



UNIVERSIDAD DEL QUINDÍO
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS Y
TECNOLOGÍAS
PROGRAMA DE QUÍMICA

PRODUCCIÓN DE *Lactobacillus casei* Y DETERMINACIÓN
DE ÁCIDO LÁCTICO A PARTIR
DE SUERO DE LECHE DE GANADO VACUNO

Trabajo de Grado para Optar por el Título de Químico

CARLOS ANDRES ROJAS GONZALEZ
LUIS FELIPE ESCOBAR URIBE

Profesores Guía: Germán Antonio Giraldo Giraldo. Ph. D.
Leonardo Padilla Sanabria. Bact. Msc.

Armenia, Quindío 2008

Nota de aceptación:

Germán Antonio Giraldo Giraldo. Ph. D.
Director del trabajo

Leonardo Padilla Sanabria. Bact. Msc.
Director del trabajo

Alba Lucía Duque Cifuentes
Jurado

Fabiana María Lora Suarez
Jurado

Armenia, 3 de Marzo de 2008

Carlos Andrés:

A Dios, a Martha Cecilia, Juley Magred y Melgui Julieth (madre, hermana y novia), quienes han sido mi apoyo y compañía durante este camino, por creer en mí y ser parte de mi vida.

Agradezco de una manera muy especial a la memoria de mi abuela materna, Aura quien fue una gran fuente de apoyo, comprensión y cariño durante su existencia.

Luis Felipe:

Infinitas gracias al Todo Poderoso, por haberme llamado a la vida. A José Luis y Marleny, porque con su amor, esmero y cuidados han sabido cumplir con la misión de padres. A mi hermana Karina, a mi sobrino Gerónimo y en especial a la memoria de mi abuela Jael.

AGRADECIMIENTOS

- Al señor Miguel Velásquez y la señora Lucrecia Sánchez, propietarios de la quesera artesanal, quien nos aportó el suero de leche utilizado en este proyecto.
- A Paula Andrea Bedoya Benítez, Angela María Garzón Cardona, Fredy Becerra Alvarez, y auxiliares del laboratorio de materiales y reactivos del programa de Biología, por su disponibilidad y colaboración en el préstamo de materiales, equipos y reactivos durante la elaboración del proyecto.
- A Melgui Julieht Vélez García, por su mediación en la consecución y transporte de la materia prima (Lacto-suero).
- A Melva Cristina León Salazar, jefe de laboratorios del programa de Química y a todo el grupo de técnicos y auxiliares, por su colaboración en el préstamo de materiales, equipos y reactivos.
- Al laboratorio de Ciencias Biomedicas de la Universidad del Quindío y a las personas que allí laboran, por el préstamo de equipos e instalaciones.
- Al profesor Luis Nevio Jaramillo, por su asesoría e instrucción para la determinación de grasas, nitrógeno y proteínas.

- A nuestros amigos Alejandro Perdomo, Isabel Cristina Molina y Flor Marina Marín, por todos los buenos ratos compartidos y por su apoyo solidario en todos los momentos que necesitamos, por ser como son.
- A la profesora Eunice Ríos Vásquez, por su colaboración durante todo el proyecto.
- A los directores de este proyecto, por su constante y oportuna asesoría en cada una de las etapas de su elaboración.

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
1. INTRODUCCIÓN	19
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	23
3. JUSTIFICACIÓN	24
4. OBJETIVOS	26
5. ANTECEDENTES	27
6. METODOLOGÍA	40
6.1. Obtención del suero de leche de ganado vacuno.	40
6.2. Clarificación del suero.	40
6.3. Caracterización fisicoquímica del suero fresco y clarificado.	40
6.3.1. Determinación de nitrógeno y proteínas.	40
6.3.2. Determinación de pH.	41

6.3.3. Determinación del contenido de lactosa.	41
6.3.4. Determinación de ácido láctico.	41
6.3.5. Determinación del contenido de grasas.	41
6.3.5.1. Mediante el equipo Det – Grass.	41
6.3.5.2. Mediante el método butirométrico de Gerber.	41
6.3.6. Determinación de Grados Brix.	41
6.3.7. Determinación de sólidos solubles.	41
6.4. Medios comerciales utilizados.	42
6.4.1. Caldo APT.	42
6.4.2. Agar APT.	42
6.5. Cepa Bacteriana: <i>Lactobacillus casei ssp casei</i> (ATCC 393).	42

6.5.1. Reactivación.	42
6.5.2. Identificación de la cepa.	43
6.6. Estandarización del cultivo.	43
6.6.1. Correlación de Log UFC/mL Vs absorbancia.	43
6.6.2. Cultivo de <i>Lactobacillus casei ssp casei</i> , en suero de leche de ganado vacuno.	43
6.6.2.1. Modificaciones del suero de leche de ganado vacuno.	44
6.6.2.1.1. Determinación de diferentes parámetros en los medios SM1 al SM4.	44
6.6.2.1.1.1. Consumo de azúcares.	44
6.6.2.1.1.2. Producción de ácido láctico.	44
6.6.2.1.1.3. Sólidos solubles.	44
6.6.2.1.1.4. Peso seco del microorganismo.	44

6.6.2.1.1.5. Evaluación del crecimiento bacteriano por espectrofotometría.	45
6.7. Liofilización del microorganismo.	45
6.8. Evaluación del comportamiento del microorganismo liofilizado.	46
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	47
7.1. Obtención del suero de leche de ganado vacuno.	47
7.2. Clarificación del suero.	47
7.3. Caracterización fisicoquímica del suero fresco y clarificado.	48
7.4. Cepa Bacteriana: <i>Lactobacillus casei ssp casei</i> (ATCC 393)	49
7.4.1. Estandarización del cultivo.	49
7.4.2. Determinación de diferentes parámetros en los medios SM1 al SM4:	53

7.4.2.1. Comparación entre el consumo de azúcares, expresados como lactosa y producción de ácido láctico.	53
7.4.2.2. Producción de ácido láctico.	55
7.4.2.3. Sólidos solubles.	56
7.4.2.4. Peso seco del microorganismo.	57
7.4.2.5. Cuantificación del microorganismo por espectrofotometría.	59
7.5. Liofilización del microorganismo.	61
7.6. Evaluación del comportamiento del microorganismo liofilizado.	63
7.6.1. Siembra del microorganismo (<i>L. casei</i>) en Agar–APT y Agar–Suero clarificado por el método de dilución en masa.	63
7.6.2. Recuento del <i>Lactobacillus casei</i> .	64

7.7. Identificación del <i>Lactobacillus casei</i> , antes y después del proceso de liofilizado.	65
CONCLUSIONES	66
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

		Pág.
Figura 1.	Esquema de la vía glucolítica o de Embden Meyerhof Parnas.	29
Figura 2.	Clarificación de suero.	47
Figura 3.	Evaluación del crecimiento bacteriano en el tiempo.	49
Figura 4.	Curva de crecimiento bacteriano.	50
Figura 5.	Correlación entre UFC y la absorbancia.	52
Figura 6.	Conversión de sustrato en ácido láctico.	53
Figura 7.	Producción de ácido láctico.	55
Figura 8.	Cinéticas de sólidos solubles.	56
Figura 9.	Evaluación del crecimiento bacteriano por peso seco.	57

Figura 10.	Evaluación del crecimiento bacteriano por absorbancia.	59
Figura 11.	Evaluación del crecimiento bacteriano por UFC.	60
Figura 12.	Agar–APT y Agar–Suero clarificado.	63
Figura 13.	Identificación de <i>Lactobacillus casei ssp casei</i> a través del Kit API 50CH.	65

INDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Caracterización del suero.	48
Tabla 2. Recuento estándar - U.V-vis (ventajas y limitaciones).	51
Tabla 3. Conteo de UFC antes y después del proceso de liofilización.	64

INDICE DE ANEXOS

	Pág.
ANEXO 1: Proteína total. Método Kjeldahl-Gunning-Arnold. Adaptado griffin 1955.	74
ANEXO 2: Método micro Shaffer - Somogyi para determinación de azúcares. Adaptado.	77
ANEXO 3: Determinación de la acidez expresada en ácido láctico.	83
ANEXO 4: Determinación del contenido de grasas mediante el equipo Det Grass.	85
ANEXO 5: Determinación de grasas por el método butirométrico de Gerber.	88
ANEXO 6: Aislamiento por dilución en masa o recuento estándar en placa.	91
ANEXO 7: Medición de crecimiento celular mediante peso seco de las muestras (g células/L).	93

**PRODUCCIÓN DE *Lactobacillus casei* Y DETERMINACIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO
A PARTIR DE SUERO DE LECHE DE GANADO VACUNO**

RESUMEN

Lactobacillus casei, una bacteria antigua que está despertando interés en la investigación. Estas cepas se encuentran en vegetales, leche, carne, intestino y el ambiente; utilizadas en el Japón desde los años 30 para producir leches fermentadas. Actualmente y debido a su carácter benéfico, su estudio se ha generalizado, quedando demostrado diferentes efectos sobre el organismo: actividad antagonista contra patógenos, tratamiento de desordenes gastrointestinales, modulación del sistema inmune, prevención de la incidencia del cáncer, etc. Por esta razón este trabajo se ha enfocado en la disminución del costo de producción del microorganismo, adaptando un subproducto de la industria quesera como lo es el lacto-suero actualmente subvalorado, ya que solo una parte de este se trata mediante técnicas que permiten la extracción de sus componentes, tales como: la lactosa y proteínas, que constituyen fuentes potenciales para la alimentación humana, pero la mayor parte del lacto-suero se convierte en un efluente altamente contaminante cuando se vierte a los cuerpos de agua, debido a su gran demanda biológica y química de oxígeno; por otra parte la idea de esta investigación fue obtener la mayor cantidad de ácido láctico con dicho microorganismo, con tan sólo la adición de glucosa como fuente de carbono, puesto que este ácido es usado en las industrias farmacéutica, química y de alimentos, principalmente como acidulante y conservante. Además, la demanda por el ácido láctico se ha incrementado ya que es la materia prima para la producción de ácido poliláctico (PLA). Con este trabajo se ha logrado estandarizar curvas de crecimiento bacteriano en lacto-suero con una producción celular de $5,9 \times 10^{10}$ UFC/mL en 75 h, y de ácido láctico de 70,39 y 76,24 g/L en 93 h, con 0% y 5% de glucosa respectivamente. Igualmente se caracterizó el suero y se estandarizó un proceso de liofilización para el *Lactobacillus casei* producido durante este trabajo. Al final del proceso se verificó la pureza de la cepa a través del kit API 50CH.

Palabras clave: *Lactobacillus casei*, Lacto-suero, Ácido Láctico, Probióticos, Liofilización, BAL (Bacterias Ácido Lácticas).

INTRODUCCIÓN

Los microorganismos son los seres vivos más antiguos del planeta, se encuentran prácticamente en cada nicho sobre la tierra mostrando una gran diversidad morfológica, ecológica, fisiológica y molecular. Sin la actividad microbiológica, sería imposible la vida en la tierra, pues la diversidad de los microorganismos juega un papel clave en el mantenimiento de la biosfera y proporciona un vasto e inexplorado recurso para la humanidad.

El uso de los microorganismos ha sido clave en el enfrentamiento y solución de los graves problemas de la humanidad en la agricultura y la alimentación de los pueblos, en la salud animal y humana, en la búsqueda de nuevas fuentes de energía y en la conservación del medio ambiente. [1]

Los microorganismos que sintetizan productos útiles para el hombre representan, como máximo, unos pocos centenares de especies de entre las más de 100 000 descritas en la naturaleza. Los pocos que se han encontrado con utilidad industrial son apreciados por elaborar alguna sustancia que no se puede obtener de manera fácil o barata por otros métodos. [2]

El conocimiento de la fisiología y del metabolismo bacteriano tiene algunas aplicaciones prácticas:

- Permite conocer el modo de vida y el hábitat de diferentes especies bacterianas.
- Permite formular medios de cultivo para el aislamiento e identificación. [3]

Dentro del grupo de bacterias, se encuentran las “bacterias lácticas” que producen lactato por la fermentación de azúcares simples a un pH ácido, modificando el ambiente ya que la concentración del lactato impide el crecimiento de otros microorganismos debido a la disminución del pH y al mismo tiempo liberan productos que dan sabor a algunos alimentos. La ingestión de fermentaciones lácticas es benéfica ya que facilitan la digestión de la lactosa y controlan las poblaciones intestinales, entre otras funciones.

En las últimas décadas el mercado de los alimentos saludables ha crecido notablemente a nivel global. Tanto en Asia como en Europa, el crecimiento anual de ésta industria fue del 20% entre 1992 y 1997. Dentro de esta gama de alimentos se destacan, con cerca del 65% de participación en el mercado mundial, aquellos con un contenido probiótico, los cuales contienen microorganismos bacterianos de tipo acidolácticos.

