosidad, estabilidad, formar geles y/o ser agentes aceptores de agua en varios tipos de alimentos fermentados (Mozzi et al., 2006).

La concentración de HePS producidos en fermentaciones de BAL es alrededor de 60 – 400 mg L<sup>-1</sup> (Stingele et al., 1996).

Cepas industriales de *Str. thermophilus* producen EPS en la fase estacionaria del crecimiento. Otra teoría es que *Lb. bulgaricus* y *Str. thermophilus* producen un EPS soluble en presencia de diversos sustratos carbonados y en fase exponencial precoz. El EPS estaría formado por fructosa y glucosa en relación 2:1 y poseería enlaces  $\alpha$ -(1,4) y  $\alpha$ -(1,6). Otros científicos han encontrado cepas productoras de EPS que están formados de galactosa, glucosa y ramnosa en relación 4:1:1 (Leveau & Bouix, 2000).

## **II. PROBIÓTICOS**

La versión Persa del Viejo Testamento (Génesis 18:8) declara que “Abraham debe su longevidad al consumo de leche acidificada” (Shadid, 2007).

En el siglo XX, los científicos E. Mechnikoff y H. Tissier desarrollaron el concepto que conocemos como probiótico. El término “probiótico” significa “para la vida” y se deriva del griego (Temmerman et al., 2003).

Según la Organización de Alimentos y Agricultura (FAO por sus siglas en inglés), probiótico es un microorganismo vivo, que al ser administrado en cantidades

adecuadas, confiere beneficios a la salud del consumidor (Temmerman et al., 2003). Para que una cepa microbiana sea definida como probiótico para humanos debe cumplir con las siguientes características:

- Origen humano.
- No patógena (documentada como clínicamente segura).
- Resistente a ácidos gástricos, sales biliares y enzimas pancreáticas.
- Capaz de adherirse al tejido epitelial del intestino.
- Capaz de sobrevivir y colonizar el tracto intestinal.
- Capaz de producir sustancias antimicrobiales.
- Capaz de modular respuestas inmunes (efectos sobre la salud clínicamente validados y documentados) (Leveau & Bouix, 2000).

La mayoría de los probióticos son BAL (lactobacilos, lactococos, estreptococos, enterococos y bifidobacterias), también son considerados probióticos algunas levaduras no patógenas como *Saccharomyces* (Leveau & Bouix, 2000).

Los efectos antimicrobiales de las BAL están asociadas a su producción de ácido láctico (reducción de pH en el medio), producción de ácido acético, diacetil, peróxido de hidrógeno, ácidos grasos, aldehídos y otros compuestos (Erdogrul & Erbilir, 2006).

Los efectos en la salud atribuidos a los probióticos son numerosos y existen evidencias de que los probióticos son benéficos en la prevención y tratamiento de ciertas enfermedades.

Se ha demostrado que el consumo de yogur mejora los problemas provocados por la intolerancia a la lactosa (García-Albiach et al., 2008; Elli et al, 2006; He, 2007) gracias al bajo contenido de lactosa en el yogur, pero principalmente por la presencia de la enzima microbiana beta-galactosidasa (Savaiano & Levitt, 2000).

A las 3 – 7 horas de haber sido consumido el producto probiótico, este se encuentra en el intestino delgado (exactamente en el íleon) en forma viable y en cantidades

adecuadas para realizar sus efectos benéficos (Lick et al., 2001). En el caso de ingesta de yogur que contiene *Lactobacillus*, *Streptococcus* y *Bifidobacterium* por pacientes durante seis semanas, se observó una disminución notable de los síntomas provocados por la colitis ulcerativa activa (Bibiloni et al., 2005).

Otros de los beneficios a la salud de los probióticos es la reducción de la hipersensibilidad visceral, asociada con la inflamación y estrés psicológico. Además corrigen la fermentación colónica y estabilizan la microbiota del colon reduciendo así los síntomas relacionados con el síndrome de intestino irritable (Spiller, 2008). También ha sido comprobada la efectividad de los probióticos en la disminución de los efectos secundarios de las terapias con antibióticos, colitis y prevención de alergias (Schultz et al., 2004).

Dentro de los mecanismos de acción de los probióticos están (Haarman & Knol, 2006):

- a) Bloquean el sitio de unión en el intestino a las bacterias patógenas.
- b) Competencia por sustratos.
- c) Producción de sustancias inhibitorias (ácido láctico, bacteriocinas, etc.).
- d) Modulación específica o inespecífica de la inmunidad.

En la siguiente tabla (Tabla 7) se observan otros beneficios a la salud aportados por productos probióticos:

Tabla 7. Beneficios a la salud aportados por productos probióticos.

Tipo de probiótico	Beneficio a la salud	Referencia bibliográfica
Yogur ( <i>Lb. bulgaricus</i> y <i>Str. thermophilus</i> )	Controla la diarrea del viajero producida por <i>E. coli</i>	Jensen y Kroger, 2000
Yogur adicionado con <i>Lb. acidophilus</i> ó <i>Bifidobacterium longum</i>	Disminución de niveles de colesterol	Krauss y Kritchevsky, 2000
Yogur	Disminución en el riesgo de cáncer de colon	Lipkin y Wargovich, 2000



Yogur adicionado con <i>Bifidobacterium animalis</i> ssp. <i>lactis</i>	Ayuda en la terapia de pacientes con Dermatitis atópica intractable	Matsumoto et al., 2007
Yogur	Contrarresta la infección de <i>H.</i> <i>pylori</i>	Adolfsson et al., 2004

Además de los beneficios otorgados por las BAL a la salud, el consumo de yogur evita el desarrollo de osteoporosis en los consumidores gracias a su contenido de calcio y vitamina D (Heaney & Weaver, 2000).

### III. YOGUR

Los alimentos fermentados son el proceso biotecnológico más antiguo del mundo. La producción de los alimentos fermentados también es importante debido a que dan valor agregado a la materia prima agrícola (leche, frutos, cereales, etc.) y a su vez proveen ingresos y generan fuentes de trabajo (Giraffa, 2004; Cocolin et al., 2000).

El proceso de elaboración del yogur es un arte muy antiguo, siendo posiblemente anterior a la domesticación de vacas, ovejas y cabras, pero hasta el siglo XIX apenas se conocían los fundamentos de las distintas fases de la producción. Los microorganismos y sus enzimas, es decir, los cultivos estárter, juegan un papel esencial en la producción del yogur por su contribución al desarrollo de la acidez y el sabor del producto (Tamime & Robinson, 1991).

El yogur se produce con un cultivo iniciador mixto de *Str. thermophilus* y *Lb. bulgaricus* en proporción 1:1. El coco (*Str. thermophilus*) crece más rápido que el bacilo (*Lb. bulgaricus*) y es el *Str. thermophilus* el principal responsable de la producción inicial de ácido láctico a un ritmo mayor que el producido por ambos cuando crecen solos. *Lb. bulgaricus* produce más acetaldehído cuando crece en asociación con *Str. thermophilus* que cuando se cultiva solo. El coco es capaz de producir aproximadamente el 0.5 % del ácido láctico y el bacilo aproximadamente el 0.6 – 0.8 % (pH de 4.2 – 4.5). Sin embargo, si la incubación se prolonga, el pH puede disminuir hasta aproximadamente 3.5

aumentando el ácido láctico hasta el 2 % aproximadamente. Durante la fermentación, primero crece el coco que el bacilo, de modo que después de más o menos tres horas las cantidades de ambos organismos deben ser aproximadamente iguales. Los estreptococos tienden a ser inhibidos a pH de 4.2 – 4.4, mientras que los lactobacilos pueden tolerar valores situados en el intervalo 3.5 – 3.8 (Jay, 2000).

Para la producción de yogur se ha utilizado leche de distintas especies animales; por tal razón en función del tipo de leche utilizada se presentan variaciones en la calidad del yogur. Al igual la composición de la leche de vaca varía entre razas y también dentro de una misma raza en función de la selección del animal, fase de lactación, edad, estado sanitario de la ubre, infecciones, alimentación, condiciones climáticas, estación del año, o incluso el tiempo transcurrido entre los ordeños. Para evitar los efectos de estas variaciones de la calidad del yogur es preciso recurrir a la estandarización – normalización y/o enriquecimiento de la misma (Tamime & Robinson, 1991).

#### 1. Estandarización o normalización del contenido graso de la leche

El contenido en grasa de los distintos tipos de yogur de distintas partes del mundo varía de un 0.1 a un 10 %. Por ejemplo, en Estados Unidos el contenido de grasa en el yogur desnatado es de 0.5 – 1%, en el semidesnatado es de 2 – 2.8% y en el normal es de 3 – 3.8 %. Los métodos para la estandarización de la leche incluyen: eliminación de parte de la grasa de la leche, mezcla de leche entera y leche desnatada, adición de nata a leche entera o desnatada y una mezcla de los primeros dos métodos por medio de centrifugas (Tamime & Robinson, 1991).

#### 2. Estandarización del extracto seco magro de la leche

Las propiedades físicas del yogur, es decir, consistencia/viscosidad del coágulo, son de gran importancia; cuanto mayor sea el contenido de extracto seco magro de la mezcla destinada a la elaboración de yogur, mayor consistencia y viscosidad tendrá el producto final. La viscosidad mejora notablemente al aumentar el extracto seco magro de la leche de un 12 a un 20 %. El yogur de mejor calidad se obtiene con un extracto

seco magro total del 15 – 16 %, aunque la mayoría de los yogures comerciales contienen un extracto seco magro total del 14 – 15 % (Tamime & Robinson, 1991).

Métodos para aumentar el extracto seco magro de la leche para elaboración de yogur:

1. Tradicional: consiste en mantener la leche en ebullición hasta reducir el volumen a  $2/3$  del volumen inicial. El grado de concentración no se puede medir exactamente, pero si aproximadamente; como por ejemplo: una leche de 13 % de extracto seco magro al perder  $1/3$  de su volumen inicial contendrá alrededor de un 19 – 20 % de extracto seco magro.
2. Adición de leche en polvo: la proporción de leche en polvo añadida a la mezcla base puede variar entre 1 – 6 %, recomendándose 3 – 4 %.
3. Adición de mazada en polvo: la mazada es un subproducto de la elaboración de mantequilla dulce.
4. Adición de suero de leche en polvo: el porcentaje de adición recomendado es de 1 – 2 % ya que concentraciones superiores pueden originar un desagradable “sabor a suero”.
5. Adición de caseína en polvo: el porcentaje de adición en comparación con la leche desnatada en polvo es de 1 a 3.
6. Concentración por evaporación: este método es ampliamente utilizado en la industria. La cantidad de agua eliminada es alrededor de un 10 – 25 % lo que equivale a un incremento en el extracto seco total de un 2 – 4 %. Otras de las ventajas del proceso de evaporación son: la eliminación del agua de la leche se hace al vacío lo que permite arrastrar el aire retenido, mejorando la estabilidad del coágulo y reduciendo la sinéresis durante el almacenamiento del producto final y durante la elaboración de yogur de leche de cabra el proceso de evaporación mejora la consistencia y reduce el “sabor a cabra” del producto final (Tamime & Robinson, 1991).
7. Concentración por filtración por membranas: este método también es de amplio uso en la industria; el proceso de ultrafiltración, filtra o tamiza la leche,

de esta manera las membranas retienen compuestos de peso molecular elevado, por lo cual el permeato contiene agua, lactosa, sales y vitaminas (Muñi et al., 2005). A partir de leche entera concentrada por ultrafiltración hasta un extracto seco magro total de 18 – 20 % se obtiene un yogur suave y cremoso, con un típico sabor ácido, no siendo necesario homogenizar la leche tras la concentración (Goulas & Grandison, 2008).

La elección del método de enriquecimiento en cada caso concreto depende del costo y disponibilidad de las materias primas, la escala de producción y la inversión de capital para el equipo necesario (Tamime & Robinson, 1991).

### 3. Adición de estabilizantes / emulsionantes:

La finalidad de agregar estabilizantes a la mezcla base es para mejorar y mantener las características deseables del yogur: textura, viscosidad/consistencia, aspecto y cuerpo. El coágulo es sometido a un efecto mecánico durante la elaboración (Tamime & Robinson, 1991).

- Agitación en el tanque de fermentación al final del período de incubación o en el tanque de refrigeración.
- Bombeo hacia un intercambiador de calor de placas o de tubos.
- Mezcla para incorporar frutas o aromas al coágulo, seguida de bombeo hasta la máquina de embasado.
- Tratamiento térmico post – fermentación en el caso de elaboración de yogur pasteurizado, UHT o de larga conservación.

Todo esto disminuye la viscosidad y da paso a una separación del lactosuero; este tipo de defectos se puede solventar mediante la adición de estabilizantes. La clasificación de estos estabilizantes / emulsionantes se da en función de la técnica de procesado empleada (Tabla 8):

Tabla 8. Clasificación de estabilizantes/emulsionantes según la técnica de procesamiento empleada para su obtención (Tamime & Robinson, 1991).

Clasificación	Proceso de obtención	Ejemplos
Gomas naturales	Se encuentran como tal en la naturaleza	<p><b>Vegetales:</b> exudados (goma arábica y de karaya) y extractos (pectinas)</p> <p><b>Gomas de algas:</b> extractos (agar, alginatos, carragenatos)</p> <p><b>Almidones de cereales</b> (trigo y maíz)</p> <p><b>Animales</b> (gelatinas y caseínas)</p>
Gomas naturales modificadas o semisintéticas	Gomas naturales químicamente modificadas o materiales semejantes a las gomas	<p><b>Derivados de celulosa</b> (carboximetilcelulosa, metil celulosa y hidroxietilcelulosa)</p> <p><b>Productos del metabolismo microbiano</b> (dextranos y xantanos)</p> <p><b>Almidones pregelificados</b></p> <p><b>Almidones modificados</b> (almidón carboximetilado)</p>
Gomas sintéticas *	Obtenidas por síntesis química	<b>Polímeros</b> (derivados del polivinilo y del polietileno)

\* Su utilización en el yogur está limitada, ya que no están incluidos en las listas positivas de la “Food and Drugs Administration” ni en las de la FAO/OMS.

Las concentraciones de estabilizantes en el yogur están limitadas por la FAO/OMS:

- 0.02 – 0.2 % para pectinas o almidones modificados.

- 0.2 – 0.5 % para agar – agar, alginato, gelatina o carragenatos.
- 1 – 2 % para preparaciones de almidón.

Otro factor que condiciona la concentración de estabilizantes que se añade a la leche para la elaboración de yogur es el porcentaje de extracto seco total; las concentraciones óptimas para una mezcla de gelatina/gomas vegetales son de 0.5; 0.45; 0.40; 0.3 y 0.25 % para leches con un extracto seco total de 12.5; 14.5; 16.5; 19.0 y 22.0 % (Tamime & Robinson, 1991).

#### 4. Adición de azúcares y/o agentes edulcorantes:

En la elaboración de yogur con frutas, yogur con sabor a frutas y en algunos casos yogur natural azucarado o edulcorado, suelen adicionarse azúcares o agentes edulcorantes. La principal finalidad de esta adición es atenuar la acidez del producto final. Esta cantidad de azúcar o edulcorante añadido depende de: el tipo de agente edulcorante o azúcar utilizado, la fruta utilizada, los posibles efectos inhibidores sobre los microorganismos estárteres del yogur y las consideraciones económicas (Tamime & Robinson, 1991).

Se comprobó una disminución en la producción de ácido por *Str. thermophilus* y *Lb. bulgaricus* en leche concentrada (con un extracto seco total de 16.5 %) cuando la concentración de azúcar se incrementaba de un 6 a un 12 %. El examen microscópico del yogur mostraba en primer lugar que *Str. thermophilus* presenta mayor tolerancia a las altas concentraciones de azúcar que *Lb. bulgaricus*, y en segundo lugar, la presentación de modificaciones morfológicas de las células, que aparecían retorcidas, alargadas, y con un aspecto anómalo. Es evidente que la tolerancia de los cultivos estárteres a los azúcares depende de la cepa, por lo cual es aconsejable una cuidadosa selección de cepas de cultivos estárteres utilizados para la fermentación de leche previamente edulcorada o azucarada. La inhibición del crecimiento de los cultivos estárteres del yogur en leche con extracto seco total de 14 – 16 % adicionada con azúcar (10 – 12 %), se debe principalmente a un efecto osmótico adverso de los solutos

de la leche, así como una baja “actividad de agua ( $A_w$ )”. Esta  $A_w$  es importante desde el punto de vista de control de calidad, ya que el crecimiento microbiano como la actividad enzimática están relacionados con la  $A_w$ ; por lo que es posible suponer que tanto la presión osmótica como la actividad de agua están relacionadas con el efecto inhibitor señalado sobre los microorganismos del yogur. Se comprobó una inhibición de los cultivos estériles del yogur inoculados en leche (con extracto seco total de 21 %) adicionada con un 3 % de azúcar. El efecto inhibitor era atribuible a la  $A_w$ , puesto que era poco probable que una disolución de azúcar al 3 % generase una presión osmótica suficiente para frenar el crecimiento de los microorganismos (Tamime & Robinson, 1991).

En vista a los datos expuestos, los métodos usuales de adición de agentes edulcorantes o azúcares son: la adición por los fabricantes de yogur de hasta un 5 % de agente edulcorante ó azúcar a la mezcla base, la adición de un preparado de frutas ya edulcorado o azucarado para lograr el “dulzor” deseado en el producto final (Tamime & Robinson, 1991).

Los principales productos utilizados para edulcorar o azucarar son: sacarosa, azúcar invertido (jarabe de sacarosa invertido y jarabe de maíz invertido), fructosa (levulosa), glucosa (dextrosa), jarabe de glucosa/galactosa y otros edulcorantes (sorbitol, sacarina y ciclamato) (Tamime & Robinson, 1991).

La elección del uso de los anteriores azúcares y edulcorantes se determina por lo siguiente:

- Disponibilidad y coste del edulcorante o azúcar, por lo cual la sacarosa es el más utilizado.
- Facilidad de almacenamiento. Los productos cristalizados se almacenan en sacos o en silos, siendo esencial controlar la humedad para evitar su apelmazamiento. Los jarabes se almacenan en contenedores metálicos o en silos.