Los componentes activos de los probióticos son una mezcla de bacterias ácido lácticas, entre las que se encuentran *Lactobacillus*, *Bifidobacteria* y *Enterococci* entre otras, las cuales hacen parte de la flora intestinal de humanos y animales. Sin embargo, según estudios, las especies

bifidobacterium y *lactobacillus* son las que ejercen todo el efecto positivo sobre el organismo. [4]

Los procedimientos para la multiplicación de los *Lactobacillus* deben tener en cuenta sus complejos requerimientos nutritivos y su preferencia por las condiciones microaerófilas. Uno de los medios habituales para tal fin es el Man Rogosa y Sharpe (M.R.S). Hay que tener en cuenta, sin embargo, que este medio de cultivo y el propuesto en este proyecto no son totalmente selectivos, ya que pueden soportar el crecimiento de pediococos, enterococos, bifidobacterias e incluso algunas levaduras. [5]

Debido a la demanda actual de ácido láctico para los diferentes procesos industriales (productos farmacéuticos, cosméticos, textiles, alimenticios y la fabricación de polímeros de ácido láctico (PLA), que se degrada rápidamente en agua y dióxido de carbono [6,7]), se ha iniciado en Colombia la investigación sobre la producción de tal ácido por medio de fermentación láctica, con el fin de lograr un máximo rendimiento en su producción a bajo costo. [8]

La búsqueda de medios y condiciones de cultivo que permitan la obtención de altas densidades de microorganismos, que ha sido la meta de muchas empresas que están interesadas en la fabricación de alimentos funcionales y probióticos, nos lleva a plantear la necesidad de evaluar un medio de cultivo económico para *Lactobacillus casei*, como lo es el suero de la leche de ganado vacuno, un subproducto de la industria quesera.

Se pretende realizar cultivos a nivel de laboratorio haciendo modificaciones del medio mencionado para obtener y cuantificar el máximo rendimiento en la producción del microorganismo de interés y el ácido láctico que es el producto principal de su metabolismo, para así contribuir con ello al conocimiento actual en la producción de microorganismos probióticos y el aprovechamiento de los metabolitos provenientes de su proceso fermentativo y evitar la contaminación ambiental que produce el suero de leche de ganado vacuno.

Finalmente, se realizara un proceso de liofilización para la conservación del los microorganismos obtenidos con el medio de cultivo propuesto.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El suero de leche de ganado vacuno, procedente de la manufactura de queso, es el subproducto más abundante de la industria láctea, utilizado para la extracción de sus componentes, pero la mayor parte de éste se convierte en una carga contaminante que contribuye a la polución ambiental de los cuerpos de agua debido a su alta demanda química y biológica de oxígeno [9], que entre lo dispuesto a las leyes de protección del medio ambiente, el valor de DBO_5 del lacto-suero es igual a 30 000 – 60 000 mg O_2 por litro de aguas residuales [10]. Por esta razón se propone utilizar el lacto-suero como medio de cultivo para la propagación de microorganismos y así disminuir la contaminación ambiental, aprovechando el ácido láctico del proceso de fermentación.

Actualmente la industria de alimentos en Colombia se está preocupando por la producción de alimentos con un alto valor nutritivo, debido a esto, están empleando microorganismos no tanto como iniciadores, sino también como un ingrediente o aditivo denominado probiótico, a tal grado que la biomasa de estos microorganismos ha adquirido un mayor valor y una mayor demanda, pero desafortunadamente los métodos de cultivo industrial de probióticos son costosos [4]. Por esta razón no se ha avanzado mucho en el diseño de alimentos funcionales con aditivos probióticos, ya que este tipo de microorganismos deben ser importados de países como Japón y Estados Unidos, incrementando aún más el costo de esta nueva tecnología.

JUSTIFICACIÓN

La preocupación pública por la conservación del medio ambiente ha motivado la búsqueda de formas convenientes y económicas para aprovechar los subproductos de la industria láctea (suero de leche) [9], ya que este constituye aproximadamente el 90% del volumen de la leche y contiene la mayor parte de sus compuestos que son solubles en agua tales como la lactosa, compuestos nitrogenados (proteínas), que se clasifican en albúminas, globulinas y una fracción llamada proteasa-peptona, minerales (sodio, potasio, magnesio, cloruro y fosfato) y vitaminas hidrosolubles (riboflavina principalmente) [11]. Debido a esto se propone la utilización del suero de leche de ganado vacuno como uno de los posibles medios de cultivo para la obtención del microorganismo en estudio y sustancias como el ácido láctico que actualmente se utiliza como una importante materia prima para diferentes procesos [4,5,7], teniendo como única variable en cuanto a la fuente de alimento, el enriquecimiento del mismo con diferentes concentraciones de D(+) Glucosa, sabiendo que las hexosas constituyen uno de los componentes más requeridos por el microorganismo para llevar a cabo su proceso fermentativo, por medio del cual se produce ácido láctico mayoritariamente.

Existe un amplio interés científico e industrial hacia el desarrollo de bioprocesos novedosos que puedan mejorar el rendimiento y la productividad actuales de microorganismos probióticos, así como simplificar el ciclo de producción con un alto índice de rendimiento. [4,5,7]

Un gran aporte a la industria regional sería la producción de probióticos a partir de un medio de cultivo el cual tiene como base el suero de leche de ganado vacuno, con importantes beneficios como:

- Disminución de las importaciones de probióticos para aplicaciones en productos lácteos y no lácteos.
- Utilización de cepas de *Lactobacillus casei* para la producción de ácido láctico.
- Reducción de costos en la producción de microorganismos probióticos para el diseño de nuevos productos alimenticios con alto valor nutritivo y por consiguiente una reducción en los precios de este tipo de alimentos para los consumidores.

Por lo anterior, con este proyecto se pretende estandarizar un método y un medio de cultivo para la proliferación de *Lactobacillus casei*, con el objetivo de minimizar costos en la producción de este microorganismo, además realizar la respectiva cuantificación del ácido láctico producido mediante el proceso fermentativo y por consiguiente, poder evaluar este medio como un potencial método de producción del ácido, ampliamente usado en la industria alimenticia, farmacéutica, textil y cosmética. Así, con esto motivar al químico de hoy para que se comprometa con la investigación en esta rama de la ciencia y con ello promover el desarrollo de su comunidad.

OBJETIVO GENERAL

Estandarizar un método de cultivo para *Lactobacillus casei ssp casei* usando suero de leche de ganado vacuno, para producir y cuantificar el *Lactobacillus* y el ácido láctico por un método indirecto.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar nitrógeno, proteínas, pH, contenido de lactosa, glucosa, ácido láctico, contenido de grasas y sólidos solubles en el suero de leche de ganado vacuno.
- Estandarizar un medio de cultivo de *Lactobacillus casei* usando como base suero de leche de ganado vacuno, variando el contenido de hexosas por medio de la adición de D(+) Glucosa, para la obtención de *L. casei* y ácido láctico.
- Realizar cinéticas de crecimiento del microorganismo a través del tiempo y de la conversión del sustrato en ácido láctico para determinar el mayor rendimiento a escala de laboratorio.
- Separar los microorganismos obtenidos del medio de cultivo y realizar liofilización de los mismos para su conservación.
- Evaluar el comportamiento del microorganismo liofilizado en el medio de mayor rendimiento.

ANTECEDENTES

Las bacterias ácido-lácticas son Gram positivas, normalmente inmóviles y no esporuladas, que dan lugar a ácido láctico como principal o único producto de su metabolismo fermentativo. Los miembros no tienen porfirinas ni citocromos, no realizan fosforilación por transporte de electrones y por tanto, obtiene la energía sólo por fosforilación a nivel de sustrato. Todas las bacterias del ácido láctico son anaerobios aerotolerantes. [5]

Basándose en las propiedades de los lactobacilos se agrupan en tres grandes grupos por la fermentación de las hexosas y pentosas:

Grupo I: fermentan las hexosas pero no las pentosas ni el gluconato.

Grupo II: fermentan las hexosas y luego de un proceso de inducción también las pentosas.

Grupo III: fermentan siempre las hexosas y las pentosas. [12]

Los *Lactobacillus casei* son bacterias Gram positivas, anaeróbicas facultativas, heterofermentativas del “Grupo II”, son normalmente inmóviles y no esporuladas; tienen forma basilar y un tamaño entre 0.7 – 1.1 x 2.0 – 2.4 μm , nombradas normalmente como bacterias ácido-lácticas; pueden crecer bien a valores de pH entre 4 – 5 y temperaturas entre 35 – 40 °C, su resistencia a la acidez les permite seguir creciendo durante fermentaciones lácticas naturales.

Por consiguiente, los lactobacilos llevan a cabo las últimas fases de la mayoría de las fermentaciones ácido-lácticas. Estos microorganismos no han sido reportados como patógenos. [5]

Clasificación científica: *Lactobacillus casei*

Reino:	<i>Bacteria.</i>
División:	<i>Firmicutes.</i>
Clase:	<i>Bacilli.</i>
Orden:	<i>Lactobacillales.</i>
Familia:	<i>Lactobacillaceae.</i>
Género:	<i>Lactobacillus.</i>
Especie:	<i>L. casei.</i>
Nombre binomial:	<i>Lactobacillus casei.</i> (Orla-Jensen 1916) <i>Hansen & Lessel 1971.</i> [13]

Las cepas de *Lactobacillus casei*, utilizadas para producir leches fermentadas, se usan en Japón desde los años treinta, gracias a su capacidad de adhesión y persistencia en el tracto gastrointestinal. El nombre *L. casei* fue dado en 1919 y su nomenclatura está relacionada con el queso (casei y caseína son originarias del latín *caseus*, que significa queso) [9]. Hay que tener en cuenta que la proliferación de este microorganismo es afectada grandemente por las sustancias grasas, pero esta dificultad puede ser dominada por extracción previa de la misma. [14]

Como otras bacterias ácido lácticas, los *L. casei* son ácido-tolerantes, no pueden sintetizar porfirinas y poseen un metabolismo estrictamente fermentativo con el ácido láctico como el mayor producto metabólico final. Dentro del género *Lactobacillus*, el *L. casei* forma parte de las especies heterofermentativas facultativas que producen ácido láctico a partir de hexosas por la vía de Embden-Meyerhof Parnas (para la glucólisis) que convierten un mol de glucosa en dos de ácido láctico y a partir de pentosas vía del 6-p-gluconato producen un mol de CO₂, un mol de etanol y/o ácido acético y un mol de ácido láctico. [15]

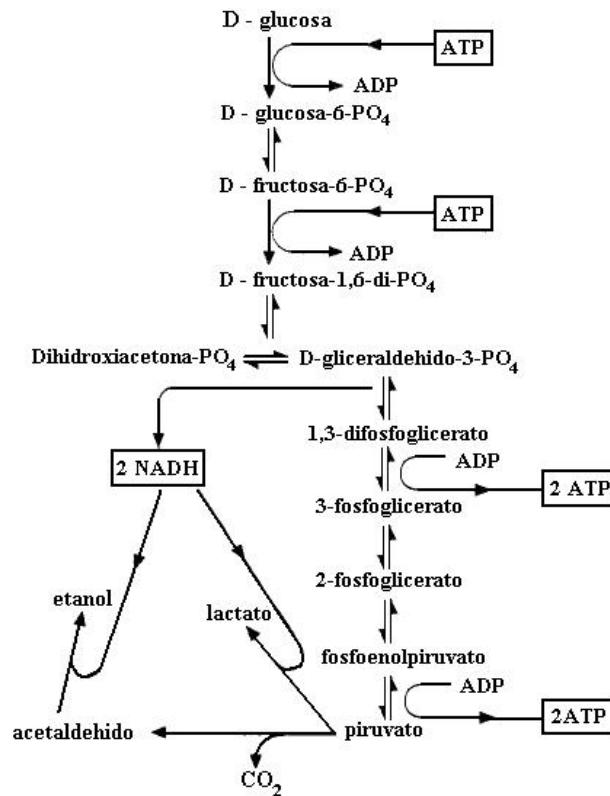


Figura 1. Esquema de la vía glucolítica o de Embden Meyerhof Parnas [3]

El ácido láctico es comercialmente producido mediante fermentación de azúcares de maíz, melazas y suero de leche con bacterias ácido lácticas homofermentativas. Es usado en las industrias farmacéutica, química y de alimentos, principalmente como acidulante y preservante [16]. Además, la demanda por el ácido láctico ha incrementado porque es la materia prima para la producción de ácido poliláctico (PLA), uno de los plásticos biodegradables de nueva generación de hoy día. El PLA se utiliza para fabricar prácticamente cualquier cosa, desde fibras a botellas transparentes para bebidas frías hasta bandejas de envasado, y una vez utilizado, se degrada rápidamente en agua y dióxido de carbono. [6,7].