- Aspectos nutricionales. La fructosa es un azúcar más dulce y una mezcla de sacarosa y fructosa a baja concentración proporciona sabor dulce y pocas calorías. Además la fructosa, al igual que el sorbitol, es absorbida lentamente en el tracto intestinal, lo que posibilita su utilización para la elaboración de yogur para diabéticos (Tamime & Robinson, 1991).

#### 5. Homogeneización:

Consiste en la formación de una emulsión homogénea de dos líquidos inmiscibles: aceite-grasa y agua. En los productos lácteos existen dos categorías de emulsiones:

- Emulsiones de aceite en agua: las gotas de aceite o grasa se encuentran dispersas en la fase acuosa. En esta categoría se incluyen la mayoría de los productos lácteos homogeneizados.
- Emulsiones de agua en aceite: las gotitas de agua se encuentran dispersas en la fase oleosa, siendo la mantequilla el ejemplo más característico (Tamime & Robinson, 1991).

La leche para elaborar yogur es una emulsión “aceite en agua”, la grasa presenta una tendencia a separarse formando una capa superficial (en los tanques de fermentación durante la fermentación). Para prevenir esto la mezcla base es sometida a un proceso de mezclado a elevada velocidad u homogeneización; la leche es forzada a pasar a través de un pequeño orificio a elevada presión (Tamime & Robinson, 1991).

Efectos de la homogeneización y las modificaciones observadas en el yogur:

- Aumento de la viscosidad: reducción del tamaño de los glóbulos grasos y aumento de la adsorción sobre las micelas de caseína, lo que determina un aumento del volumen total efectivo de sustancias en “suspensión”.
- Color más blanco: el aumento del número de glóbulos grasos aumenta la reflexión y dispersión de la luz.
- Mezcla correcta: especialmente si la leche es enriquecida con leche en polvo.



- Estabilidad de las proteínas: se observan cambios en las interacciones proteína-proteína debido en parte a un cierto grado de desnaturalización y a las modificaciones de equilibrio salino.
- Caseína presente en la fase no grasa: transferencia parcial desde la fase no grasa formando una nueva membrana alrededor de los pequeños glóbulos grasos aparecidos.
- Sinéresis: aumenta la hidrofobicidad y la capacidad de retención de agua debido a las caseínas que forman parte de la membrana del glóbulo graso y a otras interacciones proteína-proteína (Tamime & Robinson, 1991).

Para la producción de yogur de leche de cabra es esencial recurrir a la homogeneización. Después de 14 días de almacenamiento se observa una disminución de la consistencia del yogur, obteniéndose los mejores resultados con leche de cabra concentrada por ultrafiltración. La viscosidad del yogur de leche de cabra es menor a la del yogur de leche de vaca, debido al bajo contenido proteico de la primera (Tamime & Robinson, 1991).

#### 6. Tratamiento Térmico:

Los efectos del tratamiento térmico se resumen en:

- a) Destrucción de microorganismos patógenos.
- b) Producción de factores estimulantes e inhibidores: el calentamiento de la leche puede determinar la producción de ciertos factores que pueden estimular o inhibir la actividad de los cultivo estárter lácticos. Estimulación de los cultivos estárter en leche sometida a un tratamiento térmico de 62 °C / 30 minutos o de 72 °C / 40 minutos; inhibición de los cultivos estárter en leche sometida a un calentamiento entre 72°C durante 45 minutos, 82° C durante 10 – 120 minutos o 90°C durante 1 – 45 minutos (de Jong, 2008).

Este ciclo de estimulación/inhibición es debido a los cambios experimentados por las proteínas del lactosuero y puede ser reproducido mediante adición de proteínas

del lactosuero desnaturalizadas o de clorhidrato de cisteína. El paso de una etapa del ciclo a otra, podría ser consecuencia de la liberación de compuestos nitrogenados desnaturalizados. La cisteína actúa como factor estimulante en leche cruda y sometida a un calentamiento suave, pero cuando el tratamiento térmico es intenso actúa como inhibidor (de Jong, 2008).

c) Inactivación de enzimas: la inactivación de enzimas de la leche es un efecto positivo ya que muchas enzimas afectan de forma negativa el sabor y reducen la vida de anaquel de los subproductos lácteos.

d) Cambios en las propiedades físico-químicas de la leche:

- Efecto sobre las proteínas: en primer lugar se produce una alteración de la estructura, causando la desnaturalización y en segundo lugar una agregación seguida por coagulación, dependiendo de la intensidad y duración del calentamiento.
- Efecto sobre las sales de la leche: el calentamiento afecta las sales de la leche especialmente el calcio, fosfato, citrato y magnesio. Estas sales se encuentran en estado soluble o coloidal formando parte de las micelas de caseína. El calentamiento de la leche a 85° C / 30 minutos puede dar lugar a un paso del 16 % del calcio soluble a la fase coloidal.
- Efecto sobre las vitaminas de la leche: las vitaminas hidrosolubles (B y C) son termolábiles y presentan pérdidas durante el proceso de elaboración. La presencia de oxígeno disuelto aumenta notablemente la destrucción de estas vitaminas (de Jong, 2008).

### 7. Proceso de fermentación:

La fermentación tiene lugar a temperaturas de 40 – 45° C que son las condiciones óptimas de crecimiento del cultivo estárter (*Str. thermophilus* y *Lb. bulgaricus*). En algunos casos el período de incubación puede ser de dos horas y media para cultivos estárter activos a una concentración del 3 % (Tamime & Robinson, 1991).

La fase de fermentación puede tener lugar en envases de comercialización, en el caso de yogur tradicional, o en tanques, para la elaboración de yogur batido. La única diferencia entre yogur tradicional y yogur batido está en las propiedades reológicas del coágulo, ya que en el primer tipo la leche se deja en reposo durante la incubación lo que determina la formación de un coágulo continuo semisólido, y en el yogur batido resulta de la ruptura de la estructura del gel al final de la incubación, antes del enfriamiento y tratamiento posterior (Tamime & Robinson, 1991).

La formación del gel que constituye el yogur es el resultado de modificaciones físicas y químicas en la leche:

- a) Los estárteres metabolizan la lactosa presente en la leche para cubrir sus necesidades energéticas, dando lugar a la formación de ácido láctico y de otros compuestos importantes.
- b) La producción gradual de ácido láctico comienza a desestabilizar los complejos de caseína-proteínas del lactosuero desnaturalizadas, por solubilización del fosfato cálcico de los citratos.
- c) Los agregados de micelas de caseína y/o las micelas aisladas se van asociando y coalescen parcialmente a medida que el pH se aproxima a su punto isoeléctrico de 4.6 – 4.7 (Tamime & Robinson, 1991).

#### 8. Enfriamiento:

La refrigeración es uno de los métodos tradicionales más empleados para controlar la actividad metabólica de los cultivos estárter y sus enzimas. El enfriamiento comienza inmediatamente después de alcanzar la acidez óptima del producto; pH de 4.6 ó una concentración de ácido láctico del 0.9 %. El objetivo básico es disminuir la temperatura del coágulo de 45° C a menos de 10° C tan rápidamente como sea posible, para así controlar la acidez final del producto (Tamime & Robinson, 1991).

El enfriamiento se puede hacer en dos fases: En la primera fase se reduce la temperatura de 45° C a 15 – 20° C, antes de la adición de los aromatizantes y del

envasado. La segunda fase se realiza en cámaras de refrigeración donde se enfría el producto hasta temperaturas inferiores a 10° C. El enfriamiento final se lleva a cabo en el embase de comercialización, mejorando la viscosidad del producto tras 1 – 2 días de almacenamiento en reposo (Tamime & Robinson, 1991).

Recomendaciones sobre el enfriamiento:

- La calidad del yogur batido mejora al envasarlo a 24° C y refrigerando después el producto envasado.
- La segunda fase del enfriamiento debe llevarse a cabo tan lentamente como sea posible, durante un periodo de unas 12 horas (Tamime & Robinson, 1991).

#### 9. Adición de aromatizantes y colorantes:

El aumento en el consumo de yogur se debe a la diversidad de formas de presentación del producto y a la gama cada vez mayor de yogures de frutas y /o distintos sabores (Tamime & Robinson, 1991).

Los aromas y agentes aromatizantes más utilizados en la industria del yogur son:

- a) Frutas: confituras de frutas (70% de fruta y 30% de agua), frutas en conserva, frutas congeladas, puré de frutas, jarabe de frutas y mermeladas.
- b) Aromatizantes: El tratamiento térmico de los preparados de frutas originan una disminución de la intensidad del aroma, por lo que se adicionan agentes aromatizantes para compensar estas pérdidas. Para la elaboración de yogur aromatizado se utilizan: productos dulces (miel, jarabe de arce, caramelo de azúcar con mantequilla); frutos secos (coco, avellana, nueces, nueces del Brasil); cereales; hortalizas (pepino, tomate, apio); otros (café, moka, especias, pimentón, vainilla).
- c) Colorantes: La adición de colorantes al yogur tiene la intención de aumentar el atractivo del producto. Algunos de los colorantes permitidos para su uso en yogur son: Tartrazina, Cochinilla o ácido carmínico, Eritrosina BS, Índigo carmín,

Caramelo 3, Marrón chocolate FB y otros colorantes naturales extraídos de frutas u hortalizas (Tamime & Robinson, 1991).

## 10. Envasado:

El envasado es una forma de asegurar la distribución del producto hasta el consumidor final en adecuadas condiciones y con un mínimo costo (Tamime & Robinson, 1991).

Los materiales de envasado deben ser atóxicos y químicamente inertes (no reaccionar con el producto que contienen). Por esta razón los plásticos son ampliamente utilizados en la industria láctea debido a la naturaleza ácida del producto. Dentro de los envases plásticos están: polietileno (PE), polipropileno (PP), poliestireno (PS) y cloruro de polivinilo (PVC). Otros envases utilizados son: botellas de vidrio y envases de barro (Tamime & Robinson, 1991).

### **A. Tipos de Yogur**

#### **1. Yogur Tradicional**

El proceso de elaboración de yogur tradicional consta de los siguientes pasos (Tamime & Robinson, 1991):

- a) Hervir la leche hasta reducir su volumen a 2/3 del inicial para logra así su concentración.
- b) Enfriar hasta la temperatura de incubación (temperatura ambiente o templada).
- c) Inocular el cultivo estárter (este cultivo estárter se toma del yogur del día anterior).
- d) Incubar a granel hasta que se forme el coágulo (durante una noche a temperatura ambiente).
- e) Refrigerar.
- f) Consumir o comercializar.

Inconvenientes de la elaboración de yogur con el proceso tradicional (Tamime & Robinson, 1991):

- Las siembras repetidas del cultivo estándar tienden a estabilizar la relación entre *Str. thermophilus* y *Lb. bulgaricus* o pueden dar lugar a mutaciones hacia la 15 – 20ª resiembra.
- La incubación a temperatura ambiente, da una lenta acidificación de la leche (18 horas o más).
- La lenta acidificación tiene efectos secundarios no deseables como la sinéresis lo cual influye negativamente en la calidad del yogur.
- Este proceso no permite controlar la concentración de ácido láctico producido durante la fermentación.

## **2. Yogur Líquido o Yogur para beber**

El yogur líquido de baja viscosidad se hizo popular en el Oriente Medio. Se logra a través de dos métodos (Tamime & Robinson, 1991):

- La producción de yogur es a partir de leche entera sin adición de azúcares. Seguido del proceso de incubación, el yogur se agita y se refrigera.
- Después de la refrigeración se le adiciona agua a un volumen de 1:1, se condimenta con sal y se aromatiza con menta. Una característica distintiva de este tipo de yogur es la sinéresis (separación de los sólidos y el lactosuero) lo que exige que el producto se agite antes del consumo. La adición de sal ayuda a mantener el balance de sales en el organismo de los consumidores que viven en climas muy calientes.

El yogur es elaborado a partir de una mezcla base con un bajo extracto seco total (9.25 %). En las plantas de fabricación de yogur para beber se utilizan bombas centrífugas para la transferencia del yogur de los tanques de incubación a los refrigeradores; alternamente se agita a alta velocidad para romper el coágulo. (Tamime & Robinson, 1991).

El yogur descrito anteriormente no debe ser considerado realmente como un yogur, sino como bebida tipo yogur, ya que para conseguir larga vida de anaquel, el producto fermentado es calentado nuevamente antes de ser envasado; por lo tanto su cultivo estárter se encuentra ahora inactivado; y la definición de yogur en muchos países estipula que la biota contenida en el producto final consiste en *Str. thermophilus* y *Lb. bulgaricus* “viable” (Tamime & Robinson, 1991).

Generalmente el yogur para beber está dedicado a un grupo específico de consumidores, los niños, por lo cual se ha incrementado su contenido en azúcares, además de sabores y aromas mucho más llamativos. El empaque del producto también ha evolucionado para hacerlo más atractivo para estos consumidores (Nilsson et al., 2006).

Existe también otro grupo de consumidores que están interesados en el cuidado de la salud, por lo que estos yogures presentan muy bajo contenido de grasas y contienen bacterias probióticas, además son adicionados con componentes prebióticos (Nilsson et al., 2006).

Para evitar la sinéresis en este tipo de yogur, aditivos estabilizantes deben ser agregados a la mezcla base. Los estabilizantes con los que se obtienen mejores resultados son los que proveen al yogur de una “estabilización esteárica”. La forma de evitar la sedimentación de las proteínas es prevenir que estas partículas se unan entre sí; esto se logra al utilizar estabilizantes que tengan interacción electroestática con las caseínas (Nilsson et al., 2006).

Dentro de estos estabilizantes se encuentran: high ester pectinas, carboximetilcelulosa de sodio (Na-CMC) y polisacáridos solubles derivados de la soya (SSPS). De estos tres estabilizantes el de uso más común es la high ester pectina, cuya presentación comercial es en forma de polvo higroscópico (que hace difícil su adición al yogur ya que puede formar aglomerados y por este motivo en la fase de la fermentación se utilizan fermentadores que cuentan con propelas que trabajan a muy alta velocidad) que se activa a pH de 3.7 – 4.3 (Nilsson et al., 2006).

La molécula de pectina contiene cadenas largas de ácido galacturónico que está cargado negativamente, el cual se une a las moléculas de caseína (carga positiva); además otra parte de la molécula de pectina está conformada por cadenas de ácido galacturónico esterificado que tienen afinidad por azúcares pesados como galactosa, ramnosa y arabinosa. Esta estructura única de la molécula de pectina con sus dos regiones asegura que una parte de la molécula se una a las caseínas, mientras que la otra parte de la molécula impide que las caseínas se unan entre sí (Nilsson et al., 2006).

Los tanques de fermentación están provistos de un agitador (propela) que trabaja a muy alta velocidad para asegurar un buen mezclado de la leche, cultivo estéril liofilizado de baja viscosidad y también para una adecuada ruptura del coágulo (Nilsson et al., 2006). La composición clásica del yogur para beber (Tabla 9):

Tabla 9. Composición de yogur líquido o para beber (Tamime & Robinson, 1991).

Grasa	1 -2 %
Extracto seco magro lácteo	9.25 %
Azúcar	5.5 %
Estabilizante	0.27 %
Jarabe de fruta con un extracto seco del 14 %	5.5 %

#### a. Elaboración de yogur en reactores biológicos

La producción de microorganismos de interés comercial típicamente se conduce en reactores biológicos (RB) tipo tanque. Estos RB proveen al microorganismo del entorno adecuado para su crecimiento, en ellos se ejerce control sobre las variables críticas, tales como concentración de oxígeno (O<sub>2</sub>), temperatura, pH, nivel de agitación, etc., que determinan el crecimiento y condición metabólica del microorganismo (Aguirre-Ezkauriatza, 2008).

En la investigación de Galarza-González (2005), sobre la elaboración yogur para beber en RB con capacidad para 5 L, se llega a las siguientes conclusiones: no hubo diferencia



en el tiempo de fermentación de yogur en agitación como en no agitado, pero que al llevarse este proceso a nivel industrial utilizándose tanque de 5 a 15 toneladas de capacidad, se esperan variaciones en estos resultados debido a la acentuación de gradientes de temperatura. Además se observó que la producción de ácido láctico por las BAL no fue afectada al agitar constantemente el yogur.

### Efecto del O<sub>2</sub> durante la producción de yogur líquido o para beber en reactores biológicos

Las bacterias ácido lácticas (BAL) son anaerobias facultativas con predilección a condiciones anaerobias de crecimiento. Algunas cepas de estreptococos lácticos son capaces de crecer y sobrevivir en condiciones aeróbicas ya que pueden remover peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) el cual es un supuesto agente tóxico del metabolismo de estreptococos. *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* es la BAL que tolera menos el oxígeno; en presencia de éste, *Lactobacillus* produce grandes cantidades de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> el cual activa el sistema lactoperoxidasa-hidrógeno peróxido-tiocianetos (LPS por sus siglas en inglés) de la leche e inhibe su crecimiento y también el crecimiento de otras bacterias (Beshkova et al., 2002).

Fermentaciones de cultivos de yogur aerobias y anaerobias se realizaron a 43° C en un fermentador de 2 L (MBR AG, Suiza) a una velocidad de mezclado de 250 rpm y 0 rpm. Se observó un dramático decremento en el número de células viables de *Lb. bulgaricus* 22-11 debido al impacto provocado por una concentración de oxígeno del 30%. A estas condiciones *Lb. bulgaricus* no fue capaz de producir la suficiente cantidad de ácido láctico después de siete horas de fermentación; en cambio la cepa aerofílica de *Streptococcus* fue capaz de crecer adecuadamente. La baja concentración de lactobacilos viables no afectó dramáticamente la actividad del cultivo mixto para coagular la caseína ya que la producción de ácido láctico provino de *Streptococcus*, pero el proceso de fermentación se extendió dos horas en comparación con procesos

anaerobios. En concentraciones mayores al 30% de oxígeno disuelto la tolerancia de *Str. thermophilus* baja (Beshkova et al., 2002).

Las fermentaciones experimentales realizadas por Aguirre-Ezkauriatza y colaboradores (2008) se llevaron a cabo a 40°C en un fermentador de 5 L (New Brunswick Scientific, Edison, NJ) a baja agitación (200 rpm) y sin agitar (0 rpm).