Industrialmente, el *L. casei* tiene aplicaciones como probióticos en humanos (cultivo vivo que tienen efectos benéficos sobre el huésped gracias a un mejor equilibrio en la flora intestinal, por lo que se le considera como un promotor de la salud), como cultivo iniciador ácido-productor para fermentaciones de leche y especialmente como cultivos para la intensificación y aceleración de desarrollo de sabores en ciertas variedades de quesos madurados con bacterias. [15]

Actualmente y debido a su carácter beneficioso, el estudio de los lactobacillus se ha generalizado, quedando demostrados los siguientes efectos sobre el organismo:

- Actividad inmunomoduladora regulando el sistema inmune.

- Mejora la respuesta antibacteriana debido a la actividad antagonista contra patógenos. Al contribuir a reestablecer el efecto barrera de la mucosa intestinal, reduce el sobrecrecimiento bacteriano y aumenta la resistencia a la colonización por microorganismos patógenos. No tan sólo evita la aparición de la infección sino que también reduce la gravedad y la duración de la misma.
- Mejoría de los procesos diarreicos de cualquier etiología. En niños con diarreas por rotavirus, la administración de *lactobacillus* consigue reducir los días con diarrea acuosa y una reconstitución total de la flora intestinal.
- Reducción de las alergias. La existencia de una microflora intestinal con una elevada proporción de *lactobacillus* y *bifidobacterias* se asocia con una menor prevalencia de alergias.
- Disminuye la intolerancia a la lactosa. Está demostrado que los individuos con deficiencia de lactasa digieren mejor la lactosa a partir del yogur que a partir de la leche. La mejor tolerancia a la lactosa no solamente puede explicarse por el hecho de que la fermentación láctica disminuye un 25% el contenido de lactosa sino que el probiótico tiene capacidad enzimática para suplir la deficiencia de lactasa del huésped.

- Efectos antiinflamatorios de la mucosa intestinal. Incrementando la respuesta inmunitaria del huésped y protegiendo del desarrollo de cáncer de colon.
- Prevención de la incidencia de cáncer. Constituye una alta expectativa de protección frente al cáncer, hoy ampliamente estudiada entre los posibles beneficios de las BAL (Bacterias Ácido Lácticas). [17]

Aunque el yogurt convencional se comercializa desde principios de siglo, los nuevos probióticos tienen su inicio en los años treinta, con la producción del primer lácteo fermentado, elaborado por el médico japonés Minoru Shirota en 1930, a través de la incorporación de *Lactobacillus casei shirota* a la leche para conseguir un probiótico bebible de excelente aceptación. Desde esta fase inicial hasta la actualidad, han sido numerosas las investigaciones para incorporar nuevas bacterias que puedan ejercer un efecto saludable sobre el organismo. El avance de la biotecnología ha puesto al servicio del consumidor una amplia gama de probióticos. [17]

Los probióticos utilizados actualmente en Colombia son importados de países como Estados Unidos y Japón, lo cual implica costos de adquisición y transporte elevados.

La búsqueda de medios y condiciones de cultivo que permitan la obtención de altas densidades de microorganismos ($>10^7$ UFC/g), ha sido la

meta de muchas empresas, que están interesadas en las bacterias ácido-lácticas, no sólo como microorganismos iniciadores, sino también como un ingrediente o aditivo probiótico para aumentar el valor nutritivo de sus productos.

De esta forma, la biomasa de estos microorganismos ha adquirido un mayor valor y una mayor demanda. Infortunadamente, los métodos de cultivo industrial de probióticos se caracterizan por sufrir de la inhibición del crecimiento celular debido a la producción de ácido láctico, un producto primario de su metabolismo. [4]

El suero es el líquido resultante de la coagulación de la leche, obteniéndose la separación de las proteínas, llamadas caseínas, y de la grasa. Constituye aproximadamente el 90% del volumen de la leche y contiene la mayor parte de sus compuestos que son solubles en agua. La composición química del suero varía dependiendo de las características del lácteo y de las condiciones de elaboración del queso. Su pH oscila entre 5-6; el agua es el componente más abundante en el suero, constituye el 93% o más de este, le sigue en cantidad el azúcar, la cual recibe el nombre de lactosa cercana al 5%; un poco menos del 1% del suero lo constituye compuestos nitrogenados, de las cuales la mitad son proteínas, de muy alto valor nutritivo, que se clasifican en albúminas, globulinas y una fracción llamada proteasa-peptona. Otros compuestos del suero son los minerales que se encuentran en concentraciones alrededor de 0,7%, encontrándose en mayor cantidad el sodio, el potasio, el magnesio, el cloruro y el fosfato. El

suero contiene además las vitaminas hidrosolubles de la leche, de las cuales la más importante es la riboflavina y en cantidades muy variables aparecen grasa y ácido láctico.

Entre los productos que se obtienen, o pueden ser obtenidos por fermentación del suero, se encuentran: ácido láctico, alcohol, vinagre, ácido propiónico; enzimas como lactasas, proteasas y pectinasas; penicilina, vitamina B2 y B12, aceite y proteína unicelular para alimento humano y de animales. [11]

La liofilización llamada anteriormente crio-deseccación, cuyo nombre procede de la industria farmacéutica, es un proceso de secado cuyo principio consiste en sublimar el hielo de un producto congelado. El agua del producto pasa, por tanto, directamente del estado sólido al estado de vapor, sin pasar por el estado líquido. [18]

El proceso de liofilización consiste esencialmente en dos etapas: 1) el producto se congela y 2) el producto se seca por sublimación directa del hielo bajo una presión reducida.

Los productos liofilizados pueden volver a su estado original por adición de agua. La estructura esponjosa del producto liofilizado permite una rápida rehidratación del mismo. Las características del producto rehidratado son análogas a las del producto inicial. [19]

Algunos autores refieren como un nivel de viabilidad adecuado la recuperación del 50-75 % de las células preservadas, aunque tales niveles no pueden obtenerse con algunas células. [1]

T. Roukas y P. Kotzekidou, en la Universidad de Thessaloniki, en Grecia, estudiaron la producción de ácido láctico a partir de suero de leche desproteinizado y una mezcla de cultivos de células de *Lactobacillus casei* SU No 22 y *Lactococcus lactis* WS 1042 tanto libres como coinmovilizadas, cultivadas en un reactor mediante diferentes cultivos batch. El cultivo fedbatch con una concentración de sustrato de 100 g L^{-1} y una tasa de alimentación de 250 mL h^{-1} probó ser un mejor sistema de fermentación para la producción de ácido láctico que el cultivo batch, tanto con células libres como coinmovilizadas. En el cultivo repeated fedbatch, con células coinmovilizadas de los microorganismos dieron una elevada concentración de ácido láctico comparada con una mezcla de células libres. Las células de *L. casei* y *L. lactis* fueron coinmovilizadas en gotas de alginato de calcio, manifestando su habilidad para producir ácido láctico por 20 días. [16]

A. Senthuran, et al., en la Universidad de Lund en Suiza, trabajaron en la producción de ácido láctico con células de *L. casei* subsp. *Rhamnosus* (DSM 20021) inmovilizadas en un reactor agitado con recirculación. Estudiaron un sistema que tenía un largo tiempo de vida operacional, permitiendo el uso de altas concentraciones de sustrato para la máxima conversión en el producto. Encontraron que las proteínas del suero de leche

hidrolizado, constituían una rica fuente de nitrógeno comparado con el extracto de levadura y además que el pH óptimo para un proceso homofermentativo era de 6,0. Los resultados obtenidos con estas condiciones de trabajo fueron comparados con un proceso batch usando células libres, concluyendo que el primero daba mejores resultados. Una variable importante fue el tamaño de la matriz donde estaban inmovilizados los microorganismos, ya que es fundamental para la estabilidad operacional del reactor. [7]

Mi-Young Ha, et al, en el departamento de ingeniería ambiental, en la universidad nacional de Chonnam de Korea, llevaron a cabo un estudio para determinar las condiciones optimas de concentración de extracto de levadura, licor de maíz y glucosa para el crecimiento y producción de ácido láctico a partir de *Lactobacillus casei* HK-1, en cultivo batch, usando modelos experimentales bajo pH controlados. Con este trabajo se demostró que las condiciones optimas de crecimiento y producción de ácido láctico con *L. casei* HK-1 fue de 1,276% y 0,697% para el extracto de levadura, 3.505%, 1.708% con licor de maíz y, 2.390% y 2.215% con glucosa respectivamente. [20]

Ding, S. Tan, T, en la Universidad de Tecnología Química de Beijin (China), usaron diferentes estrategias de alimentación en cultivos batch alimentados para la producción de ácido L-láctico, a partir de la fermentación con *Lactobacillus casei* LA-04-1, con un medio de formulación propia similar a los medios comerciales ajustando el pH entre

6.0 – 6.5 usando NH_4OH (25%); este medio fue alimentado durante la fermentación, con una solución de glucosa de 850 g/L y extracto de levadura al 1%, y se mantuvo el pH con adición automática de NH_4OH (25%). La máxima concentración de ácido L-láctico obtenida fue de 180 g/L en 84 horas de fermentación, con una producción de biomasa de 4,3 g/L en 70,5 horas. [21]

Vargas E. y otros del Departamento de Ingeniería Química de la Universidad de los Andes, propusieron la producción de microorganismos probióticos como aditivo para alimentos concentrados para ganado vacuno. Sus experimentos preliminares fueron llevados a cabo en un baño agitado de temperatura controlada (shaker) para obtener la formulación de un medio de cultivo, a base de melaza de caña como fuente de hexosas y las cinéticas de crecimiento para el aislamiento de *Lactobacillus spp.* y *Bifidobacterium spp.* Los experimentos se llevaron a cabo en un reactor de 2,7 L, con un flujo de alimentación de aire de 1,4 VVM. Estos resultados se usaron para escalar el proceso a un biorreactor de 50 L, obteniéndose un diseño geoméricamente similar que produjo una densidad de células de 6,5 g/L en sólo 24 horas de operación. Uno de los logros más relevantes de este proyecto fue la obtención de condiciones de operación óptimas para el crecimiento de los microorganismos probióticos en un medio de cultivo de bajo costo. [4]

El licenciado en educación José Andrés Mejía Rodríguez, identificó sólo veinticinco de un total de trescientas setenta cepas de microorganismos,

pertenecientes al género *Lactobacillus*, de interés en este proyecto, aisladas a partir de heces de niños lactantes sanos recolectadas en el hospital “Sor Juan Inés” en la ciudad de Mérida del Estado de Mérida en Venezuela, de muestras vaginales de diez jóvenes sanas del mismo Estado y de equipos utilizados en la elaboración de productos lácteos de la Planta Piloto Lácteos Santa Rosa (PROGAL) de la Universidad de los Andes. Estas cepas fueron resistentes a condiciones hostiles como pH 3,0 y 0,15% de bilis. Se detectó actividad antimicrobiana por parte de las cepas contra: *Bacillus subtilis* ATCC 60519, *Candida albicans* ATCC 14053, *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Con estos resultados podemos decir que estas cepas podrían ser utilizadas para la elaboración de una leche fermentada que probablemente tenga propiedades prebióticas. [5]

En el departamento de Química, Facultad Experimental de Ciencias, Universidad del Zulia, Venezuela. Lauris Urribarrí, et al., estudiaron el cultivo continuo de la bacteria *Lactobacillus helveticus* ATCC 8018 en suero de leche desproteinizado y suplementado con extracto de levadura y peptona trípica de caseína, a pH 5,9 y temperatura de 40 °C, condiciones adecuadas de crecimiento del microorganismo previamente determinadas en cultivo por carga. Para esto utilizaron un biorreactor BioFlo 4000 con un volumen de trabajo de 4 L y controles automáticos de los flujos de alimentación, extracción, temperatura, pH y velocidad de agitación. Obteniendo una máxima productividad de biomasa y ácido láctico de 6,2 y 1,83 kg/m³.h respectivamente. Revelando y sugiriendo con esto el potencial uso del lacto-suero como sustrato para bacterias homolácticas. [9]

Malik, Khursheed A. en 1995 reportó un método miniaturizado de liofilización utilizando tubos capilares de vidrio mediante el cual se reduce el espacio de almacenamiento; utilizando varios microorganismos y meso-inositol, gelatina y dextran como agentes crioprotectores. Sin embargo, el proceso es complejo y caro, pues aunque no necesariamente requiere de un equipo sofisticado. [22]

METODOLOGÍA

6.1. Obtención del suero de leche de ganado vacuno.

El suero fue suministrado por la granja lechera “La Maca”, ubicada en la zona rural de Filandia (Quindío), vía vereda la Julia, proveniente de la manufactura de queso molido a partir de leche de ganado Holstein, criado entre los 1 600 – 1 700 metros de altura sobre el nivel del mar.

6.2. Clarificación del suero.

La clarificación del lacto-suero se realizó con adiciones de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ entre 0,005 y 0,02% [23], con autoclavado a 121°C y 15 psi, seguido de centrifugación a 4 000 rpm. Luego este se esterilizó y almacenó.