El comportamiento de la población de *Lb. bulgaricus* fue diferente en las fermentaciones agitadas y no agitadas. Después de cuatro horas de fermentación, se observó una desaceleración en la curva de crecimiento en las fermentaciones agitadas. Además la población final de *Lb. bulgaricus* en la fermentación no agitada fue tres veces mayor que en las fermentaciones agitadas (al mismo pH). Esto se debe a que la agitación pudo aumentar la transferencia de oxígeno del espacio de cabeza hacia el líquido en fermentación, creando un ambiente menos anaerobio (microaerofílico) durante la fermentación (Aguirre-Ezkauriatza et al., 2008).

#### **IV. TECNICAS MICROBIOLÓGICAS DE CUANTIFICACIÓN**

Para entender la presencia y el crecimiento de los microorganismos en los alimentos se reconoce en la actualidad la importancia de su estudio con un enfoque ecológico. La producción de alimentos fermentados en condiciones controladas y su calidad dependen del conocimiento y control de la microbiota presente (Díaz & Wachter, 2003).

El crecimiento de las poblaciones se mide por el aumento del número de células presentes. Existen dos métodos de cuantificación: cuantificación de células viables por cuenta en placa o plato y conteo de células totales.

##### **A. Conteos en Placa**

Esta técnica de cuantificación es una de las más antiguas y más ampliamente usadas en microbiología.

Una célula viable se define como aquella célula capaz de dividirse y tener descendencia y lo vemos representado en la capacidad de las células presentes en una muestra para formar colonias en un medio microbiológico con agar (polisacárido derivado de algas marinas). Se asume que cada célula viable formará una colonia (Weaver et al., 1994).

Hay dos técnicas para realizar el conteo en placa (Weaver et al., 1994):

- a) Extendido en plato: En un plato se vacían de 15 – 20 ml de medio microbiológico con agar y se deja enfriar, a continuación se transfiere una alícuota de cultivo diluido no mayor a 0.1 ml sobre la superficie (en el centro) del agar; esta gota se extiende con una haza microbiológica de vidrio estéril. Mover el haza hacia delante y hacia tras mientras se rota el plato por aproximadamente 15 segundos. Tapar el plato e invertirlo para incubarlo.
- b) Vaciado en plato: En el centro de un plato estéril se coloca 1 ml de cultivo diluido, seguidamente se vacía 15 – 20 ml del agar a una temperatura de 40 – 45° C, mezclar muy bien con 6 movimientos a favor del reloj y 6 movimientos en contra del reloj. Dejar enfriar hasta que el agar solidifique. Tapar e invertir para su incubación.

El uso de esta técnica está indicado en el caso de las bacterias aerotolerantes.

En ambos casos se realizará la cuantificación de las colonias en platos que presenten de 30 – 300 colonias. Esta regla data de 1916 cuando Breed y Dotherrer demostraron que en cuentas debajo de 30 colonias disminuye rápidamente la precisión de la técnica, y al contar más de 300 colonias no incrementa dicha precisión (Weaver et al., 1994).

La Norma Oficial Mexicana indica que el yogur debe de contener como mínimo  $10^6$  UFC/ml (2 millones UFC/ml) de *Str. thermophilus* como de *Lb. bulgaricus* (Colín et al., 2006).

### Dilución del cultivo de bacterias:

En las dos técnicas de siembra para el conteo en placa es importante que el número de colonias a desarrollarse no sea muy grande, ya que las colonias tienden a unirse y eso dificulta la cuantificación. Para obtener el número adecuado de colonias, la muestra a contar se debe de diluir. Se realiza diluciones en rango de 10 ( $10^{-1}$ ); para hacer esta dilución rango 10, se toma 1 ml de muestra y se inocula en 9 ml de diluyente (agua peptonada, agua triptonada) es importante que la temperatura del diluyente sea la misma que la temperatura de la muestra para así evitar muerte celular debido a shock térmico (frío o caliente). Para realizar un dilución en rango 100 ( $10^{-2}$ ), tomar 1 ml de la dilución  $10^{-1}$  e inocularlo en 9 ml de diluyente, y así sucesivamente hasta llegar al rango de dilución que deseemos, generalmente se realiza esta operación hasta obtener diluciones  $10^{-7} - 10^{-8}$  (Weaver et al., 1994).

Después del tiempo requerido de incubación se realiza la cuantificación de las colonias y se multiplica por el factor de dilución de cada plato. El factor de dilución es el recíproco de la dilución, ej. En una dilución  $10^{-3}$  se cuantifican 159 colonias, el resultado es  $159 \times 10^3$  células (UFC) por mililitro de la muestra original (Madigan et al., 2000).

### **B. Conteo de Células Totales**

El número de células en una población puede ser medido por un conteo de una muestra bajo un microscopio, esta técnica se conoce como “cuenta directa en microscopio”. Puede hacerse de dos maneras: muestras secas sobre laminilla y muestras líquidas. En el conteo de muestras líquidas se utilizan cámaras especiales, como por ejemplo la Cámara de Neubauer (Madigan et al, 2000).

La cuenta directa en microscopio es una técnica rápida de estimar el número de bacterias en una muestra de alimento; pero hay que tomar en cuenta las siguientes limitaciones (Madigan et al, 2000):

1. Las células muertas no se pueden distinguir de las vivas.

2. Células pequeñas son difíciles de ver bajo el microscopio, y algunas de estas células probablemente queden sin contarse.

3. Se requiere de un microscopio de contraste de fases cuando la muestra no es teñida.

4. La técnica no se recomienda si cuenta con una baja densidad de células en suspensión. Si la suspensión bacteriana es menor a  $10^6$  células por mililitro ( $\text{cél ml}^{-1}$ ), una o ninguna bacteria será vista en el campo del microscopio (Madigan et al, 2000).

Las investigaciones de Moreno y colaboradores (2000) muestran que si el número de células resultantes de la cuenta directa en microscopio es multiplicado por 0.89, este número es equiparable a UFC  $\text{ml}^{-1}$  en lo que se refiere a *Lb. bulgaricus* y *Str. thermophilus* provenientes de inóculos liofilizados.

### **C. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)**

Existen diferentes alternativas para la determinación de la estructura microbiana de los alimentos fermentados. Una de ellas consiste en aislar microorganismos y tipificarlos mediante técnicas basadas en ADN (Díaz & Wachter, 2003).

La técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) fue inventada por Kary B. Mullis en 1983, invención por la cual ganó el Premio Nobel de Química en 1993 (Mohr et al., 2006).

Una reacción de PCR está compuesta por:

Cebadores: son oligonucleótidos con longitud de alrededor de 20 – 30 pares de bases (pb) los cuales son diseñados para reconocer secuencias específicas del molde de ADN de interés y definir la región a amplificar (Loeffelholz y Deng, 2006). Marcan el punto de inicio de la síntesis de ADN para que la ADN polimerasa termoestable y los trifosfato desoxirribonucleótidos (dNTPs por sus siglas en inglés) sean añadidos. Los cebadores corren de 5' a 3'. Hay dos cebadores: cebador sentido y cebador antisentido (Loeffelholz & Deng, 2006).

Se requiere también de una enzima ADN polimerasa termoestable la cual se aisló de la bacteria *Thermus aquaticus* que es un habitante natural de géiseres y resiste temperaturas hasta de 90° C, esta enzima es conocida con el nombre de Taq ADN polimerasa (Loeffelholz & Deng, 2006).

Otros constituyentes esenciales de la reacción de la PCR es el molde de ADN de interés, los dNTPs (proveen la energía y los nucleótidos necesarios para la síntesis de ADN. Es importante que se agregue igual cantidad de cada nucleótido “dATP, dGTP, dTTP y dCTP” para que no haya errores por falta de bases), la enzima Taq ADN polimerasa (añade los dNTPs al molde de ADN de interés), el MgCl<sub>2</sub> (catión divalente) y un buffer (generalmente Tris, el cual mantiene el adecuado pH durante la reacción de la PCR) (Loeffelholz & Deng, 2006).

Los ciclos de la PCR están constituidos por tres pasos básicos:

- a) Desnaturalización: este paso se lleva a cabo a temperaturas entre 94 – 96° C, en el cual la hebra de cadena doble de nuestro molde de ADN de interés se separa o desnaturaliza en sus cadenas sencillas, eliminando su estructura secundaria.
- b) Hibridación: se lleva a cabo a temperaturas entre 40 – 60° C cerca de la temperatura de fusión ( $T_m$  por sus siglas en inglés) del molde de ADN, en este paso los dos cebadores se hibridan (alinean) a las regiones opuestas, cada uno con la hebra complementaria del molde de ADN de interés.

Si no contamos con la temperatura de fusión se puede dar una aproximación de la misma con la fórmula de Wallace:

$$T_m = 4 \times (G + C) + 2 \times (A + T) \text{ (Dieffenbach et al., 1993).}$$

- c) Extensión: el paso se lleva a cabo a 72° C, aquí es donde se une la Taq ADN polimerasa junto con los dNTPs para sintetizar las nuevas hebras de ADN, a esta nuevo ADN se le conoce como amplicón.

Una vez que la hebra de ADN se ha formado, los nuevos híbridos ADN – ADN nuevamente son desnaturalizados para comenzar un ciclo nuevo. En los termocicladores la repetición de los ciclos es automática (30 – 40 ciclos), lo cual en

teoría brinda la oportunidad de tener replicaciones exponenciales de la muestra de ADN de interés. En realidad la productividad de los ciclos declina debido a la disminución de cebadores y nucleótidos y también a que mengua la actividad de la Taq ADN polimerasa en los últimos ciclos (Delidow et al., 1993; Loeffelholz & Deng, 2006; Mohr et al., 2006).

El investigador debe de optimizar las condiciones de la PCR para cada combinación de cebadores y molde de ADN de interés. Las seis variables que se deben de optimizar son: temperatura de hibridación, concentración de los cebadores, concentración del molde de ADN de interés, concentración de  $MgCl_2$ , tiempo de extensión y número de ciclos (Delidow et al., 1993).

#### **D. Reacción en cadena de la polimerasa – Electroforesis de gel de gradiente desnaturalizante (PCR-DGGE)**

Muyzer y colaboradores (1993) fueron los primeros en utilizar la técnica de PCR-DGGE para el análisis de comunidades microbianas, ya que la técnica de DGGE se utilizaba para la identificación de mutaciones genéticas (Nakatsu, 2007).

A diferencia de las electroforesis comunes que separan fragmentos de ácido nucleico por su tamaño, el DGGE separa las hebras de ADN por la composición de su secuencia. Fragmentos de ADN de un mismo tamaño son producidos mediante la amplificación por PCR de un gen de interés. Después en un gel formado por un gradiente desnaturalizante lineal son separados los productos de PCR compuestos por diferentes secuencias. Los desnaturalizantes químicos utilizados en DGGE son urea y formamida (Ercolini, 2004; Nakatsu, 2007).

Entre mayor sea el contenido de guanina (G) y citosina (C) dentro de una secuencia, mayor grado desnaturalizante se necesita; esto se debe a que entre G y C existen tres puentes de hidrógeno (H), en cambio solo dos entre adenina (A) y timina (T). Al irse separando las hebras de ADN, más lento es su migración en el gel. La migración de los fragmentos mediante la adición de una secuencia alta en GC (GC clamp) al final de uno

de los cebadores de la PCR da bandas más definidas en el DGGE (Nakatsu, 2007) y una resolución óptima es obtenida cuando las moléculas no se separan totalmente (Ercolini, 2004).

El protocolo para la técnica de PCR-DGGE consta de seis pasos (Figura 4): recolección de la muestra, extracción de ADN, amplificación del gen de interés por medio de la PCR, separación de los amplicones de la PCR por medio de DGGE, visualización y análisis de datos (Nakatsu, 2007).

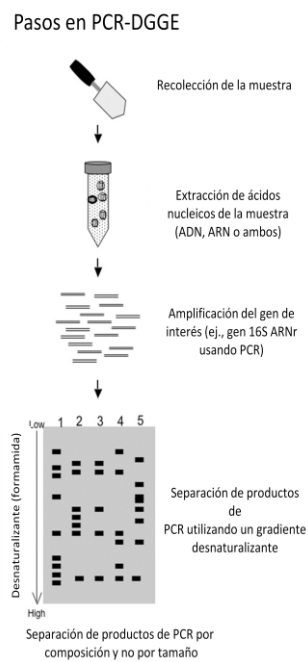


Figura 4. Diagrama de flujo de pasos en el análisis de comunidades microbianas usando PCR-DGGE (Nakatsu, 2007).

### a. Realización de la PCR

Las condiciones de la PCR se deben optimizar al cambiar de comunidades bacterianas a analizar y cuando se utiliza un nuevo par de cebadores. Las variables que comúnmente se optimizan son: temperatura de linearización de los cebadores, concentración de magnesio (cofactor de la enzima polimerasa) y concentración de ácido nucleico (Nakatsu, 2007).



Para prevenir la disminución de la eficiencia de la PCR, es preferible utilizar ácido nucleico diluido. Errores muy comunes en la PCR son la formación de quimeras entre dos diferentes moléculas homólogas, amplificación no específica, producción de productos de una sola hebra, mutantes formados por la incorporación errónea de nucleótidos por la polimerasa de ADN y contaminación con ADN (Wintzingerode et al., 1997).

#### b. Genes de interés para la reacción de la PCR

La mayoría de los estudios de comunidades utilizan genes filogenéticos 16S ARNr, aunque también se pueden utilizar las regiones intergénicas ribosomales (Nakatsu, 2007).

#### c. Realización del DGGE

El mayor reto de la realización del DGGE es hacer el gradiente adecuado en el gel. Para determinar este gradiente, las comunidades al inicio son examinadas utilizando un gradiente desnaturizante muy amplio (20 – 80%); esto permite escoger la concentración ideal, en la cual las bandas muestran una mayor resolución. Una forma de hacer este proceso más sencillo es correr un DGGE con gradiente amplio, después se cortan las bandas de interés y se corre nuevamente otro DGGE con un gradiente desnaturizante con un rango más pequeño y así poder discriminar entre bandas co – migrantes (Ercolini, 2004; Nakatsu, 2007).

El tiempo y el voltaje al cual se corre la electroforesis son las dos variables de mayor importancia para lograr una buena resolución entre bandas. Lastimosamente el tiempo en el cual se debe correr la electroforesis es determinado empíricamente a un voltaje determinado haciendo experimentos a intervalos. La mezcla de productos de la PCR es cargado en el DGGE a intervalo de tiempo (ej. 30 minutos); una vez que los productos de la PCR hayan alcanzado su punto desnaturizante (melting point) ya no migrarán mas allá en el gel aun que se incremente el tiempo de la electroforesis. La mejor

resolución de bandas se obtiene a altos voltajes con tiempos de electroforesis cortos (Nakatsu, 2007).

#### d. Análisis de datos

El número de bandas en el gel se cuantifica y así se obtiene un estimado de especies en una comunidad. La intensidad de las bandas refleja la densidad relativa de los diferentes productos de la PCR en la muestra (Nakatsu, 2007). Para poder realizar esta cuantificación se utiliza un marcador o patrón de referencia, el cual es una alternativa a la secuenciación. El marcador se hace utilizando amplicones de 16S ADNr de especies puras representativas del alimento a analizar (Ercolini, 2004).

Existen programas computacionales que facilitan el análisis de las bandas en los geles, como ejemplo están Bionumerics, Applied Maths, Sint-Martens-Latern, Belgica y Fingerprinting II Informatix, BioRad Laboratories, Hercules, CA (Nakatsu, 2007).

#### e. Retos y limitantes en el Método de DGGE

A pesar de que existen muchas ventajas al utilizar el método PCR-DGGE para el análisis de comunidades microbianas, se debe de tomar en cuenta también sus limitaciones para así poder hacer una adecuada interpretación de los resultados. Una de estas limitaciones es que es casi imposible el poder reproducir los resultados ya que siempre va a existir una pequeña variación entre el gradiente de los geles, esto se debe tomar en cuenta cuando se hacen comparaciones entre geles; por lo cual es muy recomendable la utilización de marcadores de DGGE en todos los geles que se hagan y así tener un punto de comparación. Los marcadores utilizados deben de tener un suficiente número de bandas que abarque la totalidad del gradiente (Nakatsu, 2007).

Investigadores han encontrado que un mismo aislado sencillo de laboratorio produce varias bandas en el DGGE y también a la inversa en la cual una sola banda de DGGE representa una población microbiana (Nakatsu, 2007).

## Aplicaciones del DGGE en Ecología Microbiana Láctea

Este método es de reciente aplicación en la microbiología alimentaria. El potencial en el análisis de muestras de ambientes naturales, estimuló a los microbiólogos alimentarios en investigar la utilidad de este método (PCR – DGGE) en el análisis de comunidades microbianas derivadas de fermentaciones alimentarias (Ercolini, 2004).

La primera aplicación del método PCR – DGGE en la industria alimentaria la realizó Ampe y colaboradores en el año de 1999; ellos estudiaron la distribución espacial de microorganismos en bolas de Pozol (masa fermentada de maíz). Después en el año 2000 Ben Omar y Ampe fueron más lejos en su investigación del Pozol y pudieron analizar con este método el comportamiento de la población microbiana envuelta durante el proceso de elaboración del Pozol (Ercolini, 2004).

En la actualidad los productos lácteos son los alimentos mayormente estudiados y monitoreados durante su fermentación utilizando diferentes regiones 16S ARNr. La industria quesera es la que más uso le ha dado a la PCR-DGGE mediante el monitoreo de la diversidad y dinámica poblacional microbiana durante todo el proceso de elaboración; entre los quesos estudiados están: Stilton (Ercolini et al., 2003a), Mozzarella de búfalo acuático (Ercolini et al., 2003b), Pecorino Siciliano (Randazzo et al., 2005), Domiati (El-Baradei et al., 2007), Ragusano (Randazzo et al., 2002) y Blue-veined Cabrales (Flórez & Mayo, 2006).

En el caso del yogur y yogur con probióticos, las investigaciones realizadas están relacionadas únicamente a control de calidad en el punto de venta, para así poder verificar si el contenido que dice la etiqueta del producto corresponde con el tipo y el número de bacterias (Fasoli et al., 2002; Temmerman et al., 2003).

Clínicamente se ha evaluado mediante PCR-DGGE la presencia de *Lactobacillus delbrueckii* subespecie *bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus* en la microbiota intestinal humana después del consumo de yogur y así verificar si estas bacterias

pueden colonizar el intestino y proveer su efecto benéfico a los consumidores (García-Albianch et al., 2008).