6.3. Caracterización fisicoquímica del suero fresco y clarificado:

La caracterización se realizó por duplicado en 6 muestras correspondientes a seis días de producción de queso molido.

6.3.1. Determinación de nitrógeno y proteínas por el método de Kjendalh. (Ver anexo 1).

6.3.2. Determinación del pH por medio del potenciómetro IQ IQ-240 con electrodos para sólidos y líquidos.

6.3.3. Determinación del contenido de lactosa por el método de SHAFFER-SOMOGYI [24] (Ver anexo 2).

6.3.4. Determinación de ácido láctico por el método de acidez total. (Ver anexo 3).

6.3.5. Determinación del contenido de grasas:

6.3.5.1. Mediante el equipo Det Grass (marca P-selecta), siguiendo las instrucciones del fabricante (Ver anexo 4).

6.3.5.2. Mediante el método butirométrico de Gerber (Ver anexo 5).

6.3.6. Determinación de Grados Brix por refractometría por medio del refractómetro de mesa (Thermo Electron Corporation), manteniendo una temperatura constante de 24,5 °C.

6.3.7. Determinación de sólidos solubles por el método derivado de grados Brix, según Giraldo G. [25]. Mediante la formula:

$$X_{ss} = \frac{^{\circ}\text{Brix}/100 * X_w}{1 - ^{\circ}\text{Brix}/100}$$

- X_{ss}: en base a la unidad.
- X_w: en base a la unidad.
- X_w: trabajo a 60 °C y preferible a vacío.

6.4. Medios comerciales utilizados.

6.4.1. Caldo APT: Se disolvió 46,2 g del polvo en un litro de agua destilada se llevó a ebullición hasta su total disolución y se esterilizó en autoclave 15 minutos a 121 °C en autoclave.

6.4.2. Agar APT: Se disolvió 61,2 g del polvo en un litro de agua destilada se llevó a ebullición hasta su total disolución y se esterilizó en autoclave 15 minutos a 121 °C en autoclave.

6.5. Cepa Bacteriana: *Lactobacillus casei ssp casei* (ATCC 393).

6.5.1. Reactivación.

La cepa liofilizada de *Lactobacillus casei ssp casei* se reactivó por rehidratación en caldo APT, incubado a 37 °C durante 48 h. Esta cepa activada se incorporó en esferas de cerámica (CRYOBANK), de acuerdo a instrucciones del fabricante.

6.5.2. Identificación de la cepa.

Se realizó a la cepa comercial y a la cepa obtenida y liofilizada durante el trabajo, mediante el kit comercial API 50CH (Biomérieux), siguiendo las instrucciones del fabricante.

6.6. Estandarización del cultivo.

6.6.1. Se normalizó la concentración de *Lactobacillus casei ssp casei* a través de una curva de calibración de Log UFC/mL Vs absorbancia, utilizando suero de leche de ganado vacuno: se realizó un cultivo en masa en agar APT el cual se incubó a 37 °C durante 48 h, a partir de este cultivo se inoculó el suero clarificado hasta una absorbancia inicial conocida, incubándose a igual temperatura. Desde este punto y cada 24 h se realizaron lecturas de absorbancia y unidades formadoras de colonia por mililitro (UFC/mL) mediante siembras por la técnica de recuento estándar en placa (Ver anexo 6). Finalmente se hizo una correlación entre el Log UFC/mL y la absorbancia .

6.6.2. Cultivo de *Lactobacillus casei ssp casei*, en lacto-suero de leche de ganado vacuno: se inocularon con *Lactobacillus casei ssp casei*, 24 mL del lacto-suero y se realizaron mediciones del crecimiento bacteriano, mediante espectrofotometría y medición del peso seco (Ver anexo 7) durante 99 horas, efectuando dos

lecturas diarias cada 6 y 18 h; el pH inicial del medio no fue ajustado.

6.6.2.1. Modificaciones del suero de leche de ganado vacuno: se modificó por medio de la adición de glucosa de la siguiente manera: (**SM**: Suero Modificado)

- 0 % de D(+) Glucosa. (SM1)
- 5 % de D(+) Glucosa. (SM2)
- 10 % de D(+) Glucosa. (SM3)
- 15 % de D(+) Glucosa. (SM4)

6.6.2.1.1. Determinación de diferentes parámetros en los medios SM1 al SM4:

6.6.2.1.1.1. Consumo de azúcares, expresados como lactosa. (Ver anexo 2).

6.6.2.1.1.2. Producción de ácido láctico. (Ver anexo 3).

6.6.2.1.1.3. Sólidos solubles por el método derivado de grados Brix, según Giraldo G. [25]

6.6.2.1.1.4. Peso seco (g/L) del microorganismo. (Ver anexo 7).

6.6.2.1.1.5. Evaluación del crecimiento bacteriano por espectrofotometría.

Para el seguimiento de estas cinéticas en los diferentes medios modificados (SM1-4) se estandarizó una absorbancia inicial de $0,128 \pm 0,006$ incluyendo el inóculo, con un pH inicial de $6,05 \pm 0,05$.

Todas las cinéticas realizadas se iniciaron con volúmenes de 24 mL de medio de cultivo estéril, al los cuales se les adicionaba 1 mL de inóculo. No fue necesario ajustar el pH como lo recomiendan otros autores [4,7,16,21], ya que este se encontraba dentro del rango óptimo de crecimiento. Se realizaron dos mediciones diarias de los parámetros hasta las 99 horas.

6.7. Liofilización del microorganismo:

- Se cultivó 0,5 L del mejor medio de cultivo modificado encontrado de acuerdo a los resultados del punto 6.6.2.1.1.
- Después del periodo de incubación se centrifugaron a 4 000 rpm por 20 minutos, seguidamente se lavó 2 veces con solución salina al 0,9% estéril y agua destilada estéril.
- Se congeló entre -55 y -85 °C el microorganismo obtenido de la etapa anterior, usando el suero clarificado como agente crioprotector.

- Se realizó liofilización del microorganismo a -55°C, 100 mtorr por 18 h. en un liofilizador Virtis modelo BENCHTOP 6K.

6.8. Evaluación del comportamiento del microorganismo liofilizado.

Se rehidrató el *Lactobacillus casei* liofilizado en 20 mL con lacto-suero estéril por 1 hora. Luego, se sembró en Agar-APT y Agar-Suero de leche ganado vacuno por el método de dilución en masa (Ver anexo 6). Luego de las 48h de incubación se realizó el recuento de células viables. Por último se realizó la identificación del microorganismo utilizando el estuche comercial API 50 CH (Biomerieux), siguiendo las indicaciones del fabricante.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1. Obtención del suero de leche de ganado vacuno.

Para llevar a cabo este proyecto se utilizaron 10 Litros de lacto-suero, sin adición de NaCl, del cual se conoce por referencias que produce inhibición en el crecimiento del microorganismo de interés. [26]

7.2. Clarificación del suero.



(a)

(b)

Figura 2. Clarificación de suero.

En la figura 2 se observa el suero de leche de ganado vacuno fresco antes de ser sometido al proceso de clarificación (a) y clarificado (b). El objetivo de la clarificación del suero de leche, es permitir las mediciones de absorbancia en el U.V- vis, a 550 nm, longitud de onda de interés para evaluar el crecimiento bacteriano del *Lactobacillus casei*. El suero fresco, por su alto contenido de proteínas y lípidos, presentaba una absorbancia

alta, limitando las lecturas debido a las desviaciones de la ley de Lambert Beer.

7.3. Caracterización fisicoquímica del suero fresco y clarificado:

Tabla 1. Caracterización del suero.

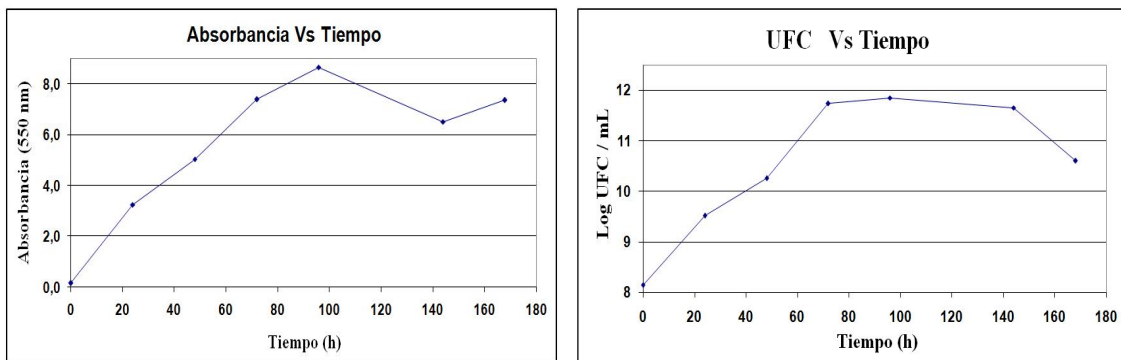
Propiedad fisico-química	Suero de leche fresco		Suero de leche Clarificado		
	±		±		
pH	6,15	0,32	6,10	0,02	
Densidad (g/mL)	1,026	0,001	1,025	0,001	
Extracto seco (%)	7,06	0,32	5,37	0,16	
Contenido de grasas	Det-gras (%)	0,26	0,04	Trazas	-
	butirómetro (%)	0,50	0,17	Trazas	-
Contenido de Nitrógeno (%)	0,22	0,02	0,11	0,01	
Contenido de proteínas (%)	1,38	0,10	0,70	0,06	
Acidez total (% ácido láctico)	0,99	1,80	0,91	0,06	
°Brix	6,52	0,20	6,37	0,06	
Humedad (%)	93,06	0,39	94,69	0,16	
Sólidos Solubles (%)	7,07	0,32	6,47	0,01	
Contenido de lactosa (%)	4,71	0,46	4,35	0,06	

Como se puede observar en la tabla 1, el contenido de lactosa, nitrógeno, proteínas el pH se encuentran en una concentración óptima para el crecimiento de bacterias lácticas, lo cual queda confirmado en este trabajo. Además se puede afirmar que gran parte de la turbidez del suero fresco es debida principalmente al contenido de grasas y proteínas como se evidencia en la tabla 1 y en la figura 2. No hubo una variación significativa entre el suero fresco y el suero clarificado con respecto a lactosa, lo que indica que

durante el proceso de clarificación no se precipitan este tipo de compuestos lo cual es bueno para el crecimiento de los microorganismos y la producción de ácido láctico. Respecto al pH no hubo variación significativa durante el proceso de clarificado lo cual afecta positivamente al suero como medio de crecimiento, encontrándose en el rango óptimo según lo reportado por Edgar Mauricio V. et al. y Appadurai Senthuran et al. [4,7].

7.4. Cepa Bacteriana: *Lactobacillus casei ssp casei* (ATCC 393)

7.4.1. Estandarización del cultivo.



(a)

(b)

Figura 3. Evaluación del crecimiento bacteriano en el tiempo.

En la figura 3 se observa el crecimiento del microorganismo versus tiempo, el cual fue seguido mediante espectrofotómetro (a) y mediante recuento estándar en placa (b). En (a) se puede observar el aumento de la absorbancia a través del tiempo, y en (b) el aumento de las UFC en el tiempo, ambas llegando a un pico máximo de crecimiento a las 96 horas,

además en la figura 3b se observan tres de las cuatro fases del crecimiento de poblaciones bacterianas reportado por la literatura (figura 4) [3]; se observa, la fase de crecimiento exponencial, estacionaria y muerte; la fase de latencia no aparece debido a que el *L. casei* ya se encontraba adaptado al medio.

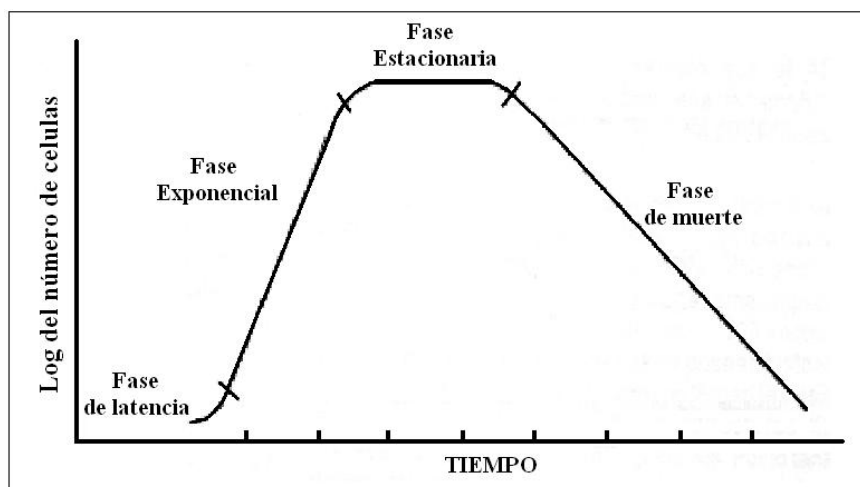


Figura 4. Curva de crecimiento bacteriano. [3].