## CAPÍTULO 2

### METODOLOGÍA

#### I. AISLAMIENTO DE CEPAS BACTERIANAS

El inóculo utilizado, en todos los experimentos de este estudio, para la preparación del yogur fue un producto comercial en forma de polvo liofilizado de la marca Altecsa YO814Q (México D.F., México). Dicho producto contiene las bacterias ácido lácticas (BAL), *Lb. bulgaricus* y *Str. thermophilus*. Con el propósito de identificar correctamente las BAL del inóculo, conocer las proporciones de dichos microorganismos, y poder estudiar los microorganismos individualmente, se utilizó la siguiente metodología (Figura 5).

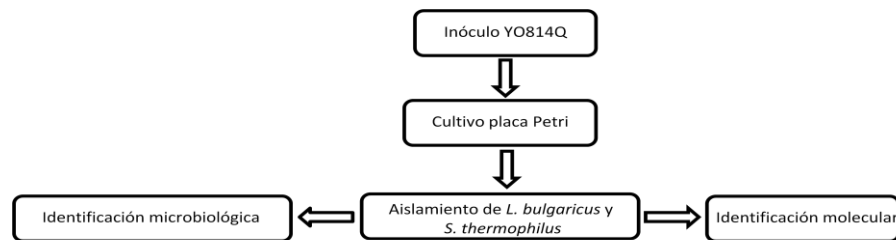


Figura 5. Proceso de aislamiento de *Lb. bulgaricus* y *Str. thermophilus*.

La presentación de dicho inóculo es en forma de polvo o cultivo directo liofilizado. La dosis recomendada por el fabricante es de 0.1 g L<sup>-1</sup>. El inóculo se debe de reconstituir antes de realizar la fermentación del yogur en leche entera comercial (temperada a 42° C) e incubarse a 42° C durante 1 h sin agitación en una incubadora (modelo 1168751H, Fisher Scientific, Göttingen, Alemania).

Pasado este tiempo de incubación se tomó 1 ml de dicho inóculo y se hicieron diluciones con agua peptonada según la norma oficial mexicana para la preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico (NOM-110-SSA1-1994, 1995). Las diluciones 10<sup>-7</sup> y 10<sup>-8</sup> se sembraron por vaciado en cajas Petri con agar LAPTg (preparado según indica Rivas & Garro, 2006); se incubó durante 72 h a 42° C sin agitación.

Se identificaron los microorganismos en el inóculo según la forma de las colonias. *Str. thermophilus* forma colonias típicas circulares o lenticulares, con bordes uniformes y *Lb. bulgaricus* forma colonias de aspecto rugoso con bordes irregulares (Rivas & Garro, 2006). Los microorganismos se aislaron al tomar colonias y resembrarlas por el método de estriado en placas Petri con agar MRS (DB Difco™, Sparks, USA) para *Lb. bulgaricus* y agar LAPTg para *Str. thermophilus*. Ambas placas se incubaron a 42 ° C sin agitación durante 72 y 48 h para *Lb. bulgaricus* y *Str. thermophilus*, respectivamente.

La validación de la identidad de los microorganismos aislados del inóculo de yogur fue comprobada a través de la amplificación de la unidad ribosomal 16S a través de PCR. Los cebadores utilizados para identificar el género de *Lb. bulgaricus* fueron F\_allact\_IS 5' TGGAT GCCTT GGCAC TAGGA 3' y R\_allact\_IS 5' AAATC TCCGG ATCAA AGCTT ACTTA T 3' (Haarman & Knol, 2006) y para la identificación de especie de *Str. thermophilus* fueron D. Strept. Therm 2.5 5' GCTCACCTAGGCGACGATAC 3' y D. Strept. Therm 2.3 5' GCTGCCTCCCGTAGGAGTCT 3' (José Manuel Aguilar, Laboratorio de Biotecnología-ITESM, Monterrey, México). Los PCR se realizaron en un termociclador tiempo final Px2 Thermal Cycler (Thermo ELECTRON CORPORATION, Thermo Scientific. Milford, USA), con un volumen final de reacción de 25 µl conteniendo una colonia de *Lb. bulgaricus* ó *Str. thermophilus* como molde de ADN, ambos cebadores se utilizaron a una concentración de 0.5 µM (Allele Biotechnology & Pharmaceuticals Inc., San Diego, USA), dNTPs mix a una concentración de 0.2 mM (Invitrogen, Alameda, USA), Taq polimerasa a una concentración de 1.5 U (Feldan, Quebec, Canadá) y 10X búfer Taq a una concentración de 1X (Feldan, Quebec, Canadá). El protocolo de amplificación para los dos pares de cebadores fue 94 °C por 5 minutos, 35 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 59 °C por 30 segundos, 72 °C por 30 segundos y por último 72 °C por 5 minutos. Los productos de PCR se corrieron en un gel de agarosa al 2% (p/v) para comprobar el tamaño de los amplicones esperados que es de 92 y 90 pb para *Lb. bulgaricus* y *Str. thermophilus*, respectivamente.

Con el propósito de conocer los parámetros cinéticos de los microorganismos presentes en el inóculo se realizó una curva de crecimiento. Se sembró una colonia tomada de placa Petri en un matraz Erlenmeyer con 125 ml de caldo MRS ó LAPTg para *Lb. bulgaricus* y *Str. thermophilus* respectivamente, se incubó sin agitación a 42 °C durante 72 h. Transcurrido el tiempo de incubación se inoculó 3 ml (10 % v/v) de estos cultivos en 30 ml de medio líquido contenido en otro matraz Erlenmeyer que posee un tubo de ensaye adherido que permite medir la absorbancia sin necesidad de realizar muestreos. La absorbancia se midió a 660 nm en un espectofotómetro GENESYS 10<sub>UV</sub> (Thermo Electron Corporation, Madison, USA), hasta que los microorganismos alcanzaron la fase estacionaria. Para la determinación de velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) se empleó la fórmula  $\mu = (\log_{10} \text{D.O. final} - \log_{10} \text{D.O. inicial} / t \text{ final} - t \text{ inicial}) * 2.303$  (Lomas, 2005), donde  $\log_{10}$  es logaritmo base 10, D.O. es densidad óptica y t es tiempo en horas. Mediante el conocimiento de la velocidad específica de crecimiento se determina el tiempo de duplicación ( $t_d$ ) de los microorganismos; la fórmula para determinarlo es  $t_d = \ln 2 / \mu$ , donde  $\mu$  es velocidad específica de crecimiento y  $\ln$  es logaritmo natural.

Con el objetivo de tener cepas puras de referencia de *Lb. bulgaricus* y *Str. thermophilus*, se realizó la preservación mediante congelamiento a -180 ° C de los microorganismos. Durante todo el procedimiento se utilizó caldo MRS para *Lb. bulgaricus* y caldo LAPTg para *Str. thermophilus*. Se tomó 20 ml de cultivo de las BAL que estuviesen en fase exponencial, lo cual es 8 y 5 h para *Lb. bulgaricus* y *Str. thermophilus* respectivamente, se centrifugó a 5,000 revoluciones por minuto (rpm) durante 10 minutos hasta formar un pellet en una centrífuga ALLEGRA X-12 (BECKMAN COULTER, Fullerton, USA). Re-suspender el pellet en el mismo volumen de mezcla de caldo + 15% (v/v) de glicerol ( $\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$ ) PM:  $92.10 \text{ g mol}^{-1}$  (Desarrollo de Especialidades Químicas, Monterrey, México). Mezclar con un vortex Rx<sup>3</sup> (VELP Scientifica, Milano, Italia). Tomar 1 ml de esta mezcla, colocarlo en un tubo de crio-preservación y congelar a -180 ° C en un Ultracongelador REVCO (Kendro Laboratory, Asheville, USA).

## II. FERMENTACIONES DE YOGUR

Con el objetivo de comparar el comportamiento de las bacterias ácido lácticas (BAL) contenidas en el inóculo YO814Q en diferentes escenarios, se elaboró yogur de leche de vaca por medio de dos tratamientos diferentes a los cuales se les llamará tratamiento 1 (Tx1) y tratamiento 2 (Tx2). En el tratamiento 1 (Tx1) se utilizó leche entera cruda concentrada por ultrafiltración al 20% (v/v); se probaron 3 tipos de fermentación, agitado aeróbico, agitado micro-aeróbico y no agitado aeróbico en reactores con volúmenes comprendidos entre 500 ml a 4 L. Las fermentaciones agitadas fueron a 150 y 200 rpm y la no agitada a 0 rpm. En el tratamiento 2 (Tx2) se utilizó leche entera comercial adicionada al 2% (p/v) con leche en polvo. Los tipos de fermentación estudiados fueron 4, agitado aeróbico, agitado no aeróbico, no agitado aeróbico y no agitado no aeróbico en tubos vacutainer con 5 ml de leche. Las fermentaciones agitadas se realizaron a 30 rpm y las no agitadas a 0 rpm. La temperatura de fermentación de los dos tratamientos fue 40 ° C.

### 1. Tratamiento 1 (Tx1)

Los pasos a seguir en el Tx1 se resumen en la siguiente figura (figura 6).

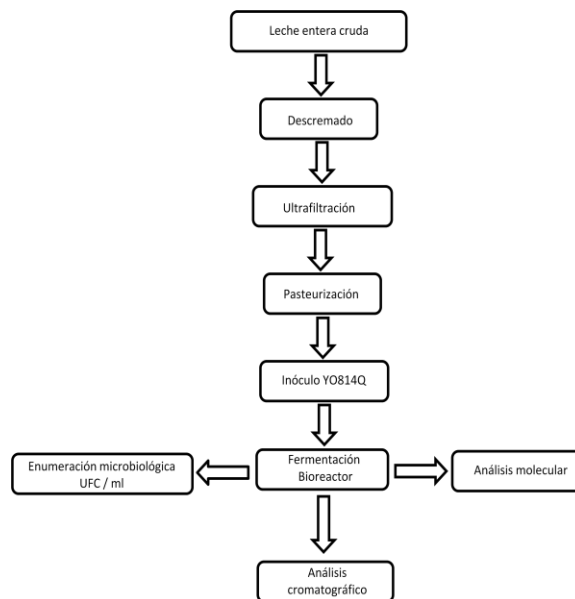


Figura 6. Proceso para la elaboración de yogur en el tratamiento 1.



La leche utilizada en este tratamiento es leche entera cruda de vaca comprada en la planta lechera La Perla (Monterrey, México), una vez obtenida la leche se trasladó a la Planta piloto de productos lácteos del ITESM (Monterrey, México) para su descremado. Antes de descremarse la leche, se filtró con un colador de cocina y posteriormente por un cedazo de fibra pequeña para eliminar así las impurezas que pudiera contener (pelos de vaca, piedrecillas, etc.). El descremado se llevó a cabo en una descremadora ELECREM 315 C (Fresnes, Francia). Esta descremadora trabaja a base de discos y centrifugación. Los discos retienen los sólidos (grasa), y por otro lado sale la leche descremada. La leche cruda descremada, se ultrafiltró en un 80% (v/v), (el 80 % es retenido y el 20% sale en forma de suero; este suero se donó a un proyecto de investigación del Centro de Biotecnología FEMSA -ITESM) utilizando este proceso como método de estandarización del extracto magro seco. Se utilizó un equipo de ultrafiltración Flexstand Amersham (GE Healthcare, Piscataway, USA) con una columna de ultrafiltración de 0.2 micrones, 2800 cm<sup>2</sup> Amersham (GE Healthcare, Piscataway, USA), a 25 psi de presión. Después del proceso de ultrafiltración la leche se pasteurizó con fuego directo a 98° C durante 15 minutos. Inmediatamente después se llevó a refrigerar a 4° C para dar el golpe frío.

Las fermentaciones se realizaron en cultivo batch. Se agregó la leche pasteurizada al vaso del reactor, se temperó a 40 °C y posteriormente se agregó el inóculo YO814Q a razón de 0.1 g L<sup>-1</sup> (el inóculo se debe de reconstituir antes de realizar la fermentación del yogur en leche entera comercial temperada, incubarse a 42° C durante 1 h sin agitación). Desde el inicio de la fermentación se realizó monitoreo del pH del yogur hasta alcanzar una lectura alrededor de 4.5, en este momento se da por terminada la fermentación. Se realizaron muestreos de 10 ml de yogur cada hora, los cuales representan un tiempo de fermentación. Estas muestras fueron analizadas microbiológica, molecular y cromatográficamente.

Los tipos de fermentación que se analizaron fueron 3: agitado (200 rpm), agitado con nitrógeno (200 rpm) y no agitado (0 rpm) en reactores Bioflow III (New Brunswick,

Edison, USA) de 5 L, Applikon ez-Control (Applikon® Biotechnology, Schiedam, Netherlands) de 2 L y Multifors® (INFORS HT, Bottmingen, Suiza) de 500 ml, en estos la velocidad de agitación fue de 150 rpm.

#### a. Enumeración microbiológica

Con el objeto de conocer el comportamiento con respecto a la cantidad de BAL presentes en cada etapa de los diferentes tipos de yogur, se realizó un análisis de cuantificación en placa. A cada muestra de yogur se le realizó una dilución en agua peptonada según la norma oficial mexicana para la preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico (NOM-110-SSA1-1994, 1995). Las diluciones  $10^{-4}$  al  $10^{-8}$  se sembraron por vaciado en placa Petri con agar LAPTg. Se realizó tres repeticiones de cada placa correspondientes a cada dilución. Las placas se incubaron a 42 °C durante 72 horas sin agitación. Pasado el tiempo de incubación se realizó la cuantificación de las células y se reportó el resultado en UFC  $\text{ml}^{-1}$  según la norma oficial mexicana para la cuenta de bacterias en placa (NOM-092-SSA1-1994, 1995). El resultado de la cuantificación se reporta como logaritmo natural (Ln) de unidades formadoras de colonia por mililitro (UFC  $\text{ml}^{-1}$ ) para facilitar el análisis numérico.

#### b. Análisis cromatográfico

Para conocer las concentraciones de lactosa, glucosa, galactosa y ácido láctico presentes en las muestras de yogur, se realiza un proceso de extracción, el cual consiste en agregar acetonitrilo en relación 1:1, centrifugar a 4,000 rpm durante cinco minutos; a continuación tomar la fase superior (alrededor de 1 ml) y refrigerar a 4 °C hasta el momento de realizar el análisis (Guardiola et al., 2007, Mathies & Austin, 1980 y Polson et al., 2003). El análisis por cromatografía líquida de alto desempeño (HPLC por sus siglas en inglés) fue realizado por la Dra. Alicia Ramírez (Laboratorio de Biotecnología del ITESM) en un cromatógrafo de líquidos W1515 (Waters Corporation, Milford, USA) con una columna AMINEX 87H (Bio-rad Laboratories Inc., Hercules, USA).

Las condiciones de corrida son, fase móvil de ácido sulfúrico 5 mM, flujo 0.6 ml minuto<sup>-1</sup>, temperatura del detector y la columna a 50 °C y el volumen de inyección de 20 µl.

c. Análisis molecular de subunidad ribosomal 16S región V4-V5.

Con el propósito de estudiar molecularmente a través de PCR a las bacterias ácido lácticas (BAL) presentes en las muestras de yogur y cultivos puros derivados del inóculo YO814Q, se realizó la extracción del ADN genómico siguiendo las instrucciones del producto comercial UltraClean™ Microbial DNA Isolation Kit (MO-BIO Laboratories, Inc., Carlsbad, USA).

Se midió la concentración al ADN genómico extraído de las BAL en un espectrofotómetro Nanodrop 1000 (Thermo Scientific. Milford, USA) y se utilizó como molde de ADN para el análisis de PCR preparativa de la fracción 16S ribosomal región V4-V5.

Los cebadores utilizados para el análisis filogénico (identificación de especie) de las dos BAL fueron Univ533f 5' GTGCC AGCAG CCGCG GTAA 3' y Univ907r 5' AATTC CTTTG AGTTT 3' (Henckel et al., 1999 y Yu & Morrison, 2004). Se agregó una cola de GC (5' cgccc gccgc gcccc gcgcc cggcc cgccg ccccc gcccc 3') al cebador Univ907r como lo describe Henckel y colaboradores (1999). Los PCR se realizaron en un termociclador tiempo final descrito con anterioridad, con un volumen final de reacción de 25 µl conteniendo a ambos cebadores a una concentración de 0.2 µM (Allele Biotechnology & Pharmaceuticals Inc., San Diego, USA), dNTPs mix a una concentración de 0.2 mM (Invitrogen, Alameda, USA), Taq ADN polimerasa a una concentración de 1.25 U (GoTaq Flexi, Promega, Madison, USA), 5X búfer Taq a una concentración de 1X (GoTaq Flexi, Promega, Madison, USA) y MgCl<sub>2</sub> a una concentración de 7.5 mM. El protocolo de amplificación para el par de cebadores fue 94 °C por 3 minutos, 40 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 58.4 °C por 30 segundos, 72 °C por 45 segundos y por último 72 °C por 5 minutos. Los productos de PCR preparativa se corrieron en un gel de agarosa al 0.7% (p/v) para comprobar el tamaño de los amplicones esperados que es de 452 pb.

Los productos de la PCR preparativa fueron separados mediante electroforesis de gel de gradiente desnaturante (DGGE) utilizando un equipo The DCode™ (Bio-Rad, Hercules, USA) (Henckel et al., 1999). Se preparó un gel 6.5% (p/v) de poliacrilamida (37.5:1 acrilamida-bisacrilamida) (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA) en TAE a una concentración de 1X, el gel está formado por un gradiente lineal desnaturante 40-80%. Se corrió la electroforesis a un voltaje constante de 200V a 60 °C durante 4 horas. El gel se cargó con aproximadamente  $1,500 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$  de producto de PCR +  $\frac{1}{2}$  (v/v) de búfer de carga. Una vez transcurrido el tiempo de corrida del gel, se procede a teñirlo con una solución de bromuro de etidio (ver especificaciones del The DCode™) para después analizarse y tomarle foto en un fotodocumentador (Universal Hood II, Bio-Rad Laboratories Inc, Hercules, USA).

## 2. Tratamiento 2 (Tx2)

Los pasos a seguir en el Tx2 se resumen en la siguiente figura (figura 7).

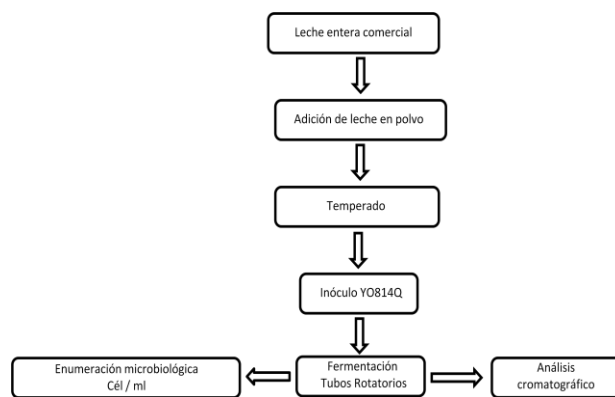


Figura 7. Proceso para la elaboración de yogur en el tratamiento 2.

En este tratamiento se utilizó leche entera comercial adicionada con un 2% (p/v) de leche en polvo marca Cal-C-Tose de Bristo-Myers (México D.F., México) como método de estandarización del extracto magro seco de la leche, para que sea apta para la elaboración de yogur. La leche se temperó a 42 °C y a continuación se agregó el inóculo en una dosis de  $0.1 \text{ g L}^{-1}$  (el proceso de preparación del inóculo es igual que en el Tx1). Otra diferencia de este tratamiento con el tratamiento 1, además del tipo de leche, es

que se utilizaron tubos vacutainer como mini-reactores batch. La leche con el inóculo es agregada a los tubos vacutainer respetando el tipo de fermentación que se llevará a cabo; los tipos de fermentación son 4 agitado aeróbico, agitado no aeróbico, no agitado aeróbico, y no agitado no aeróbico. El volumen de leche + inóculo agregado a los tubos es de 5 ml. Se hicieron 6 tubos por cada tipo de fermentación, ya que cada tubo representa una muestra de fermentación (1 h). Las fermentaciones agitadas se realizaron a 30 rpm y en las no agitadas 0 rpm. Para realizar la agitación se colocaron los tubos en un agitador ATR-RKVSD (Appropriate Technical Resources, Inc., Laurel, USA) dentro de la incubadora. La incubación se realizó a 40 °C.

#### a. Enumeración microbiológica

Con el objeto de conocer la modificación en la ecología microbiana del yogur en los diferentes tipos de fermentación, se realizó una cuenta directa en microscopio de las bacterias ácido láctica. A cada muestra de yogur se le realizó una dilución en agua peptonada según la norma oficial mexicana para la preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico (NOM-110-SSA1-1994, 1995). La cuantificación celular de las diluciones se realizó en una cámara de Neubauer (Hausser Scientific, Horsham, USA), en un microscopio campo claro con un objetivo de 100X. El conteo se realizó en la cuadrícula central (25 cuadros), en los cuadros (16 cuadros) dentro del cuadro de 25 de la cámara de Neubauer (Figura 8).

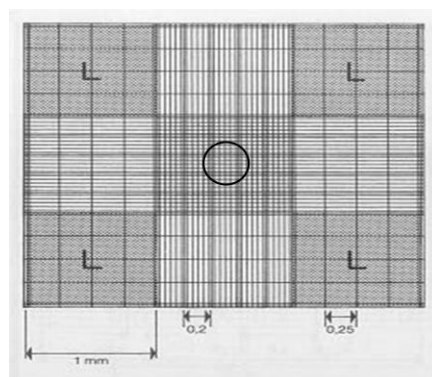


Figura 8. Cuadrícula central de cámara de Neubauer (Madigan et al., 2000).

La fórmula para utilizada para células  $\text{ml}^{-1}$  es  $\text{Cél/ml} = A \cdot C / B \cdot D$  donde, A: número de células (dentro del cuadrado de 16), B:  $0.05 \times 0.05 \times 0.1$  (alto x ancho x profundidad, el resultado queda en  $\text{mm}^3$ ), C: 1000 (conversión de  $\text{mm}^3$  a  $\text{cm}^3$ ), D: dilución. Las células totales por mililitro se multiplican por 0.89 (Moreno et al., 2000) lo cual representa el número de células viables por mililitro y es equivalente a  $\text{UFC ml}^{-1}$ . El resultado de la cuantificación se reporta como logaritmo natural (Ln) de células por mililitro (células  $\text{ml}^{-1}$ ) para facilitar el análisis numérico.

#### b. Análisis cromatográfico

Para el análisis por medio de cromatografía líquida de lactosa, glucosa, galactosa y ácido láctico se realizó el mismo procedimiento de las muestras de yogur como en el Tx1. Se realizó un análisis enzimático de glucosa del yogur con tiras adaptables a un equipo marca Optium™ MediSense® (Abbott Laboratories, Alameda, USA) que está diseñado para medir glucosa en sangre. El resultado lo emite en  $\text{mg dl}^{-1}$  ( $1 \text{ mg dl}^{-1} = 0.01 \text{ mg ml}^{-1}$ ). El rango de detección de glucosa del equipo es de 20-500  $\text{mg dl}^{-1}$ . Para realizar la medición de las muestras de yogur en el tiempo se siguieron las instrucciones del fabricante del equipo.

### III. ANALISIS ESTADÍSTICO

Para la comprobación de las hipótesis de esta investigación, se usó un diseño estadístico de dos criterios de clasificación (siendo tratamientos y tipos de fermentaciones los factores de estudio), con interacción entre fermentaciones y tratamientos. Por lo tanto, se llevó a cabo un análisis de varianza entre tratamientos, dentro de cada fermentación y de cada tratamiento entre fermentaciones. El modelo estadístico (Becker, 1984 y Gutiérrez & Londoño, 2009) empleado en los análisis, se muestra a continuación  $Y_{ijk} = \mu + F_i + S_j + (FS)_{ij} + E_{ijk}$  donde,  $Y_{ijk}$  = valor de la variable estudiada, en las fermentaciones  $i$ , tratamiento  $j$ , repetición  $k$ ,  $\mu$  = media,  $F_i$  = fermentaciones,  $S_j$  = tratamientos y  $E_{ij}$  = error experimental. Este análisis estadístico se

realizó con el programa Statistix 7® for Windows Analytical Software, Versión 7.0 (Analytical Software, Tallahassee, USA).

## CAPÍTULO 3

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### A. AISLAMIENTO DE CEPAS BACTERIANAS

##### 1. Identificación de colonias

En el laboratorio del Centro de Biotecnología – FEMSA del ITESM, se caracterizó el inóculo YO814Q en placas Petri con agar LAPTg después de 72 h de incubación a 42 °C. Conforme a la descripción mencionada en la metodología, la cual consiste en seleccionar las colonias según su forma, *Str. thermophilus* se caracterizó por formar colonias circulares y con bordes uniformes y *Lb. bulgaricus* forma colonias de aspecto rugoso con bordes irregulares (figura 9). Las dos colonias son de color café claro, el tamaño de las colonias de *Lb. bulgaricus* es aproximadamente de 15 veces mayor al de *Str. thermophilus*, estas diferencias morfológicas facilitaron los conteos microbianos de estas dos especies en los experimentos realizados en este estudio.

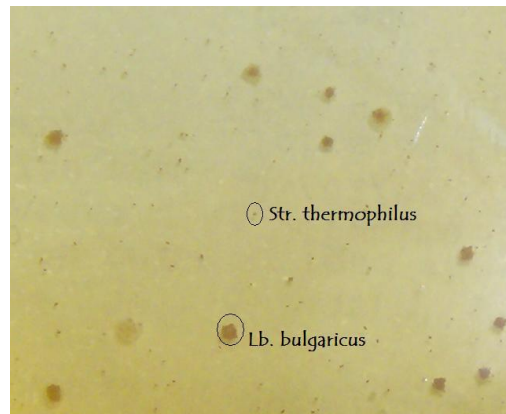


Figura 9. Placa Petri de agar LAPTg con inóculo YO814Q sembrado a una dilución  $10^{-8}$  durante 72 h a 42°C.

##### 2. Identificación molecular del gen 16S ADNr

La región del 16S ADNr utilizada para identificar a los microorganismos fue para *Lb. bulgaricus* género específica y para *Str. thermophilus* especie específica y no amplifican otro microorganismo. Luego de obtener los productos de PCR de colonias



seleccionadas de cada microorganismos, se corrió un gel de agarosa al 2% (p/v) para comprobar la amplificación de los mismos. Se obtuvieron bandas del tamaño de los amplicones esperados (Figura 10). Los productos esperados son de 92 y 90 pb para *Lb. bulgaricus* y *Str. thermophilus*, respectivamente.

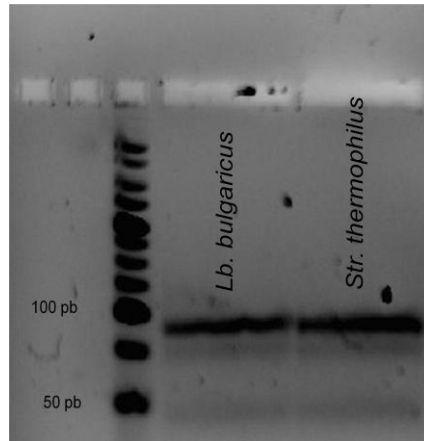


Figura 10. Gel de agarosa con productos del gen 16S ribosomal amplificados por PCR; para identificación de género de *Lb. bulgaricus* y de especie de *Str. thermophilus*. Primer carril a la izquierda muestra un marcador de 1 kb.

### 3. Determinación de parámetros cinéticos

Antes de iniciar los experimentos de fermentación del yogur, se caracterizó el crecimiento de ambos microorganismos mediante curvas de crecimiento y determinación de parámetros cinéticos, en condiciones óptimas de cultivo. En el caso de *Lb. bulgaricus* las condiciones óptimas de cultivo son medio líquido MRS sin agitación a 42 °C y para *Str. thermophilus* son en medio líquido LAPTg sin agitación a 42° C. Cada hora desde el tiempo cero de inoculación del medio se fue midiendo su densidad óptica a 660 nm (figura 11). Al analizar las curvas de crecimiento de las bacterias ácido lácticas (BAL) se determinó la velocidad específica de crecimiento y tiempo de duplicación, la tasa de crecimiento de *Lb. bulgaricus* es de 0.1891 h<sup>-1</sup> con un tiempo de duplicación de 3.7 h y la tasa de *Str. thermophilus* es de 0.3781 h<sup>-1</sup> con un tiempo de duplicación de 1.8 h. Por lo tanto, *Str. thermophilus* crece aproximadamente al doble del tiempo que *Lb. bulgaricus* bajo estas condiciones de cultivo.

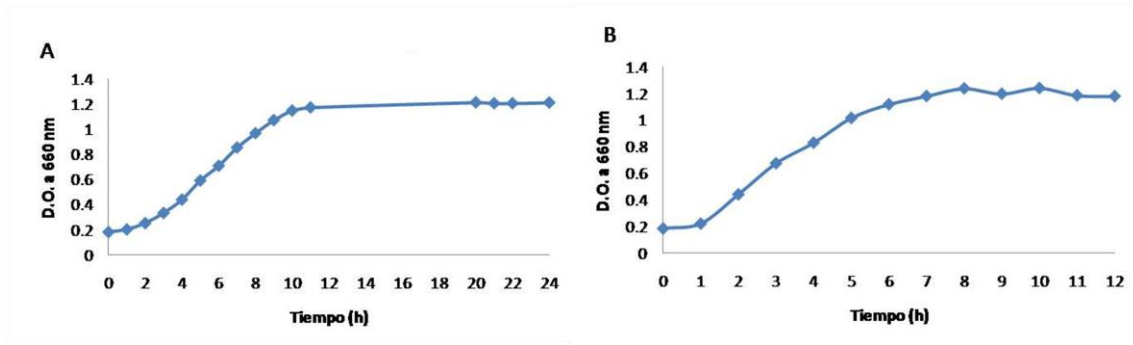


Figura 11. Curvas de crecimiento de *Lb. bulgaricus* (A) y *Str. thermophilus* (B) cultivadas a 42° C, no agitación y en medio MRS y LAPTg, respectivamente.

#### 4. Descripción celular

Al realizar la cuantificación de células por mililitro en la cámara de Neubauer, se pudo examinar a detalle la forma celular característica de ambas poblaciones de microorganismos. Las células de *Lb. bulgaricus* mostraron una morfología bacilar, mientras que las células de *Str. thermophilus* son cocos.

La morfología celular de ambos microorganismos no varió entre tratamientos (fermentaciones agitadas y no agitadas) pero si durante el tiempo de fermentación.

El inóculo del yogur estaba conformado por diplococos y cocos sencillos y en cadenas de tres a cuatro (*Str. thermophilus*) y los bacilos eran grandes y largos (*Lb. bulgaricus*). Luego de una hora de fermentación (tiempo 1) se observaron cadenas de cocos formadas por 6, 8 y hasta 10 células agrupadas. Sin embargo, los bacilos no mostraron cambios durante la primera hora de fermentación siendo iguales que en el inóculo. En el tiempo 2 y 3 (2 y 3 horas de fermentación) se observaron cocos en cadena conformadas de 3 a 4 células y los bacilos son de tamaño mediano. De las 4 a 6 horas de fermentación se observaron cocos en cadenas cortas de 1, 2 y 3 células agrupadas, predominando los cocos sencillos y diplococos y se observan bacilos grandes, medianos y pequeños.

Así mismo, se observan glóbulos de grasa y conglomerados de caseína. Los glóbulos de grasa se observan como gotas iridiscentes del tamaño aproximado a 2 cocos, los

conglomerados de caseína aparentan bloques blanquecinos que envuelven a los microorganismos, los cuales al ir transcurriendo los tiempos de fermentación van creciendo en tamaño y aumentando en cantidad, esto dificulta la observación y cuantificación de ambas bacterias ácido lácticas, en especial *Str. thermophilus*.

## B. FERMENTACIONES DE YOGUR

En esta investigación se realizaron dos tratamientos de fermentaciones de yogur Tx1 y Tx2. En el tratamiento Tx1 las fermentaciones fueron realizadas en bioreactores con los siguientes tipos de fermentación: agitada aeróbica (4 L, 200 rpm y 500 ml, 150 rpm), agitación no aeróbica (2 L, 200 rpm y 500 ml, 150 rpm), no agitado aeróbica (500 ml, 0 rpm).

En el tratamiento Tx2 las fermentaciones fueron realizadas en tubos rotatorios con leche entera comercial adicionada con leche en polvo y con los tipos de fermentación agitada aeróbica, agitada no aeróbica, no agitada aeróbica y no agitada no aeróbica. En este tratamiento el volumen de fermentación es de 5 ml, con condiciones de agitación de 30 rpm y las no agitadas a 0 rpm. En la tabla 10 se hizo una comparación de las medias de las velocidades específica de crecimiento de los microorganismos de los dos tratamientos y diferentes tipos de fermentaciones.

Tabla 10. Velocidad específica de crecimiento de *Lb. bulgaricus* y *Str. thermophilus* durante las fermentaciones en bioreactor (Tx1) y tubos rotatorios (Tx2).

Tratamiento	BAL	Agitado(h <sup>-1</sup> )	D.E.	AgM-A(h <sup>-1</sup> )	D.E.	NoAgitado(h <sup>-1</sup> )	D.E.	NoAgM-A(h <sup>-1</sup> )	D.E.
Tx1 (bioreactores)	<i>Str.</i>	1.86	0.47	1.84	0.24	0.82	0.53	*	*
	<i>Lb.</i>	2.71	1.58	2.47	1.04	0.59	0.65	*	*
Tratamiento	BAL	Agitado(h <sup>-1</sup> )	D.E.	AgVacio(h <sup>-1</sup> )	D.E.	NoAgitado(h <sup>-1</sup> )	D.E.	NoAgVacio(h <sup>-1</sup> )	D.E.
Tx2 (tubos rotatorios)	<i>Str.</i>	0.18	0.20	0.20	0.02	0.15	0.13	0.15	0.07
	<i>Lb.</i>	0.31	0.10	0.18	0.09	0.29	0.03	0.23	0.01

n: 3, BAL: bacterias ácido lácticas, *Str.*: *Str. thermophilus*, *Lb.*: *Lb. bulgaricus*, D.E.: desviación estándar, \*: dato no determinado.

## 1. Tratamiento 1 (Tx1)

Debido a que los volúmenes de los reactores utilizados en el Tx1 al igual que la velocidad de agitación son diferentes en las diferentes réplicas de las fermentaciones agitadas (agitada aeróbica (4 L, 200 rpm y 500 ml, 150 rpm) y agitación micro-aeróbica (2 L-200 rpm y 500 ml-150 rpm), las poblaciones de *Lb. bulgaricus* y *Str. thermophilus* son completamente diferentes en cuanto la abundancia de microorganismos. En el caso de la Ag2 Bioflow III (Figura 12A), (bioreactor de 4L a 200 rpm), el tiempo de fermentación se alargó a 10 h (según la caída en el pH del medio). Esta fermentación se realizó con un inóculo YO814Q tenía tiempo de estar abierto, este se encontraba guardado a -20 ° C en un tubo de centrifuga sin protección al efecto de la luz, lo más probable es que el inóculo poseía muchas BAL muertas y por eso la fase de latencia observada se alargó y el medio tardó en llegar al pH óptimo (pH de 6.3 para *Str. thermophilus* y 5.2 para *Lb. bulgaricus*) al cual se desarrollan adecuadamente estos microorganismos. El mejor tipo de fermentación para las dos bacterias ácido lácticas con descenso uniforme de pH y crecimiento uniforme de microorganismos fue la fermentación agitada con nitrógeno (fermentación agitada micro-aeróbica), sin importar el volumen y velocidad de fermentación. (Tabla 10, Figuras 12 y 13). Ambas fermentaciones presentaron tasas específicas de crecimiento similares (1.86 y 2.71 h<sup>-1</sup> versus 1.84 y 2.47 h<sup>-1</sup> para *Str.* y *Lb.* en condiciones agitadas aerobias y micro-aeróbicas, respectivamente) pero con un menor tiempo de fermentación en las condiciones agitado con nitrógeno (micro-aeróbico).