En este trabajo se utilizaron varios métodos para cuantificar el crecimiento bacteriano debido a que no existe un método 100 % sensible y específico. En la tabla 2 se relacionan la ventajas y desventajas de algunos de ellos.

Tabla 2. Recuento estándar - U.V-vis (ventajas y limitaciones)

	Recuento estándar en placa	U.V-vis
Ventajas	<ul style="list-style-type: none">✓ Cuantifica viables.✓ Muy sensible.	<ul style="list-style-type: none">✓ Fácil y rápido.
Limitaciones	<ul style="list-style-type: none">✓ Lento.✓ Costoso.	<ul style="list-style-type: none">✓ No distingue vivas y muertas.✓ Sólo para unicelulares.✓ No para soluciones muy concentradas.

Al realizar una curva donde se relacionen estas dos metodologías, se podría lograr una disminución o eliminación de estas limitaciones, por esta razón y como se dijo en el punto 6.6.1. lo que se pretendía realizar era una curva de calibración donde se relacionaba las UFC/mL y la absorbancia, teniendo en cuenta la inhibición del crecimiento bacteriano en el tiempo por el aumento en la concentración del ácido láctico y el proceso metabólico del microorganismo en el medio.

Estas dos gráficas se relacionaron, dando como resultado las gráficas 5a y 5b. En la primera podemos evidenciar una línea recta seguida por una línea horizontal que muestra el comienzo de la fase estacionaria, en la cual hay un cese del crecimiento por el agotamiento de los nutrientes y la acumulación de ácido láctico. Por esta razón se deja como gráfica final de correlación la figura 5b, en donde podemos garantizar que cualquier absorbancia que se encuentre dentro de este rango y en un tiempo no mayor a 76 horas corresponderá a un número de células viables, disminuyendo la

primera limitación (Ver tabla 2) de uso del U.V para una producción de *L. casei* en lacto-suero clarificado bajo las condiciones planteadas.

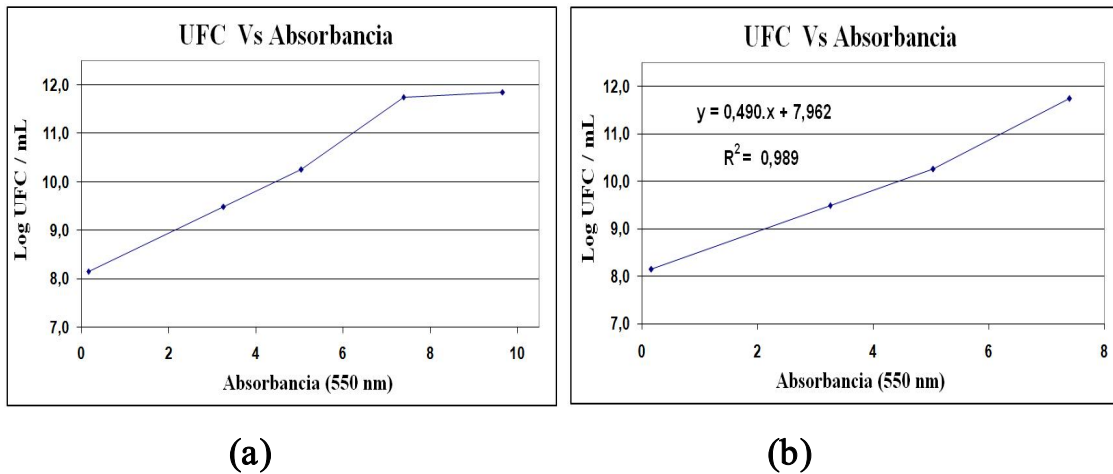


Figura 5. Correlación entre UFC y la absorbancia.

Aplicando el modelo de regresión lineal, se obtuvo la ecuación $Y=0,490 X + 7,962$ con un coeficiente de determinación (R^2) de 0.989, el cual es comparable con el rango de $R^2 = 0.904 - 0,998$ obtenido por otros autores con curvas realizadas para microorganismos [27]. Este valor además es muy cercano a la unidad, siendo 1 (uno) el mejor valor de correlación para este tipo de graficas [28], lo cual confirma que el método de correlación propuesto es viable para la cuantificación de *L. casei* en lacto-suero clarificado bajo las mismas condiciones de cultivo reportadas en este trabajo.

7.4.2. Determinación de diferentes parámetros en los medios SM1 al SM4:

Con el fin de obtener la mayor producción de ácido láctico y sabiendo que las hexosas como la glucosa son los sustratos preferidos por esta clase de microorganismos, se decidió enriquecer el suero clarificado con este azúcar en diferentes concentraciones, observándose los siguientes comportamientos:

7.4.2.1. Comparación entre el consumo de azúcares, expresados como lactosa y producción de ácido láctico.

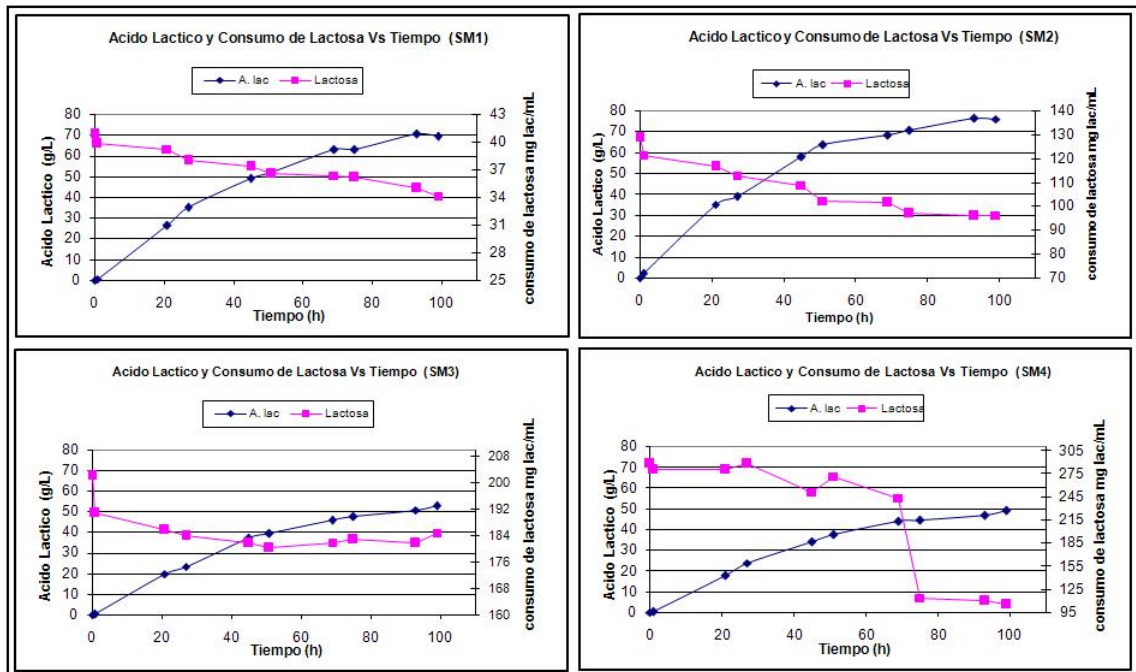


Figura 6. Conversión de sustrato en ácido láctico.

La figura 6 muestra el consumo de lactosa y la producción de ácido láctico por parte de *L. casei* en los diferentes medios. Las líneas descendentes representan el consumo de carbohidratos expresados en términos de lactosa, y las líneas ascendentes representan la producción de ácido láctico. Como se puede observar, en todos los medios hay una disminución en la concentración de los carbohidratos y un aumento en la concentración de ácido láctico por el proceso fermentativo del *L. casei*, pero a pesar de esto los azúcares remanentes son muy altos especialmente en los medios SM2, SM3 y SM4. Por el comportamiento anterior podemos afirmar que no es necesario realizar adiciones de azúcares al suero de leche de ganado vacuno para un óptimo crecimiento del *Lactobacillus casei*, ya que estos azúcares adicionados permanecen en la solución.

Como se observa en las figuras 3a y 3b, a partir de las 99 h los microorganismos entran en una fase de latencia debido probablemente a la alta concentración de ácido láctico (figura 6), impidiendo que el microorganismo siga metabolizando los azúcares residuales mencionados anteriormente que quedan en el medio.

En la siguiente figura se detallará los resultados del ácido láctico.

7.4.2.2. Producción de ácido láctico.

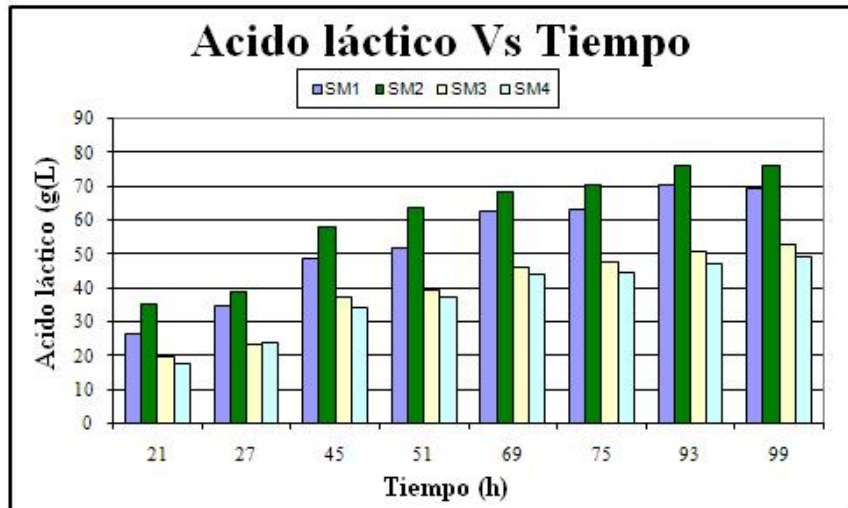


Figura 7. Producción de ácido láctico.

Como se muestra en la figura 7 la mayor producción de ácido láctico es de 76,24 y 70,39 g/L en las cinéticas SM2 y SM1 respectivamente a las 93 horas de fermentación, notándose una estabilidad a las 99 horas. Conforme a lo anterior, se puede afirmar que para producir ácido láctico a concentraciones adecuadas con *L. casei*, se puede utilizar suero de leche de ganado vacuno. De acuerdo a los valores obtenidos en este trabajo, se puede ver que son comparables con los reportados por otras investigaciones como: la realizada en la universidad de Antioquia [8], siendo su producción máxima de 28,8 g/L, utilizando *L. casei* cultivado en suero enriquecido, los señores Roukas, T y Kotzekidou, P. [16], utilizando suero de leche desproteinizado y enriquecido en donde obtuvieron un máximo de 46 g/L usando una mezcla de cepas de *L. casei* y *Lactococcus lactis* libres, y también se puede comparar con un trabajo realizado en la universidad de

Zulia (Venezuela) [9]., donde utilizaron *L. helveticus* en suero de leche desproteinizado y suplementado, obteniendo 13,02 g/L de este ácido. Además, Ding, Shaofeng et al. [21] mostraron una máxima producción de ácido láctico en 210 g/L utilizando *L. casei*, pero a diferencia de los otros trabajos, ellos trabajaron con un medio artificial formulado por ellos mismos, con una composición similar al MRS. Con los anteriores datos también podemos afirmar que en este trabajo se obtuvo una cantidad significativa de ácido láctico en un medio al cual solamente se le ha retirado parte de los caseinatos y la grasa presentes sin ninguna adición de un suplemento nutritivo al lacto-suero, lo cual es bueno si se tiene en cuenta la gran demanda actual de este ácido por los diferentes tipos de industria, en especial la producción de polímeros biodegradables como el PLA [6,7], además esto significa una producción de ácido láctico a muy bajo costo.

7.4.2.3. Sólidos solubles.

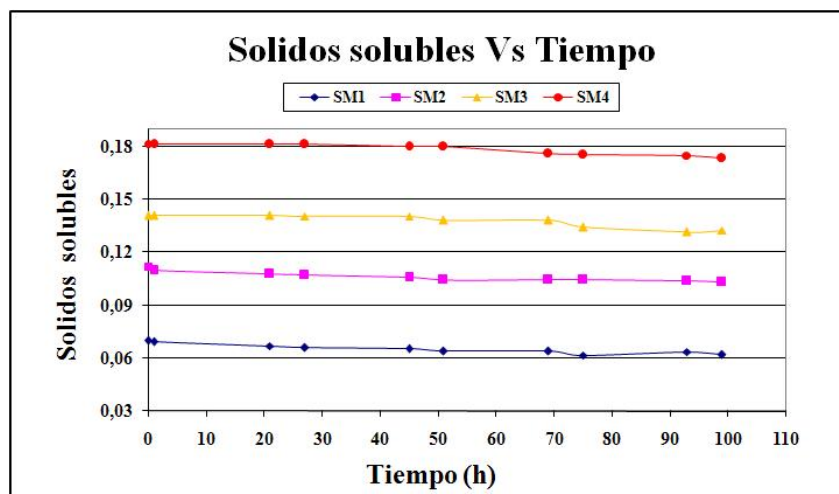


Figura 8. Cinéticas de sólidos solubles.