En las fermentaciones agitadas con nitrógeno (agitado micro-aeróbico) se logró reducir en una hora el proceso de elaboración del yogur el cual duró 5 horas, mientras que el yogur agitado duró aproximadamente 6-7 h (Goff, 2008 y Vandeweghe et al., 2002). Este resultado es de importancia ya que es necesario acelerar el proceso de fermentación para incrementar la producción de yogur a nivel industrial y bajar los costos de manufacturación en el proceso de elaboración de yogur (Vandeweghe et al., 2002).

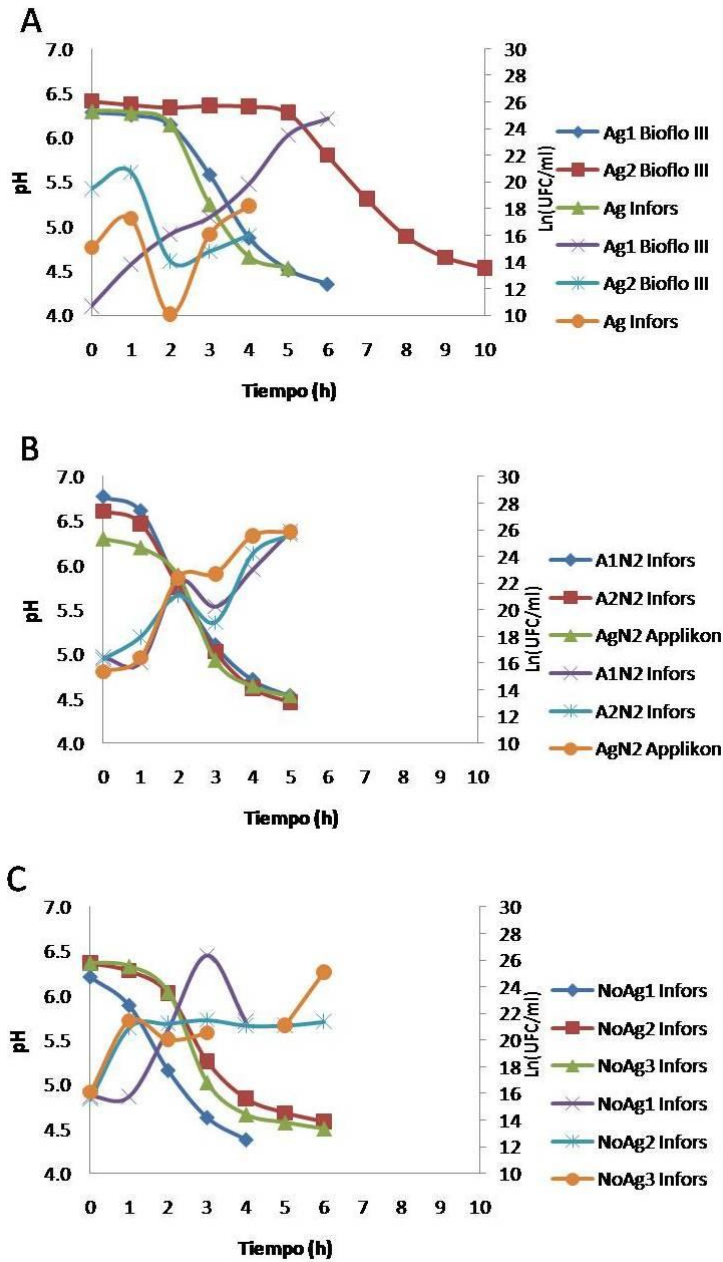


Figura 12. Relación de pH y número de células de *Lb. bulgaricus* durante los diferentes tipos de fermentación de yogur A: fermentación agitada aeróbica, reactor BiofloIII (4 L, 200 rpm), reactor Infors (500 ml, 150 rpm); B: fermentación agitada micro-aeróbica, reactor Applikon (2 L, 150 rpm), rector Infors (500 ml, 150 rpm) y C: fermentación no agitada (500 ml, 0 rpm), del Tx1: leche entera descremada y al concentrada al 20% (v/v) por ultrafiltración. Todas las fermentaciones se realizaron a 40 ° C.

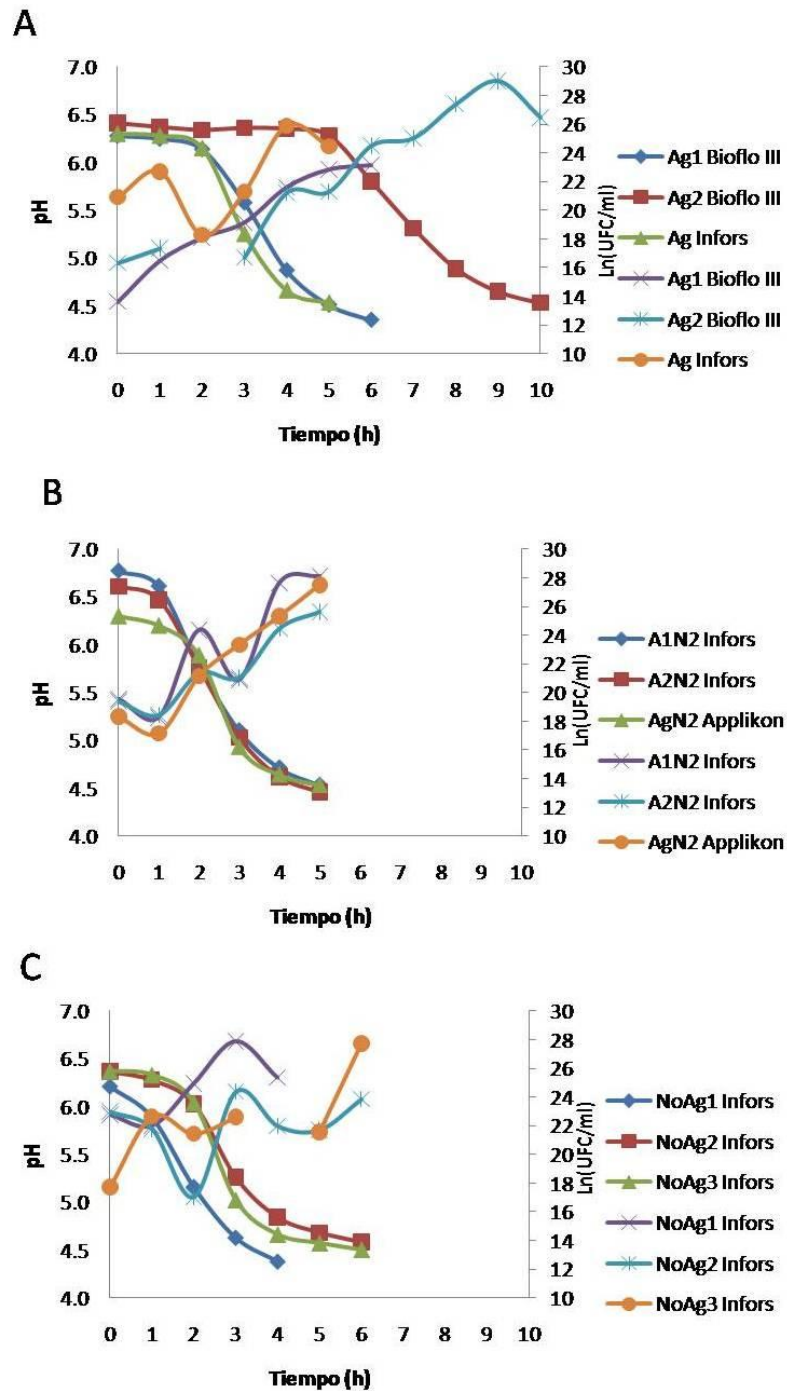


Figura 13. Relación de pH y número de células de *Str. thermophilus* durante los diferentes tipos de fermentación de yogur A: fermentación agitada aeróbica, reactor BiofloIII (4 L, 200 rpm), reactor Infors (500 ml, 150 rpm); B: fermentación agitada micro-aeróbica, reactor Applikon (2 L, 150 rpm), rector Infors (500 ml, 150 rpm) y C: fermentación no agitada (500 ml, 0 rpm), del Tx1: leche entera descremada y concentrada al 20% (v/v) por ultrafiltración. Todas las fermentaciones se realizaron a 40 ° C.

## 2. Tratamiento 2 (Tx2)

En los tubos vacutainer rotatorios con leche entera comercial adicionada con leche en polvo, la mayor producción de biomasa de *Lb. bulgaricus* ( $2.5 \times 10^6$  células  $\text{ml}^{-1}$  y  $2 \times 10^6$  células  $\text{ml}^{-1}$ ) de estas bacterias ácido lácticas se logra en las fermentaciones NoAgVacio (no agitado no aeróbico) y AgVacio (agitado no aeróbico) (Figura 14). Sin embargo la mayor velocidad específica de crecimiento se observó en la fermentación agitada, el valor obtenido fue de  $0.31 \text{ h}^{-1}$  (Tabla 10). En general las tasas de crecimiento en los tubos rotatorios son menores que los bioreactores (rango de valores de  $2.47$ - $2.71 \text{ h}^{-1}$  y  $0.18$ - $0.31 \text{ h}^{-1}$  en los bioreactores y tubos rotatorios, respectivamente). Seguramente, el espacio de crecimiento el cual es rotatorio con alto impacto, no permitió que hubiese una mejor distribución y disponibilidad al sustrato para los microorganismos.

El efecto del oxígeno disuelto es el factor que muestra mayor interferencia en el crecimiento de *Lb. bulgaricus*, no así la agitación tal y como Beshkova y colaboradores (2002) lo afirman. Esto se puede comprobar al comparar la concentración final de biomasa en las fermentaciones agitadas y no agitadas ( $1.5 \times 10^6$  células  $\text{ml}^{-1}$  versus  $2.5 \times 10^6$  células  $\text{ml}^{-1}$ , respectivamente) (Figuras 14).

El crecimiento de *Str. thermophilus* se ve afectado por la agitación no tanto por la concentración de oxígeno disuelto durante la fermentación (Figura 15). Hay mayor población en las fermentaciones NoAgVacio y NoAgitado. Aunque en general su desarrollo en todos los tratamientos y etapas es muy similar (Figura 15). No se observan períodos de inactividad, tomando en cuenta que no se observan brincos en la gráfica sino un crecimiento estable y continuo. Se observa la mayor velocidad específica de crecimiento de  $0.20 \text{ h}^{-1}$  en la fermentación agitada al vacío (Tabla 10).

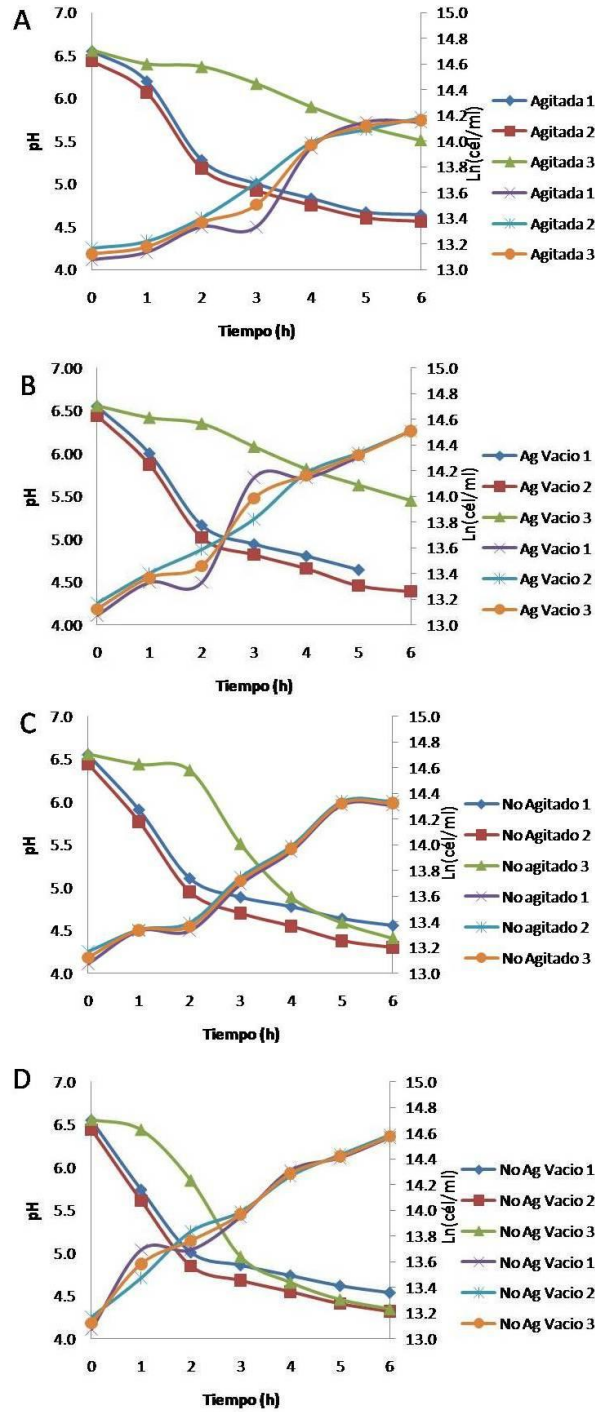


Figura 14. Relación de pH y número de células de *Lb. bulgaricus* durante los diferentes tipos de fermentación de yogur A: repeticiones de la fermentación agitada aeróbica (5 ml, 30 rpm); B: repeticiones de la fermentación agitada no aeróbica (5 ml, 30 rpm); C: repeticiones de la fermentación no agitada aeróbica (5 ml, 0 rpm) y D: repeticiones de la fermentación no agitada no aeróbica (5 ml, 0 rpm). El medio de cultivo es leche entera comercial, concentrada por adición de 2% (p/v) de leche en polvo. Todas las fermentaciones se realizaron a 40 ° C.



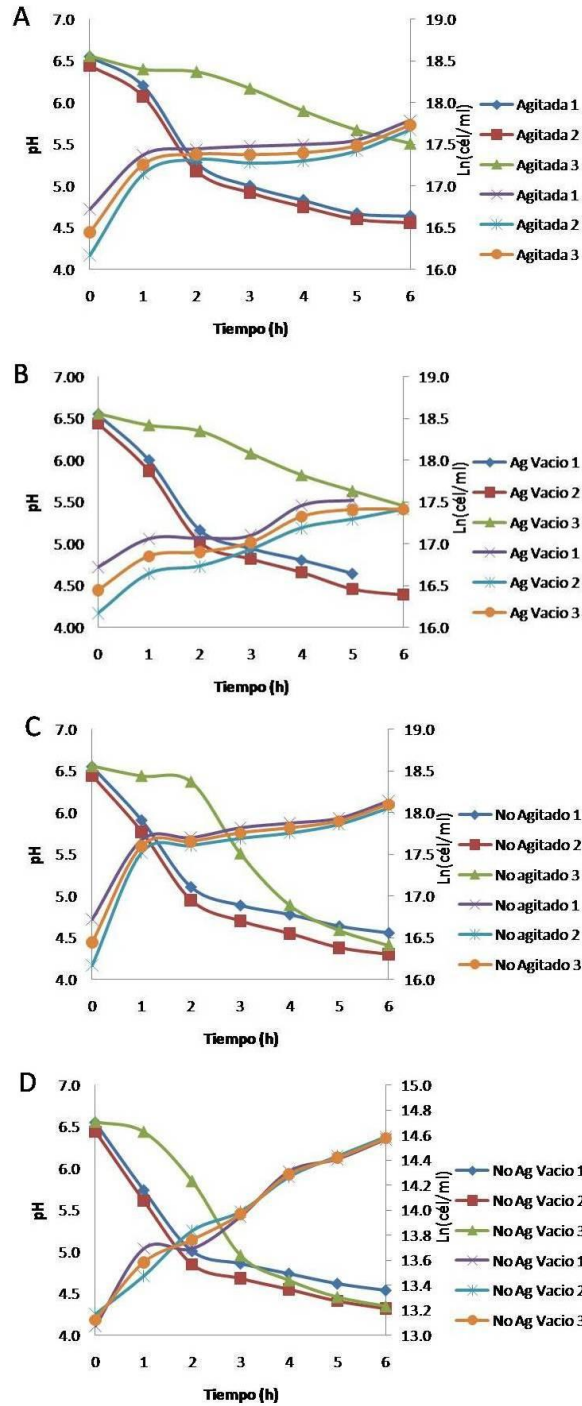


Figura 15. Relación de pH y número de células de *Str. thermophilus* durante los diferentes tipos de fermentación de yogur A: repeticiones de la fermentación agitada aeróbica (5 ml, 30 rpm); B: repeticiones de la fermentación agitada no aeróbica (5 ml, 30 rpm); C: repeticiones de la fermentación no agitada aeróbica (5 ml, 0 rpm) y D: repeticiones de la fermentación no agitada no aeróbica (5 ml, 0 rpm). El medio de cultivo es leche entera comercial, concentrada por adición de 2% (p/v) de leche en polvo. Todas las fermentaciones se realizaron a 40 ° C.

La relación de la concentración celular entre *Str. thermophilus* y *Lb. bulgaricus* se mantuvo generalmente igual en los cuatro tratamientos. Con una relación poblacional de 1.3:1 *Str. thermophilus* por *Lb. bulgaricus* presente. Lo cual es muy normal en la elaboración de yogur, ya que desde el inóculo se utiliza una relación de 1:1 entre las dos bacterias ácido lácticas.

#### a. Análisis cromatográfico por HPLC

Se realizó la metodología de extracción sugerida por Ramírez (comunicación personal) la cual consiste en agregar un volumen igual de acetonitrilo y de muestra de yogur (1:1) seguido de una centrifugación a 4,000 rpm durante 5 minutos. A continuación se recupera únicamente la fracción superior y se coloca en un tubo eppendorf para ser refrigerada 4 ° C hasta el momento del análisis en un cromatógrafo de líquidos W1515, con una columna AMINEX 87H Bio-rad.

Se realizó la extracción a las muestras de yogur tanto del Tx1 como del Tx2 sin tener resultados adecuados en lo que se refiere a concentraciones correctas. Seguramente el detector de este tipo de cromatógrafo de líquidos no es apto para medir concentraciones pequeñas de metabolitos como los que se produjeron en el yogur. Para incrementar la concentración de los metabolitos en las muestras extraídas se realizó una concentración por evaporación. Se corrió esa muestra concentrada pero tampoco resultó el procedimiento.