En la figura 8 se puede ver el comportamiento de los sólidos solubles presentado en cada una de las cinéticas, en donde los mayores valores se encuentran en la cinética SM4, lo cual es lógico, si se tiene en cuenta que los sólidos solubles en el medio de cultivo aumentan con la adición de glucosa. También se observa la poca o casi nula disminución de estos en el tiempo, ya que aunque el sustrato es consumido este se convierte a su vez en otro compuesto hidrosoluble siendo el caso del ácido láctico, impidiendo una visualización del cambio ocurrido de los sólidos solubles durante el proceso fermentativo.

7.4.2.4. Peso seco del microorganismo.

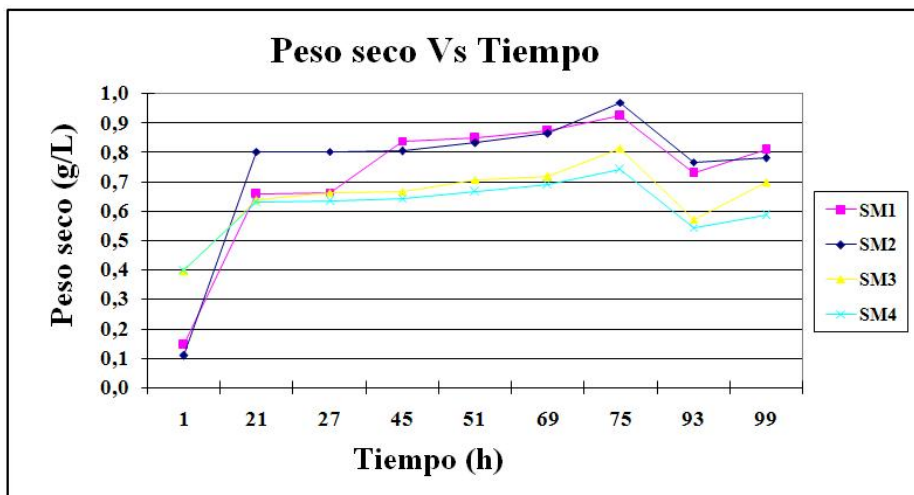


Figura 9. Evaluación del crecimiento bacteriano por peso seco.

En la figura 9 se observa el comportamiento del crecimiento del *Lactobacillus casei*, medido a través del peso seco en los cuatro medios de cultivo SM1 - 4. En las primeras horas de esta grafica donde teóricamente

se tiene aproximadamente la misma cantidad de inóculo inicial, las cinéticas no guardan una misma relación de peso seco lo que se podría deber a errores experimentales durante la obtención de datos en la realización del proceso. A pesar de esto el comportamiento de las cinéticas es muy similar en horas posteriores evidenciando un aumento en el crecimiento de los microorganismos en cada una de ellas, obteniéndose al final 0,9238 y 0,9700 g/L en la cinética SM1 y SM2 respectivamente a las 75 horas de incubación. Si se comparan estos resultados con los obtenidos por Ding, Shaofeng et al. [21], de 4,3 g/L, se puede decir que estos autores reportan mayor crecimiento del microorganismo debido a que utilizaron medios similares a los comerciales que poseen todos los nutrientes y las concentraciones de nutrientes necesarios para el crecimiento del microorganismo, mientras que el medio propuesto en este trabajo (lacto-suero) debido a su naturaleza y además de sufrir un proceso de clarificado no contiene en las mismas concentraciones de nutrientes del medio artificial formulado por dichos autores. Con lo anterior, se puede aseverar que el lacto-suero clarificado permite obtener cantidades adecuadas de *Lactobacillus casei*, y se está dando un valor agregado al lacto-suero, que generalmente se utiliza como un producto de deshecho que aumenta la contaminación ambiental.

Hipotéticamente y de acuerdo con la figura 9 en los puntos correspondientes a las 93 y 99 h para todas las cinéticas, se podría decir que la disminución en el peso seco se debería a la muerte de los microorganismos y la ruptura de los mismos, por ende la no precipitación

bajo las condiciones de centrifugado utilizadas, de los contenidos celulares (menos densos) que se encontrarían dispersos en el medio.

7.4.2.5. Cuantificación del Crecimiento del microorganismo por espectrofotometría.

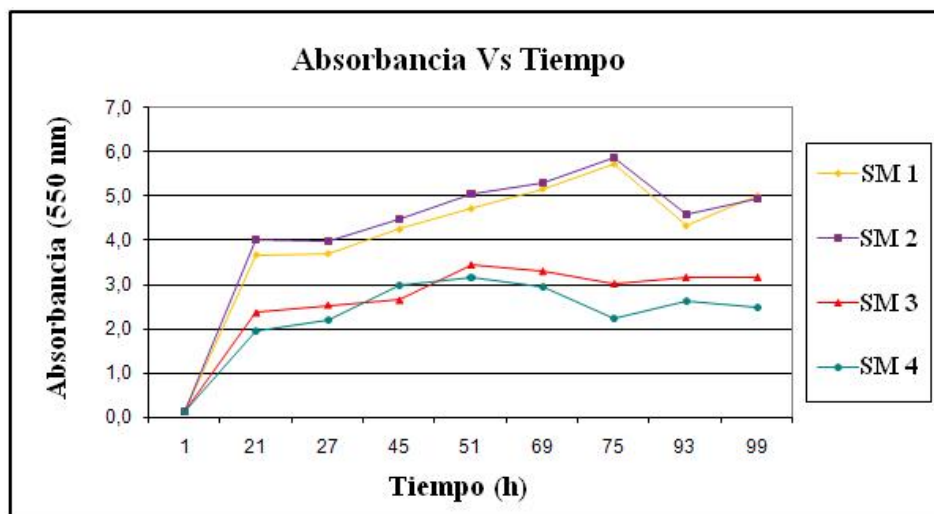


Figura 10. Evaluación del crecimiento bacteriano por absorbancia.

Al seguir el crecimiento del microorganismo en las diferentes cinéticas por medio del espectrofotómetro, se nota un comportamiento similar al presentado por el peso seco. Se presenta una disminución en la absorbancia a las 93 y 99 horas, debido probablemente a la cantidad de ácido láctico presente en la solución, donde muchas bacterias empiezan a morir y otras tratan de adaptarse al medio. A las 99 horas se observa un pequeño incremento en la absorbancia, debido probablemente a aquellos microorganismos que se han adaptado al medio y han realizado otros ciclos de replicación aumentando la población microbiana, que se evidencia en el

aumento de turbidez, este comportamiento microbiano se conoce en la literatura como fase estacionaria. [3]

Con los datos de absorbancia de la figura 10 se realiza una nueva curva de: Log UFC/mL Vs Tiempo mediante la ecuación obtenida en la figura 5b.

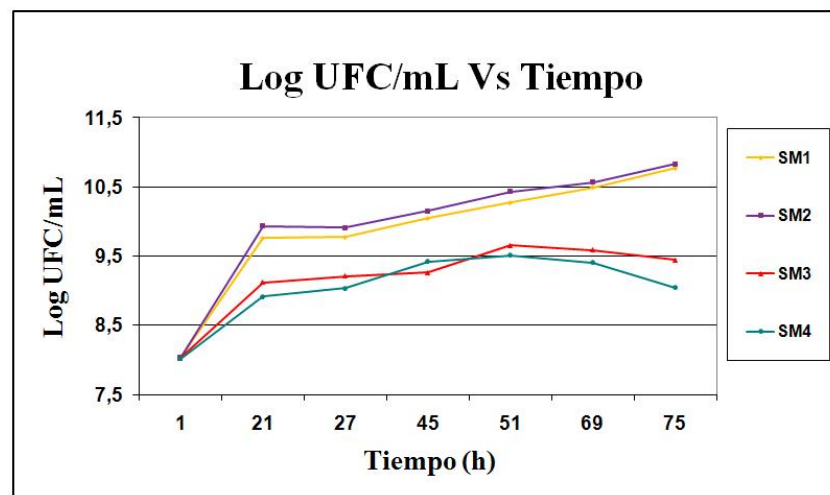


Figura 11. Evaluación del crecimiento bacteriano por UFC.

Para efectos de ver más claramente el crecimiento de microorganismos en los sueros modificados (SM) durante las cinéticas, los valores de absorbancia de la figura 10 fueron convertidos en Log UFC/mL utilizando la ecuación $Y=0,490 X + 7,962$ resultante de la figura 5b. Hay que tener en cuenta que sólo se convirtieron los datos hasta las 75 horas de fermentación, ya que de este punto en adelante, aplicando la ecuación obtenida no se garantiza un número viable de células de acuerdo al modelo de crecimiento mostrado en la figura 3b, con esta conversión de datos se obtuvo la figura 11.

Finalmente, con los valores obtenidos, se puede decir que las cinéticas SM3 y SM4 muestran los mas bajos resultados en cuanto a producción de ácido láctico y de *L. casei*, posiblemente debido aun proceso de deshidratación de las célula por la alta concentración de azúcares en el medio, ejerciendo una fuerte presión osmótica sobre el microorganismo, inhibiendo su crecimiento y tal vez provocando su muerte.

7.5. Liofilización del microorganismo.

Entre los muchos métodos para la conservación de microorganismos existentes hoy en día, se encuentran: la transferencia periódica, conservación en capa de aceite, la congelación y la liofilización. Se decidió utilizar esta última porque es la más recomendada, pues con éste método se pueden obtener células viables y con características iguales a las iniciales después de mucho tiempo de almacenamiento, alcanzando hasta de 10 años de conservación [29]. Una de las limitaciones para el uso de éste método es su alto costo del equipo y de elevado gasto energético, debido a los largos tiempos de operación. El proceso se realizó utilizando viales de aproximadamente 3,0 mL de capacidad, siguiéndose el punto 6.7 de la metodología.

De acuerdo a las cinéticas de crecimiento se decidió que el mejor momento para realizar la liofilización del *L. casei* era a las 69 horas de fermentación, correspondiente a la cinética SM1, ya que en este tiempo se garantiza que todas las células son viables por encontrarse en un punto

mucho antes de entrar en la fase estacionaria y además, en este se tiene una población celular de entre 10^9 y 10^{10} UFC/mL, siendo lo ideal, debido a que se recomienda para un proceso de liofilización tener un cultivo entre 10^8 y 10^9 UFC/mL. [30]

Para el paso de la centrifugación, los microorganismos fueron lavados con solución salina la 0,9% estéril para eliminar los remanentes del ácido láctico, luego de esto, se continuó con la adición del crioprotector. Para éste último paso, se decidió utilizar el suero clarificado como agente crioprotector, ya que éste tiene componentes muy similares a los agentes crioprotectores utilizados normalmente como lo son las soluciones de glucosa, sacarosa, proteínas, etc. [1,31], el cual se utiliza para evitar el daño por el congelamiento, paso siguiente e importante dentro de la liofilización.

Se estandarizo un tiempo de liofilizado de 18 horas apreciándose un producto final totalmente seco.

Luego de sacar las muestras del liofilizador, los viales fueron tapados y el oxígeno que quedaba dentro del vial fue retirado mediante una jeringa estéril, para así evitar la formación de radicales libres que se producen por exposición de las células al oxígeno, ya que están asociados con pérdida de viabilidad; de allí la importancia de mantener el vacío [30,31].

7.6. Evaluación del comportamiento del microorganismo liofilizado.

7.6.1. Siembra del microorganismo (*L. casei*) en Agar-APT y Agar-Suero clarificado por el método de dilución en masa.

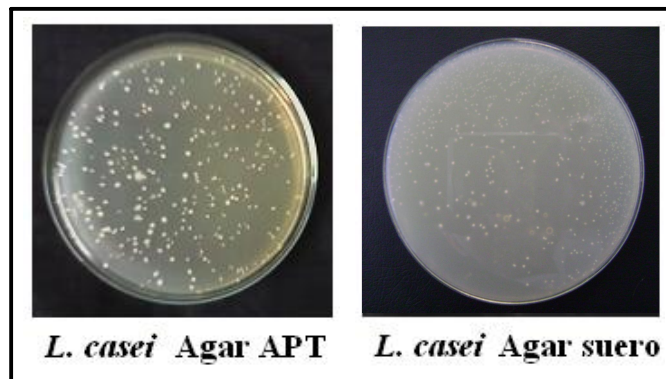


Figura 12. Agar-APT y Agar-Suero clarificado.

En la figura 12 se observa el crecimiento del *L. casei* en Agar-APT y Agar-Suero clarificado, en este último el medio es más opaco debido a los componentes de origen proteico e hidrosolubles que no alcanzaron a ser retirados durante el proceso de clarificado.