En la última repetición de la fermentación del tratamiento 2 (Tx2), se midió la concentración de glucosa del yogur con un equipo marca Optium™ que se utiliza para medir concentración de glucosa en sangre, con los resultados de este análisis enzimático se realizó una curva de calibración para utilizarse en el cromatógrafo de líquidos. Las muestras analizadas son los tiempos que comprenden del tiempo 0 horas (momento de inoculación) al tiempo 6 de las fermentaciones en tubos vacutainer rotatorios: agitada aeróbica, agitada no aeróbica, no agitada aeróbica y no agitada no aeróbica. (Figura 16).

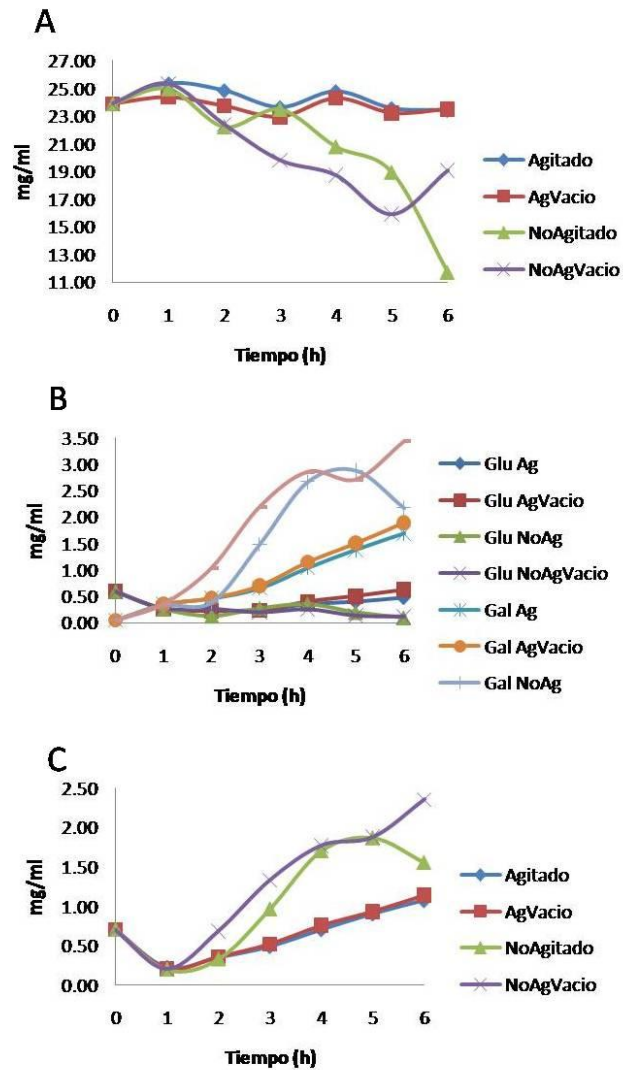


Figura 16. Lactosa (A), glucosa y galactosa (B) y ácido láctico (C) de la fermentación en tubos rotatorios.

Las fermentaciones son agitada aeróbica, agitada no aeróbica, no agitada aeróbica y no agitada no aeróbica. Las condiciones para de velocidad de rotación son 30 rpm y 0 rpm para las fermentaciones agitadas y no agitadas respectivamente. El volumen de fermentación es 5 ml y la temperatura es 40 ° C para todas las fermentaciones.

Según la figura 16 se observó un mayor consumo de lactosa en las fermentaciones no agitadas. La concentración final de lactosa en estas fermentaciones es alrededor de los 12 mg ml<sup>-1</sup> (es un dato aproximado ya que los datos son mayores a la curva de calibración); la concentración de lactosa en la leche al inicio de la fermentación fue de

25.46 mg ml<sup>-1</sup>, hubo un consumo aproximado de 13.5 mg ml<sup>-1</sup> durante el tiempo que duró la fermentación.

El consumo de lactosa y producción de glucosa corresponden al incremento de galactosa en las fermentaciones no agitadas, tomando en cuenta que ambas BAL en estudio solo consumen la fracción glucosa de la lactosa (Leveau & Bouix, 2000).

La producción de ácido láctico se vió afectada en las fermentaciones agitadas debido a la formación de un ambiente micro-aeróbico lo cual rezaga los tiempos de fermentación, hubo una menor producción con respecto a lo producido por las fermentaciones no agitadas. Estos resultados son comparables a los valores de pH de esas fermentaciones (Figura 15 C). Finalmente, se observó una concentración de ácido láctico alrededor de 1.105 mg ml<sup>-1</sup> (media de las fermentaciones agitada y agitada con nitrógeno) al final de la fermentación. La concentración correspondiente al tiempo final para las fermentaciones no agitadas es de 1.95 mg ml<sup>-1</sup> de ácido láctico.

#### b. PCR-DGGE

Se realizó un PCR de la región V4-V5 del gen 16S ADNr de la extracción de ADN de cultivos líquidos de *Lb. bulgaricus* y *Str. thermophilus* (controles positivos), y de muestras de la fermentación Agitada con Nitrógeno en los tiempos 1, 3 y 5 de fermentación correspondientes al Tx1 (bioreactores). Los productos amplificados obtenidos mostraron el tamaño adecuado (452 pb) al realizar una electroforesis de gel de agarosa al 0.7% (p/v) (Figura 17). Todas las reacciones, a excepción del ADN de *Lb. bulgaricus* amplificaron dos bandas, una fuerte ubicada entre las 400 y 500 pb (producto deseado) y una suave alrededor de las 850 pb. En el caso del ADN de *Lb. bulgaricus* se amplificaron tres productos, la banda fuerte entre las 400 y 500 pb (producto deseado), otra de menor intensidad a los 500 pb y una muy suave (igual que las demás reacciones).

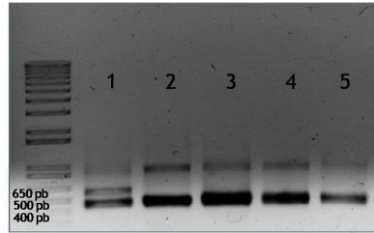


Figura 17. Gel de agarosa al 0.7% de los productos de PCR del gen 16S ADNr región V4-V5 (1: *Lb.*, 2: *Str.*, 3: T1 Ag nitrógeno, 4: T3 Ag nitrógeno y 5: T5 Ag nitrógeno). En el primer carril de lado izquierdo se muestra un marcador de 1 Kb.

Las muestras anteriores de PCR se colocaron en un gel DGGE (6.5% acrilamida:bis) con un gradiente desnaturizante de 40 -80% (Figura 18).

Además, se cargaron reacciones de PCR de *Lb.* y *Str.* de ADN de colonia, del inóculo de yogur, y de los tiempos 1, 3 y 5 de la fermentación agitados con nitrógeno.

En los carriles de los extremos se colocó el marcador de 1 Kb, para verificar si había desplazamiento de bandas.

Las muestras correspondientes a *Lb.* (carriles 1 y 4) se ve la banda superior fuerte y en las correspondientes a *Str.* (carriles 2 y 5) la banda inferior fuerte. Se colocaron controles positivos en los carriles 1 y 3 para *Lb.* y 2 y 4 para *Str.* Las bandas cambian de intensidad dependiendo de la abundancia de cada BAL, esto se puede observar al comparar los carriles 3, 7, 8 y 10, los cuales corresponden a: inóculo, tiempo 1, tiempo 3 y tiempo 5, respectivamente. En el carril 3, se observa la banda inferior correspondiente a *Str.* más fuerte, lo cual indica que hay una mayor concentración de esta BAL en el inóculo. En el carril 7 el la intensidad de las bandas es igual que en el carril 3, lo cual muestra que la población de las BAL no ha sufrido mucho cambio en lo correspondiente a aumento de biomasa, en el carril 8 y 10 la banda superior correspondiente a *Lb.* casi no se aprecia en comparación a la banda inferior correspondiente a *Str.*, se puede inferir que la población de *Str.* es mayor que la de *Lb.* en estos dos carriles correspondientes a los tiempos 3 y 5 de esta fermentación.

Se observó una mejor definición de las bandas cuando se realizó el PCR de las BAL a partir del ADN de colonia que cuando se hace extracción del ADN genómico, las bandas de extracción de ADN son más difusas.

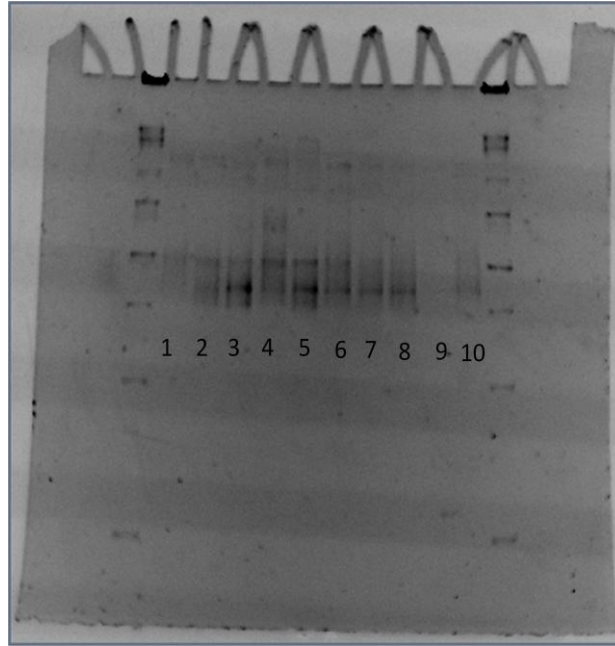


Figura 18. Gel de gradiente desnaturalizante de 40-80% de la región V4-V5 del 16S ADNr de *Lb. bulgaricus*, *Str. thermophilus* y muestras de yogur en reactor agitado micro-aeróbico (A1N2). (Carril 1: colonia de *Lb. bulgaricus*, carril 2: colonia de *Str. thermophilus*, carril 3: ADN de inóculo YO814Q, carril 4: ADN de *Lb. bulgaricus*, carril 5: ADN de *Str. thermophilus*, carril 6: ADN de A1N2 tiempo 1, carril 7: ADN de A1N2 tiempo 1 + 1.5 µl de DMSO, carril 8: ADN de A1N2 tiempo 3, carril 9: ADN de A1N2 tiempo 5 y carril 10: ADN de A1N2 tiempo 5 + 1.5 µl de DMSO. El primer carril de lado izquierdo y el último del lado derecho corresponden a un marcador molecular de 1 Kb. Las condiciones de corrida son: 200V, 4 h.

### C. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Tabla 11. Variación de la población “Ln(UFC/ml)” de *Str. thermophilus* en las fermentaciones de los tratamientos en la elaboración de yogur con inóculo YO814Q.

TRATAMIENTOS	<i>Str. thermophilus</i>						
	FERMENTACIONES						
	Ag	AgM-A ó V	NoAg	NoagV	Media	EE	Sig
Tx1	24.7	27.1	25.7		25.8	1.4	NS
Tx2	17.7	17.5	18.1	18.3	17.9	0.05	***
Media	21.2	22.3	21.9		21.8	0.6	***
EE	1.0	0.8	1.1		0.9		
Significancia	**	***	**		***		

n=3; EE = error estándar; Sig = significancia; \*(P<0.05); \*\*(P<0.01); \*\*\* (P<0.001); NS = No significativa

Tabla 12. Variación de la población “Ln(UFC/ml)” de *Lb. bulgaricus* en las fermentaciones de los tratamientos en la elaboración de yogur con inóculo YO814Q.

Tratamientos	<i>Lb. bulgaricus</i>						
	FERMENTACIONES						
	Ag	AgM-A ó V	NoAg	NoagV	Media	EE	Sig
Tx1	23.1	26.5	22.6		24.1	1.4	NS
Tx2	14.2	14.4	14.3	14.6	14.4	0.05	***
Media	18.6	20.5	18.5		19.2	3.2	NS
EE	1.0	0.7	1.2		0.8		
Significancia	***	***	**		***		

n=3; EE = error estándar; Sig = significancia; \*(P<0.05); \*\*(P<0.01); \*\*\* (P<0.001); NS = No significativa

Los resultados del ANOVA sobre la variación poblacional de *Str. thermophilus* y *Lb. bulgaricus* (Tablas 11 y 12), indican que dentro del Tx1 (Leche cruda “bioreactor”) si existe variación entre las poblaciones, o sea que no son iguales. En el Tx2 (Leche comercial “tubos rotatorios”) no existe una variación entre las poblaciones en los diferentes tratamientos. Existe interacción entre los tratamientos y el tipo de fermentación tanto para *Str. thermophilus* como para *Lb. bulgaricus*.

Lo anterior indica que se rechaza la hipótesis  $H_0$  (A), y se mantiene la  $H_0$  (B); aplica en los dos casos, tanto para *Str. thermophilus* como para *Lb. bulgaricus*.



## CAPÍTULO 4

### CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

El proceso de elaboración de yogur es una de las primeras y principales prácticas biotecnológicas en el mundo, y el consumo de este producto va en aumento debido a sus propiedades benéficas para la salud de la persona que lo consume, tanto por su acción probiótica como por el beneficio que brinda a las personas intolerantes de lactosa, ya que la concentración de lactosa en el yogur es 25% menor que en la leche y otros subproductos lácteos.

En el mercado existen varias presentaciones de este alimento fermentado, las más comunes son el yogur batido y el yogur para beber. Por lo tanto en esta investigación se realizaron pruebas tanto en yogur con agitación como en no agitado. Tomando en cuenta que lo principal es conocer su ecología microbiana, el cómo se va modificando la concentración de las dos BAL que conforman el yogur, estas bacterias son *Lb. bulgaricus* y *Str. thermophilus*. Como resultado de la investigación se comprobó que la pendiente del pH está relacionada principalmente a la concentración de *Str. thermophilus* durante todo el proceso de producción de yogur; a la vez *Str. thermophilus* al producir ácido láctico al inicio de la fermentación brinda de el pH óptimo para que *Lb. bulgaricus* pueda desarrollarse en una forma adecuada.

Se comprobó que la agitación no afecta las características probióticas del yogur ya que se obtuvo una población al final de la fermentación de  $6 \times 10^{11}$  y  $3 \times 10^{11}$  UFC ml<sup>-1</sup> de *Str. thermophilus* y *Lb. bulgaricus*, respectivamente en las fermentaciones agitadas microaeróbicas y  $6 \times 10^{10}$  y  $1 \times 10^{10}$  UFC ml<sup>-1</sup> de *Str. thermophilus* y *Lb. bulgaricus*, respectivamente en las fermentaciones agitadas aeróbicas correspondientes al tratamiento 1. En el tratamiento 2 no se obtuvieron poblaciones arriba de  $4.5 \times 10^7$  y  $2 \times 10^6$  UFC ml<sup>-1</sup> de *Str. thermophilus* y *Lb. bulgaricus*, respectivamente al final de las fermentaciones agitadas aunque se utilizó la misma dosis de inóculo al inicio de la fermentación, se supone que no se alcanzaron poblaciones  $\geq$  a  $1 \times 10^8$  UFC ml<sup>-1</sup> debido a que el volumen de la fermentación es muy pequeño (5 ml) y este inóculo es de uso

industrial (Altecsa, 2008). Es importante destacar que aunque la población final de *Str. thermophilus* es mayor en las fermentaciones no agitadas que en las agitadas en los dos tratamientos, las tasas de crecimiento son mayores en las fermentaciones agitadas 1.86 h<sup>-1</sup> y 0.82 h<sup>-1</sup> para fermentación agitada y no agitada aeróbicas del tratamiento 1, respectivamente. 0.20 h<sup>-1</sup> y 0.15 h<sup>-1</sup> para fermentaciones agitadas al vacío del tratamiento 2, respectivamente. Este comportamiento es debido a que los resultados de cuantificación de las BAL en UFC ml<sup>-1</sup> correspondiente a las fases exponenciales al ser linearizados presentan pendientes más perpendiculares, lo que corresponde a mayor concentración de BAL en menos tiempo de fermentación y por consiguientes tasas de crecimiento mayores.

Un dato importante encontrado en la investigación es que en volúmenes pequeños, la agitación afecta la producción de ácido láctico por la inclusión de aire (formar ambientes micro-aeróbicos) que retrasan la velocidad del proceso de fermentación. Se producen alrededor de 2 mg ml<sup>-1</sup> de ácido láctico más en fermentaciones no agitadas que en agitadas. Pero al llevarse la fermentación a una escala mayor, la fermentación agitada con nitrógeno, redujo una hora el tiempo total del proceso de elaboración de yogur.

Otro dato importante es que en el proceso de escoger la mejor opción de estandarización del extracto seco de la leche, para procesos de elaboración de yogur en escala industrial, la ultrafiltración es la opción idónea, ya que elimina la etapa de homogenización de la leche, además de que se reduce un gasto al no agregar leche o productos derivados de suero que es una práctica muy común en la elaboración de yogur industrial, el pH de la leche baja haciendo que sea más difícil la pasteurización ya que la leche tiende a coagularse.

La implementación de la técnica molecular PCR-DGGE en la elaboración de yogur puede ser utilizada como una prueba de rápido análisis de la eficiencia del cultivo estándar y la dinámica poblacional durante la fermentación, ayudando al ajuste y

estandarización del proceso de elaboración y tecnicándolo aun más, y así dando como resultado un producto final de mucha mayor calidad.

Es recomendable realizar nuevamente las fermentaciones del tratamiento 1 en bioreactores con volúmenes y agitaciones iguales para realmente comprobar que los resultados obtenidos en esta investigación son representativos.

También es recomendable escalar a un volumen mayor la fermentación agitada micro-aeróbica a nivel de planta piloto e implementada con un equipo de ultrafiltración para estandarizar el contenido de extracto magro seco de la leche y reducir el tiempo de elaboración de yogur agitado a nivel industrial.

Es importante seguir realizando investigaciones moleculares basadas en DGGE probando diferentes cebadores ribosomales universales para poder generar bandas de bacterias ácido lácticas más definidas.

Seguir realizando estudios de PCR cuantitativa con cebadores especie-específicos marcadas con sondas JOE u otro fluorocromo para realizar mediante la cuantificación de los amplicones producidos el monitoreo de la población del yogur en el tiempo de fermentación.

## BIBLIOGRAFÍA

**Adolfsson, O., Meydani, S.N. & Russell, R.M.** 2004 Yogurt and gut function. Rev. *The American Journal of Clinical Nutrition* **80**: 245-256.

**Aguirre-Ezkauriatza, E.J.** 2008 Producción de proteína liofilizada y biomasa de *Lactobacillus casei* BPG4 liofilizada a partir de suero de leche de cabra. Tesis de Maestría. Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey. Monterrey. México.

**Aguirre-Ezkauriatza, E.J., Galarza-González, G., Uribe-Bujanda, A.I., Ríos-Licea, M., López-Pacheco, F., Hernández-Brenes, C.M. & Alvarez, M.M.** 2008 Effect of Mixing During Fermentation in Yogurt Manufacturing. *J. Dairy Sci.* **91**: 4454–4465.

**Altecsa** 2008 Recomendaciones para la utilización del inóculo YO814Q. México D.F. México.

**Becker, W.A.** 1984 *Manual of quantitative genetics*. 4<sup>th</sup> ed. Academic Enterprises, Pullman, Washington. USA.

**Beshkova, D.M., Simova, E.D., Frengova, G.I., Simov, Zh.I. & Spasov, Z.N.** 2002 Effect of oxygen on batch yogurt cultures. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* **18**: 361–365.

**Bibiloni, R., Fedorak, R.N., Tannock, G.W., Madsen, K.L., Gionchetti, P., Campieri, M., De Simone, C. & Balfour-Sartor, R.** 2005 VSL#3 Probiotic – Mixture Induces Remission in Patients with Active Ulcerative Colitis. *American Journal of Gastroenterology* **100**: 1539-1546.

**Cocolin, L., Manzano, M., Cantoni, C. & Comi, G.** 2000 Development of a rapid method for the identification of *Lactobacillus* spp. isolated from naturally fermented Italian sausages using a polymerase chain reaction – temperature gradient gel electrophoresis. *Applied Microbiology* **30**: 126-129.

**Cogan, T. M.** 1996 History and Taxonomy of Starter Cultures, 1-19. *In* Cogan, T.M. & Accolas, J.P. (ed.), *Dairy Starter Cultures*. VCH Publishers, Inc. USA.

**Colín, M.A., Colín, O.J. & Mejía, R.** 2006 Supervivencia de *Streptococcus salivarius* spp *thermophilus* y *Lactobacillus delbreukii* spp *bulgaricus* durante el almacenamiento. *Alfa Editores Técnicos* **11**: 28-38.

**de Jong, P.** 2008 Thermal Processing of Milk, 1-34. *In* Britz, R.J. & Robinson, R.K. (ed.), *Advanced Dairy Science and Technology*. Blackwell Publishing. UK.

**de Vin, F., Radström, P., Herman, L. & De Vuyst, L.** 2005 Molecular and Biochemical Analysis of the Galactose Phenotype of Dairy *Streptococcus thermophilus* Strains Reveals Four Different Fermentation Profiles. *Applied and Environmental Microbiology* **71**: 3659-3667.

**Delidow, B.C., Lynch, J.P., Peluso, J.J. & White, B.A.** 1993 Polymerase Chain Reaction, 1-29. *In* White, B.A. (ed.), *PCR PROTOCOLS Current Methods and Applications*. Humana Press. USA.

**Díaz, G. & Wacher, C.** 2003 Métodos para el estudio de comunidades microbianas en alimentos fermentados. *Revista Latinoamericana de Microbiología* **45**: 30-40.

**Dieffenbach, C.W., Lowe, T.M. & Dveksler, G.S.** 1993 General concepts for PCR primer design. *Genome Research* **3**: 30-37.

**El-Baradei, G., Delacroix-Buchet, A. & Ogier, J-C.** 2006 Biodiversity of Bacterial Ecosystems in Traditional Egyptian Domiati Cheese. *Applied and Environmental Microbiology* **73**: 1248-1255.

**Elli, M., Callegari, M.L., Ferrari, S., Bessi, E., Cattivelli, D., Soldi, S., Morelli, L., Goupil-Feuillerat, N. & Antoine, J.-M.** 2006 Survival of Yogurt Bacteria in the Human Gut. *Applied and Environmental Microbiology* **72**: 5113-5117.

**Ercolini, D.** 2004 PCR – DGGE fingerprinting: novel strategies for detection of microbes in food. *Journal of Microbiological Methods* **56**: 297-314.

**Ercolini, D., Hill, P.H. & Dodd, C.E.R.** 2003a Bacterial Community Structure and Location in Stilton Cheese. *Applied and Environmental Microbiology* **69**: 3540-3548.

**Ercolini, D., Mauriello, G., Blaiotta, G., Moschetti, G. & Coppola, S.** 2003b PCR – DGGE fingerprints of microbial succession during a manufacture of traditional water buffalo mozzarella cheese. *Journal of Applied Microbiology* **96**: 263-270.

**Ercolini, D., Moschetti, G., Blaiotta, G. & Coppola, S.** 2001 Behavior of Variable V3 Region from 16S rDNA of Lactic Acid Bacteria in Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. *Current Microbiology* **42**: 199-202.

**Erdogru, Ö. & Erbilir, F.** 2006 Isolation and Characterization of *Lactobacillus bulgaricus* and *Lactobacillus casei* from Various Foods. *Turk Journal of Biology* **30**: 39-44.

**Fasoli, S., Marzotto, M., Rizzotti, L., Rossi, F., Dellaglio, F. & Torriani, S.** 2002 Bacterial composition of comercial probiotic products as evaluated by PCR – DGGE analysis. *International Journal of Food Microbiology* **82**: 59-70.

**Flórez, A.B. & Mayo, B.** 2006 Microbial diversity and succession during the manufacture and ripening of traditional, Spanish, blue-veined Cabrales cheese, as determined by PCR – DGGE. *International Journal of Food Microbiology* **110**: 165-171.

**Fox, P.F. & McSweeney, P.** 1998 Dairy Chemistry and Biochemistry. BLACKIE ACADEMIC & PROFESSIONAL. Thomson Science. London. UK.

**Galarza-González, G.** 2005 Efecto de la agitación durante la fermentación de leche de cabra para producir yogurt para beber. Tesis de Maestría. Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey. Monterrey. México.

**García-Albiach, R., Pozuelo, M.J., Angulo, S., Morosini, M.-I., Bravo, D., Baquero, F. & del Campo, R.** 2008 Molecular analysis of yogurt containing *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* in human intestinal microbiota. *The American Journal of Clinical Nutrition*. **87**: 91-96.

**Germond, J.-E., Lapierre, L., Delley, M., Mollet, B., Felis, G.E. & Dellaglio, F.** 2003 Evolution of the Bacterial Species *Lactobacillus delbrueckii*: A Partial Genomic Study with Reflections on Prokaryotic Species Concept. *Molecular Biology and Evolution* **20**: 93-104.

**Giraffa, G.** 2004 Studying the dynamics of microbial populations during food fermentation. *FEMS Microbiology* **28**: 251-260.

**Giraffa, G. & Carminati, D.** 2008 Molecular Techniques in Food Fermentation: Principles and Applications, 1-30. In Cocolin, L. & Ercolini, D. (ed.), *Molecular Techniques in the Microbial Ecology of Fermented Foods*. Springer. USA.

**Goff, D.** 2008 Yogurt and Fermented Beverages. *Dairy Science and Technology*. University of Guelph. Canada.

**Goulas, A. & Grandison, A.S.** 2008 Applications of Membrane Separation, 35-73. In Britz, R.J. & Robinson, R.K. (ed.), *Advanced Dairy Science and Technology*. Blackwell Publishing. UK.

**Guardiola, L., Badía, R. & Díaz-García, M.E.** 2007 Molecularly Imprinted Sol-Gels for Nafcillin Determination in Milk-Based Products. *J. Agric. Food Chem* **55**: 566-570.

**Gutiérrez, J.A. & Londoño, A.** 2009 Organophosphorus and Organochlorine pesticide's determination in tomatoes from Armenia and Pereira cities' local market: Colombia. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*. **8:3**.

**Haarman, M. & Knol, J.** 2006 Quantitative Real – Time PCR Analysis of Fecal *Lactobacillus* Species in Infants Receiving a Prebiotic Infant Formula. *Applied and Environmental Microbiology* **72**: 2359-2365.

**He, T., Priebe, M.G., Zhong, Y., Huang, C., Harmsen, H.J.M., Raangs, G.C., Antoine, J.-M., Welling, G.W. & Vonk, R.J.** 2007 Effects of yogurt and bifidobacterias supplementation on the colonic microbiota in lactose – intolerant subjects. *Journal of Applied Microbiology* **104**: 595-604.

**Heaney, R.P. & Weaver, C.M.** 2000 Dairy Foods and Osteoporosis, 193-249. In Miller, G.D., Jarvis, J.K. & McBean, L.D. (ed.), *Handbook of Dairy Foods and Nutritions*. 2<sup>nd</sup> Edition. CRC Press. USA.

**Henckel, T., Friedrich, M. & Conrad R.** 1999 Molecular Analysis of Methane-Oxidizing Microbial Community in Rice Field Soil by Targeting the Genes of the 16S rRNA, Particulate Methane Monooxygenase, and Methanol Dehydrogenase. *Applied and Environmental Microbiology* **65**: 1980-1990.

**Jay, J.M.** 2000 Microbiología moderna de los alimentos, 105-121. 4<sup>a</sup> Edición. ACRIBIA, S. A. España.

**Jensen, R.G. & Kroger, M.** 2000 The Importance of Milk and Milk Products in the Diet, 1-64. In Miller, G.D., Jarvis, J.K. & McBean, L.D. (ed.), *Handbook of Dairy Foods and Nutritions*. 2<sup>nd</sup> Edition. CRC Press. USA.

**Krauss, R.M. & Kritchevsky, D.** 2000 Dairy Foods and Cardiovascular Health, 65-115. In Miller, G.D., Jarvis, J.K. & McBean, L.D. (ed.), *Handbook of Dairy Foods and Nutritions*. 2<sup>nd</sup> Edition. CRC Press. USA.

**Leveau, J.-Y. & Bouix, M.** 2000 Microbiología Industrial: Los microorganismos de interés industrial, 167-321. ACRIBIA, S.A. España.

**Lick, S., Drescher, K. & Heller, K.J.** 2001 Survival of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* in the Terminal Ileum of Fistulated Göttingen Minipigs. *Applied and Environmental Microbiology* **67**: 4137-4143.



**Lipkin, M. & Wargovich, M.J.** 2000 Dairy Foods and Colon Cancer, 155-191. *In* Miller, G.D., Jarvis, J.K. & McBean, L.D. (ed.), *Handbook of Dairy Foods and Nutritions*. 2<sup>nd</sup> Edition. CRC Press. USA.

**Loeffelholz, M. & Deng, H.** 2006 PCR and Its Variation, 166-183. *In* Tang, Y.-W. & Stratton, C.W. (ed.), *Advanced Techniques in Diagnostic Microbiology*. Springer. USA.

**Lomas, Y.G.** 2005 Aprovechamiento del suero de leche de cabra como sustrato para el desarrollo de un producto fermentado probiótico con: *Bifidobacterium bifidum* y *Lactobacillus acidophilus*. Tesis de Maestría. Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey. Monterrey. México.

**Madigan, M.T., Martinko, J.M. & Parker, J.** 2000 *Brock Biology of Microorganisms*. 9<sup>th</sup> ed. Prentice-Hall, Inc. New Jersey. USA.

**Mathies, J.C. & Austin, M.A.** 1980 Modified Acetonitrile Protein-Precipitation Method of Sample Preparation for Drug Assay by Liquid Chromatography. *CLINICAL CHEMISTRY* **26**: 1760.

**Matsumoto, M., Aranami, A., Ishige, A., Watanabe, K. & Benno, Y.** 2007 LKM512 yogurt consumption improves the intestinal environment and induces the T – helper type 1 cytokine in adult patients with intractable atopic dermatitis. *Journal of Clinical and Experimental Allergy* **37**: 358-370.

**Mohr, A., Weiher, A., Herr, I. & Zwacka, R.** 2006 Polymerase Chain Reaction (PCR), 189-196. *In* Wink, M. (ed.), *An Introduction to Molecular Biotechnology*. WILEY-VCH. Germany.

**Monnet, V., Condon, S., Cogan, T.M. & Gripon, J.C.** 1996 Metabolism of Starter Cultures, 47-95. *In* Cogan, T.M. & Accolas, J.P. (ed.), *Dairy Starter Cultures*. VCH Publishers, Inc. USA.

**Moreno, Y., Hernández, M., Collado, M.C. & Hernández, E.** 2000 Viability of Lactic Acid Bacteria (LAB) in dairy products by using fluorescent dyes. *Ars Pharmaceutica* **41**: 287-292.

**Mozzi, F., Vaningelgem, F., Hébert, E.M., Van der Meulen, R., Foulquié-Moreno, M.R., Font de Valdez, G. & De Vuyst, L.** 2006 Diversity of Heteropolysaccharide – Producing Lactic Acid Bacterium Strains and Their Biopolymers. *Applied and Environmental Microbiology* **72**: 4431-4435.

**Muñi, A., Páez, G., Faría, J., Ferrer, J. & Ramones, E.** 2005 Eficiencia de un sistema de ultrafiltración/nanofiltración tangencial en serie para el fraccionamiento y concentración del lactosuero. *Revista Científica FCV – LUZ* **15**: 361-367.

**Muyzer, G., De Waal, E.C. & Uitterlinden, A.G.** 1993 Profiling of Complex Microbial Populations by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Analysis of Polymerase Chain Reaction-Amplified Genes Coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology* **59**: 695-700.

**Nakatsu, C.H.** 2007 Soil Microbial Community Analysis Using Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **71**: 562-571.

**Nilsson, L.-E., Lyck, S. & Tamime, A.Y.** 2006 Production of Drinking Products, 95-127. In Tamime, A.Y. (ed.), *Fermented milks*. Blackwell Science Ltd. Oxford. UK.

**Norma Oficial Mexicana NOM-092-SSA1-1994** 1995. Bienes y Servicios. *Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa*.

**Norma Oficial Mexicana NOM-110-SSA1-1994** 1995. Bienes y Servicios. *Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico*.

**Polson, C., Sarkar, P., Incledon, B., Raguvaran, V. & Grant, R.** 2003 Optimization of protein precipitation based upon effectiveness of protein removal and ionization effect in liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B* **785**: 263-275.

**Randazzo, C.L., Torriani, S., Akkermans, A.D.L., de Vos, W.M. & Vaughan, E.E.** 2002 Diversity, Dynamics, and Activity of Bacterial Communities during Production of an Artisanal Sicilian Cheese as Evaluated by 16S rRNA Analysis. *Applied and Environmental Microbiology* **68**: 1882-1892.

**Ramírez, A.** 2008 Laboratorio de Biotecnología. Centro de Biotecnología FEMSA. ITESM. México.

**Randazzo, C.L., Vaughan, E.E. & Caggia, C.** 2005 Artisanal and experimental Pecorino Siciliano cheese: Microbial dynamics during manufacture assessed by culturing and PCR – DGGE. *International Journal of Food Microbiology* **109**: 1-8.

**Rivas, F. & Garro, O.** 2006 Preparación de cultivos iniciadores, Optimización de sustrato de crecimiento. *Comunicaciones Científicas y Tecnológicas*. UNNE. Argentina.

**Samaniego, L.M. & Sosa, M.** 2000. Lactobacillus spp.: Importantes promotores de actividad probiótica, antimicrobiana y bioconservadora. *Editorial Universitaria del Ministerio de Educación Superior de la República de Cuba* **1**: 3-21.

**Savaiano, D.A. & Levitt, M.** 2000 Lactose Intolerance, 311-354. In Miller, G.D., Jarvis, J.K. & McBean, L.D. (ed.), *Handbook of Dairy Foods and Nutritions*. 2<sup>nd</sup> Edition. CRC Press. USA.

**Schultz, M., Munro, K., Tannock, G.W., Melchner, C., Göttl, H., Schwietz, J., Schölmerich, J. & Rath, H.C.** 2004 Effects of Feeding a Probiotic Preparation (SIM) Containing Inulin on the Severity of Colitis and on the Composition of the Intestinal Microflora in HLA-B27 Transgenic Rats. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* **11**: 581-587.

**Scott, R. & Sullivan, W.C.** 2008 Ecology of Fermented Foods. *Society of Human Ecology* **15**: 25-31.

**Shadid, R.** 2007 Effects of prebiotic supplementation during pregnancy on maternal and neonatal gut microbiota, as well as on selected foetal immune parameters – a randomized, double-blind, placebo-controlled pilot study. Ph.D. thesis. University of Ludwig-Maximilians. Munich. Germany.

**Spiller, R.** 2008 Probiotics and prebiotics in irritable bowel syndrome. *Rev. Alimentary Pharmacology and Therapeutics* **28**: 385-396.

**Stingele, F., Neeser, J.-R. & Mollet, B.** 1996 Identification and Characterization of the *eps* (Exopolysaccharide) Gene Cluster from *Streptococcus thermophilus* Sfi6. *Journal of Bacteriology* **178**: 1680-1690.

**Tamime, A.Y. & Robinson, R.K.** 1991. Yogur Ciencia y Tecnología. Editorial ACRIBIA, S. A. Zaragoza. España.

**Temmerman, R., Scheirlinck, I., Huys, G. & Swings, J.** 2003 Culture – Independent Analysis of Probiotic Products by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology* **69**: 220-226.

**Tucker, H.A.** 1994 Lactation and its hormonal control, 1065-1092. *In* Knobil, E. & Neill, J. (ed.), *The Physiology of Reproduction*, 2<sup>nd</sup> edition. Raven Press, Ltd. USA.

**Vandeweghe, P., Norquist, P. & Flynn, E.** 2002 Yogurt Production Process. Patent No.: US 6,399,122 B2. *United State Patent*.

**Weaver, R.W., Angle, J.S. & Bottomley, P.S.** 1994 Methods of Soil Analysis: Part 2 – Microbiological and Biochemical Properties. *Soil Science Society of America* **63**: 131-133.

**Wintzingerode, F.V., Göbel, U.B. & Stackebrandt, E.** 1997 Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR – based rRNA analysis. *FEMS Microbiology Reviews* **21**: 213-229.

**Yu, Z. & Morrison, M.** 2004 Comparisons of Different Hypervariable Regions of *rrs* Genes for Use in Fingerprinting of Microbial Communities by PCR – Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology* **70**: 4800-4806.