Al realizar un crecimiento del microorganismo en ambos agares, las colonias en el agar suero tardan más tiempo en crecer, teniendo un menor tamaño, pero con una morfología similar, como se puede observar en la figura 12. Esto puede deberse muy probablemente a la menor concentración de nutrientes del lacto-suero respecto al agar APT, que es un medio de referencia para el crecimiento de bacteria lácticas. A partir de estos resultados podemos afirmar que el agar suero clarificado producido en

este trabajo, puede servir como opción de crecimiento para bacterias lácticas del tipo *Lactobacillus*, teniendo en cuenta que el tiempo de incubación debe ser mayor. Además este tipo de medio es de fácil realización y de muy bajo costo.

7.6.2. Recuento del *Lactobacillus casei*.

Tabla 3. Conteo de UFC antes y después del proceso de liofilización.

	1 UFC x10 ⁹ / mL	2 UFC x10 ⁹ / mL	Promedio UFC x10 ⁹ / mL	Diferencia UFC x10 ⁹ / mL	% de células viables	% de células muertas
Conteo ANTES de Liofilización	47	49	48	3	100	6
Conteo DESPUÉS de Liofilización	45	45	45		94	

Para hacer un control del proceso de liofilización, se realizó un conteo de UFC antes y después del mismo, obteniéndose una viabilidad del 94% (ver tabla 3) después de 18 días de conservación entre 4 - 9 °C, siendo un porcentaje de supervivencia muy bueno, ya que lo recomendado es entre un 50 – 80% para microorganismos. [1,30]

Con el fin de corroborar la el crecimiento del microorganismo por el método propuesto (UFC/mL Vs Absorbancia), se midió la absorbancia del cultivo a las 69 h de crecimiento antes del proceso de liofilización, dando 5,5225 a 550 nm, este valor se introdujo en la ecuación de la grafica 5b, con el fin de obtener las UFC calculadas. El valor obtenido fue de 46,56 x 10⁹ UFC/mL el cual es muy cercano al obtenido por el otro método de recuento en placa el cual dio un valor de 48 x 10⁹ UFC/mL, lo cual confirma que la

ecuación obtenida durante el trabajo puede servir como un método alternativo y rápido para la cuantificación de células viables, en un cultivo realizado en lacto-suero clarificado.

7.7. Identificación del *Lactobacillus casei*, antes y después del proceso de liofilizado a través del estuche comercial API 50 CH (Biomerieux).



Figura 13. Identificación del *Lactobacillus casei ssp casei* a través del kit API 50CH.

En esta figura se observan algunas reacciones bioquímicas de las cepa de *Lactobacillus casei*, que se realizaron antes (13a) y después (13b) del proceso de liofilización. El cambio de color de rojo a amarillo evidencia una prueba positiva, donde cada pozo de la tira representa una prueba bioquímica. Después de la inoculación de las tiras, se dejaron en incubación por 48 h y se anotaron los resultados obtenidos. Luego se introdujeron estos resultados al software: apiweb atand alone V 1.2.1. El cual permitió evidenciar la presencia de *Lactobacillus casei* antes y después del proceso de liofilización.

CONCLUSIONES

1. Se logró estandarizar un método de cultivo para *L. casei* utilizando como base el suero de leche de ganado vacuno.
2. El lacto-suero clarificado simple sin ninguna adición de glucosa, es viable para la producción de *Lactobacillus casei* y de ácido láctico a escala de laboratorio, obteniéndose con este trabajo 0.9238 g/L y $5,9 \times 10^{10}$ UFC/mL de *L. casei* en un periodo de incubación de 75 horas y una producción de 70,39 g/L de ácido láctico a las 93 horas.
3. Se logró hacer una relación entre las UFC y la absorbancia, obteniendo un buen coeficiente de determinación hasta las 76 horas, facilitando con ello el conteo de *L. casei* mediante lecturas de absorbancia sin necesidad de recurrir al recuento estándar en placa, para crecimientos en lacto-suero clarificados simple bajo las condiciones de este trabajo.
4. Se logró estandarizar un proceso de liofilización para la conservación de los *L. casei* obtenidos a partir de suero de leche de ganado vacuno como medio de cultivo. Se puede concluir que el proceso de liofilización para *lactobacillus casei* utilizando como crioprotector el suero de leche de ganado vacuno es un método adecuado de preservación y crioprotección.

5. Queda comprobado con este trabajo que el lacto-suero simple, puede ser transformado en un recurso aprovechable para la producción bacterias lácticas como el *L. casei* y ácido láctico a muy bajo costo, evitando la contaminación del medio ambiente que este genera.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1]. GONZÁLES, Rosa., et al. (s.f). Aseguramiento de la Calidad en las Colecciones de Cultivos Microbianos. San José de las Lajas, La Habana, Cuba. Recuperado el 23 septiembre de 2007, de <http://www.monografias.com/trabajos-pdf/colecciones-cultivos-microbianos/colecciones-cultivos-microbianos.pdf>
- [2]. Los microorganismos en la industria. Recuperado el 20 de noviembre de 2006, de <http://www.solociencia.com/biologia/microbiologia-microorganismos-industria.htm>
- [3]. VARELA, Gustavo. (s.f). Fisiología y Metabolismo Bacteriano. Recuperado el 3 de diciembre de 2007, de <http://higiene.edu.uy/cefa/Libro2002/Cap%2011.pdf>
- [4]. VARGAS, E. Mauricio, et al. (s.f). Producción de Microorganismos Probióticos como Aditivo para Alimentos Concentrados para Ganado Vacuno (Primera Parte). Departamento de Ingeniería Química, Universidad de los Andes. 166-176 p.
- [5]. RODRÍGUEZ M., José A. (Mayo de 2001). Obtención de Cepas de Lactobacilos, su Caracterización (invitro) como Potenciales Prebióticas. Universidad de los Andes. Mérida, Venezuela.
- [6]. Plásticos. (s.f). Recuperado el 9 de Octubre de 2006, de <http://www.admworld.com/eusp/fuels/plastics.asp>

- [7]. SENTHURAN, A., et al. (1999). Lactic acid production by immobilized *Lactobacillus casei* in recycle batch reactor: a step towards optimization. *Journal of Biotechnology*. **73**, 61 – 70 p.
- [8]. (Diciembre de 2001). Evaluación de medios de cultivo preparados a partir de suero de leche enriquecido, para la producción de ácido láctico, con *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus casei*. *Revista Facultad de Ingeniería Universidad de Antioquia*. **24**. Resuenn recuperado el 12 de Marzo de 2007, de <http://ingenieria.udea.edu.co/grupos/revista/revistas/nro024/contenido.html>
- [9]. URRIBARRÍ, Lauris. (Agosto de 2004). Producción de ácido láctico a partir de suero de leche, utilizando *Lactobacillus helveticus* en cultivo continuo. Universidad del Zulia. Venezuela. *Revista Científica*. **14**, 4.
- [10]. SPREER, Edgar. (1991). *Lactología Industrial*. II edición. Editorial Acribia S.A. Zaragoza, España. 529-530 p.
- [11]. El suero, sus componentes y usos. (s.f). Recuperado el 23 de Octubre de 2006, de <http://www.sian.info.ve/porcinos/publicaciones/viencuent/caballero.htm>

- [12]. KANDLER, O., WEISS N. (1986). Regular, Nonsoring Gram-Positive Rods. En Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 7th. Ed. The Williams and Wilkins Co. Baltimore.
- [13]. Clasificación científica de *Lactobacillus casei*. (s.f). Recuperado el 12 de febrero de 2007, de http://en.wikipedia.org/wiki/Lactobacillus_casei
- [14]. RAYMON, E. Kirk. (1962). Enciclopedia de Tecnología Química. Tomo XI. I Edición. Unión Tipográfica, Ediciones Hispanoamericana, México. 654-655 p.
- [15]. *Lactobacillus casei*. (s.f). Recuperado el 12 de febrero de 2007, de http://genome.jgi-psf.org/draft_microbes/lacca/lacca.home.html
- [16]. ROUKAS, T. y KOTZEKIDOU, P. (1998). Lactic acid production from deproteinized whey by mixed cultures of free and coimmobilized *Lactobacillus casei* and *Lactococcus lactis* cells using fedbatch culture. Enzyme and Microbial Technology. **22**, 199–204 p.
- [17]. BURNAT, Ana., et al. (2002). Alimentos Funcionales. Probióticos. I edición. Editorial Médica Panamericana S.A. España.
- [18]. CASP, A. y Abril. (1999). Procesos de conservación de alimentos. Tecnología de alimentos. Editorial AMV Ediciones y Mundi-Prensa. Madrid. 494 p.

- [19]. RODRÍGUEZ, Lucero Marlene. (2003). Aislamiento, identificación y conservación de cultivos de bacterias lácticas antagonistas de microbiota contaminante de sangre de matadero. Universidad de Girona, España. 31-32 p. ISBN: 84-689-3756-8
- [20]. HA, Mi-Young, et al. (2003). Kinetics Analysis of Growth and Lactic Acid Production in pH-Controlled Batch Cultures of *Lactobacillus casei* KH- 1 Using Yeast Extract/Corn Steep Liquor/Glucose Medium. *Journal Of Bioscience And Bioengineering*. **96**, 2. 134- 140 p.
- [21]. DING, S. TAN, T. (2006). L-lactic acid production by *Lactobacillus casei* fermentation using different fed-batch feeding strategies. *Process Biochemistry*. Beijing University of Chemical Technology. Beijing, China. **41**, 1451–1454 p.
- [22]. MALIK, K. A. (1995). A miniaturized method for Freeze-Drying of microorganisms in glass capillary tubes. *Journal of Microbiological Methods* **21**, 75-82 p.
- [23]. JIMÉNEZ G., Diana Patricia. (s.f). *Formulación, Elaboración y Preservación de Quesos*. Universidad del Quindío. Facultad de Ciencias Agroindustriales. Planta Piloto de Alimentos.
- [24]. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (A.O.A.C) “Official Methods of Analysis”. 16th Ed. 3rd Revision. 1997.

- [25]. GIRALDO, German. (2007). Información personal. Universidad del Quindío. Armenia.
- [26]. CASTILLO T., JORGE L. (s.f). Fermentación ácido láctica (Sauerkraut – Encurtidos). Recuperado el 13 de septiembre de 2006, de <http://www.monografias.com/trabajos15/fermentacionacido lactica/fermentacion-acidolactica.shtml>
- [27]. CAYRÉ, María E., et al. (2007). Selección de un Modelo Primario para Describir la Curva de Crecimiento de Bacterias Lácticas y *Brochothrix thermosphacta* sobre Emulsiones Cárnicas Cocidas. Universidad Nacional del Nordeste. Tucumán, Argentina. Información Tecnológica. 18, 3. 23 – 29 p.
- [28]. BERENSON, Mark L., LEVINE David M. (1983). Estadística para Administración y economía. Editorial Interamericana. México, D.F. 482 p.
- [29]. BORREGO, Sofía., et al. (2001). Comportamiento de tres mutantes de micobacterias productoras de precursores esteroides conservadas por liofilización durante 10 años. Biotecnología Aplicada. 18, 85-87 p.
- [30]. GARCÍA LÓPEZ, María Dolores., URUBURU FERNÁNDEZ, Federico. (s.f). la conservación de cepas microbianas. Universidad de

Valencia. Recuperado el 5 noviembre de 2007, de <http://catedras.quimica.unlp.edu.ar/ingenieriabioquimicaIyII/seminario3.doc>

- [31]. SELECCION, MANTENIMIENTO Y MEJORAMIENTO DE MICROORGANISMOS DE INTERES INDUSTRIAL. (s.f). Capitulo 3. Recuperado el 28 de agosto de 2007, de http://www.science.oas.org/Simibio/mbio_ind/cap3_mie.pdf
- [32]. BERNAL DE R, Inés. (1993). Análisis de alimentos. Editorial Guadalupe Ltda. Santafé de Bogotá. Colombia.
- [33]. Bibliografía: CASADO CIMIANO, Pedro. Guía para el Análisis Químico de la Leche y los Derivados Lácteos. Ediciones Ayala y Revista ILE. Madrid, España. 1991. 79-85 p.

ANEXOS

ANEXO 1:

PROTEÍNA TOTAL. Método Kjeldahl-Gunning-Arnold.

Adaptado griffin 1955. [32]

Reactivos:

- *Mezcla sulfato selenio:* mezclar 18,77 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 900 g K_2SO_4 y 0,4 g de Selenio finamente pulverizado
- *Ácido bórico al 4%:* Disolver 40 g de H_3BO_3 en agua caliente si es necesario. Enfriar y completar a 1 000 mL.
- *Indicador de Tashiro:* mezclar 25 mL de solución alcohólica de azul de metileno al 0,05% y 25 mL de solución al 0,1 % de rojo de metilo.
- Ácido sulfúrico comercial.
- Hidróxido de sodio (NaOH al 40%).
- Ácido clorhídrico 0,01 N estándar.

Determinación micro:

- a. *Digestión:* pesar 0,03 g de muestra y pasar a un balón Kjeldahl de 50 a 100 mL, agregar 0,1 g de mezcla de sulfatos y 2,0 mL de H₂SO₄ concentrado, y poner en digestión en los digestores Kjeldahl hasta que aclare completamente (color verde claro).

- b. *Destilación:* llevar la muestra al micro-Kjeldahl y adicionar 5,0 mL de NaOH al 40% y perlas de vidrio. Llevar a ebullición y recibir el destilado en un erlenmeyer que contiene 10 mL de ácido bórico y unas gotas de indicador de Tashiro, hasta cambio de color a morado.
 - Retirar el balón con el borato de amonio.

 - Retirar el calor sin desconectar el equipo. Por enfriamiento el agua de lavado subirá hasta el balón permitiendo mantener limpio el equipo de destilación.

- c. *Titulación:* titular el borato de amonio con solución 0,01 N de HCl estándar.

d. *Cálculos:*

$$\%N = \frac{(\text{mL HCl}_m \cdot N \text{ HCl}_m) - (\text{mL HCl}_{bl} \cdot N \text{ HCl}_{bl}) \cdot 0,014 \cdot 100}{\text{g de muestra}}$$

HCl_m: Ácido clorhídrico utilizado para titular la muestra.

HCl_{bl}: Ácido clorhídrico utilizado para titular el blanco.

$$\% \text{ Proteína} = \%N \times 6,38$$

ANEXO 2:

44.1.23. (959.11). MÉTODO MICRO SHAFFER-SOMOGYI PARA DETERMINACIÓN DE AZUCARES. ADAPTADO [24]

A. Reactivos

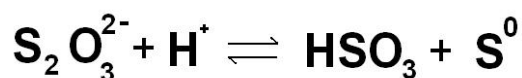
(a) *Carbonato 50*. — Disolver 25 g de Na_2CO_3 anhidro y 25 g tartrato de sodio y potasio. $4\text{H}_2\text{O}$ (sal de Rochelle) en 500 mL H_2O . Adicionar con agitación 75 mL de solución de 100 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}/\text{L}$, a través de un embudo, con su extremo bajo la superficie del líquido, para evitar pérdidas de CO_2 , y mientras la solución está en agitación. Se añade 20 g de NaHCO_3 , se disuelve y se añade 5 g de KI. Transferir la solución a un frasco aforado de 1L, adicionar 250 mL de 0,100 N de KIO_3 (3,356 g/L), diluir al volumen filtrar y transferir a un frasco de vidrio. Dejar en reposo la noche antes de su uso.

(b) *Solución de oxalato - yoduro*. — Disolver 2.5 g KI y 2.5 g $\text{K}_2\text{C}_2\text{O}_4$ en H_2O destilada y se afora a 100 mL. Preparar disolución fresca semanalmente.

(c) *Solución de tiosulfato de sodio*. — 0.1N. Disolver 25 g de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ en 1L de agua destilada y calentar lentamente durante 5 min, adicionar a la solución, poco después, 0,1 g de Na_2CO_3^* y 3 gotas de cloroformo y transferir caliente a la botella de almacenamiento

previamente limpiada con mezcla sulfocromica ($K_2Cr_2O_7$ al 2% en H_2SO_4 del 98%) caliente y enjuagado con agua destilada caliente. Dejar la solución en reposo en un lugar oscuro durante un día antes de estandarizar. Puede ser necesario filtrarse esta solución antes de estandarizarla, si después del periodo recomendado existiesen sólidos en su interior.

*Las soluciones de tiosulfato preparadas con agua destilada común pueden sufrir una reacción lenta con los iones provenientes de la auto-ionización del agua, produciendo azufre y iones bisulfito:



La formación de estos productos también puede ser resultado de la acción bacteriana, especialmente si la solución está durante mucho tiempo en reposo. Como ambos procesos son minimizados en el intervalo de pH entre 9 y 10, se recomienda la adición de una pequeña cantidad de carbonato de sodio a la solución preparada recientemente.

Además, también debe evitarse su exposición a la luz, porque bajo estas condiciones ocurre un aumento en la velocidad de la reacción de descomposición del tiosulfato.

(d) Solución estandar de *tiosulfato*. — 0.005N. Se prepara desde la solución de tiosulfato estandar 0.1N.

(e) *Indicador de Almidon.* — Disolver 2.5 g de almidón soluble y 10 mg de HgI_2 en 500 mL de H_2O hirviendo. Tras enfriar, se afora a 1 Litro con H_2O destilada.

B. Determinación.

- Se toma alícuotas de 5,0 mL de la solución problema en tubos Pyrex de 25 x 200 mm.
- Se adicionará a cada tubo 5,0 mL de reactivo de carbonato 50 (*a*) y se mezclarán bien por agitación. Se prepara un blanco utilizando 5,0 mL de agua destilada y 5,0 mL de reactivo de carbonato 50.
- Se colocan los tubos tapados en un baño de agua hirviendo el tiempo adecuado según el azúcar que se vaya a determinar (Ver tabla 950.57).
- A continuación, se retiran los tubos con cuidado y se colocan en agua fría durante 4 minutos.
- Se destapan y se añade a cada tubo 2,0 mL de la disolución de(KI- $\text{K}_2\text{C}_2\text{O}_4$) oxalato-yoduro (*b*) y seguidamente 3,0 mL de ácido sulfúrico 2 N (56 mL/L). (no agitar las disoluciones hasta después de añadir el ácido sulfúrico). Se mezcla bien para asegurarse de que todo el Cu_2O

se disuelve, se tapa y se deja reposar en agua fría durante 5 minutos agitando dos veces durante todo este tiempo.

- Se valora con tiosulfato sódico 0,005 N (*d*), utilizando la solución indicadora de almidón (*e*) para determinar el punto final. Se resta la valoración de los tubos problema de la de los blancos.
- Para saber la concentración (mg/mL) de glucosa utilizamos tabla 959.11, o utilizamos las ecuaciones de la tabla 950.57 para otros azúcares, dividiendo el valor de “y” calculado por el volumen de la alícuota de muestra utilizada.

Tabla 959.11 Shaffer-Somogyi Equivalentes Glucosa-Tiosulfato

mg glucosa = (0.1099) (mL 0.005 N Na ₂ S ₂ O ₃) + 0.048										
mL de Tiosulfato 0.005 N										
mL										
0.005 N	0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9
Na ₂ S ₂ O ₃	mg Glucosa en 5 mL of Solución									
3	0.378	0.389	0.400	0.411	0.422	0.432	0.444	0.455	0.466	0.477
4	0.488	0.499	0.510	0.521	0.532	0.543	0.554	0.565	0.576	0.587
5	0.598	0.608	0.619	0.630	0.641	0.652	0.663	0.674	0.685	0.696
6	0.707	0.718	0.729	0.740	0.751	0.762	0.773	0.784	0.795	0.806
7	0.817	0.828	0.839	0.850	0.861	0.872	0.883	0.894	0.905	0.916
8	0.927	0.938	0.949	0.960	0.971	0.982	0.993	1.004	1.015	1.026
9	1.037	1.048	1.059	1.070	1.081	1.092	1.103	1.114	1.125	1.136
10	1.147	1.158	1.169	1.180	1.191	1.202	1.213	1.224	1.235	1.246
11	1.257	1.268	1.279	1.290	1.301	1.312	1.323	1.334	1.345	1.356
12	1.367	1.378	1.389	1.400	1.411	1.422	1.433	1.444	1.455	1.466
13	1.477	1.488	1.499	1.510	1.521	1.532	1.543	1.554	1.565	1.576
14	1.587	1.598	1.609	1.620	1.631	1.642	1.653	1.664	1.675	1.686
15	1.697	1.707	1.718	1.729	1.740	1.751	1.762	1.773	1.784	1.795
16	1.806	1.817	1.828	1.839	1.850	1.861	1.872	1.883	1.894	1.905
17	1.916	1.927	1.938	1.949	1.960	1.971	1.982	1.993	2.004	2.015
18	2.026	2.037	2.048	2.059	2.070	2.081	2.092	2.103	2.114	2.125
19	2.136	2.147	2.158	2.169	2.180	2.191	2.202	2.213	2.224	2.235
20	2.246	2.257	2.268	2.279	2.290	2.301	2.312	2.323	2.334	2.345
21	2.356	2.367	2.378	2.389	2.400	2.411	2.422	2.433	2.444	2.455
22	2.466	2.477	2.488	2.499	2.510	2.521	2.532	2.543	2.554	2.565

J. Biol. Chem. 100, 695(1933); 160, 61(1945); JAOAC 42, 341(1959); 43, 645(1960)

44.1.28. (950.57)

ARABINOSA, GALACTOSA, XYLOSA Y OTROS AZÚCARES.

Proceder como en 959.11B (Ver 44.1.23), usando apropiadamente el tiempo de calentamiento y la ecuación para calcular con la tabla 950.57. Hacer determinaciones control con muestras conocidas de azúcares y aplicar las correcciones para cualquier desviación de las ecuaciones.

**Tabla. 950.57 MÉTODO DE SHAFFER-SOMOGYI:
EQUIVALENTES DE AZÚCAR-TIOSULFATO
(y = mg azúcar en 5 mL; x = mL 0,005 N Na₂S₂O₃)**

Azúcar	Tiempo de Calentamiento (min)	Ecuación
L-Arabinosa	30	$y = 0,1234x + 0,060$
Fructosa	15	$y = 0,1113x + 0,079$
D-Galactosa	30	$y = 0,1332x + 0,033$
Glucosa	15	$y = 0,1099x + 0,048$
Lactosa	35	$y = 0,2031x + 0,030$
Maltosa	30	$y = 0,2199x + 0,072$
D-Manosa	35	$y = 0,1148x + 0,084$
D-Ribosa	25	$y = 0,1381x + 0,098$
L-Sorbosa	15	$y = 0,1244x + 0,116$
D-Xilosa	30	$y = 0,1103x + 0,044$

ANEXO 3:

DETERMINACIÓN DE LA ACIDEZ EXPRESADA EN ÁCIDO LÁCTICO. [32]

Acidez total: está constituida por ácidos orgánicos fijos (tartárico, málico, láctico y succínico) y ácidos volátiles (acético, fórmico, butírico y propiónico). El ácido carbónico se debe eliminar antes de efectuar la valoración de la acidez total. (A.O.A.C 11.042/84. 962.12/90 Adaptado).

Pasar unos 200 cm³ de agua recientemente hervida y neutralizada (destilada), a una cápsula de porcelana o a un erlenmeyer; agregar 10 cm³ de muestra.

Titular en caliente con solución estándar 0,05 N de hidróxido de sodio (NaOH) en presencia de fenofltaleina (al 1% en etanol de 96°). Anotar el volumen gastado. Calentar la solución de muestra hasta cerca del punto de ebullición. Si hay anhídrido carbónico, desaparece el color rosado. Continuar la titulación hasta obtener el punto final verdadero. Expresar los resultados en porcentaje de ácido láctico.

1 cm³ de NaOH 0,05 N = 0,045 g de ácido láctico.

Acidez fija: puede determinarse por acidimetría, después de eliminar por evaporación los ácidos volátiles. *Por diferencia entre la acidez total y la fija se obtiene la acidez volátil.*

Medir 50 mL de muestra y pasarlos a una cápsula de porcelana; evaporar hasta sequedad en baño maría; agregar unos 20 mL de agua destilada neutralizada y volver a evaporar; repetir dos veces más la operación para asegurarse de la eliminación completa de los ácidos volátiles. Disolver el residuo en unos 100 cm³ de agua y titular la acidez fija con solución 0,05 N de hidróxido de sodio (NaOH) en presencia de fenolftaleína. Calcular la acidez fija en porcentaje de ácido tartárico o láctico. Según el caso obtener por diferencia la acidez volátil (Propuesto en el laboratorio de análisis aplicado. Departamento de Química U. N.).

ANEXO 4:

DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE GRASAS MEDIANTE EL EQUIPO Det – Grass marca P-selecta.

GRASAS (PRE-EXTRACCIÓN E HIDRÓLISIS)

Muestra: Tomar aproximadamente 3.0000 mL de suero de leche (W_1).

Pre-extracción:

Peso del beaker limpio y seco:	W_0
Tiempo de ebullición:	30 minutos.
Tiempo de extracción:	45 minutos.
Tiempo de evaporación:	10 minutos.
Peso del beaker con la muestra:	W_2
Para calcular la grasa:	$G_1 = (W_2 - W_0)/W_1$

Hidrólisis:

Extraer la muestra de cada cartucho y pesar.

Peso de cada muestra: W_{11}

Llevar a cabo una hidrólisis de acuerdo al siguiente procedimiento:

- Pesar aproximadamente 3.0000 g de la muestra del proceso de pre-extracción.
- Depositar la muestra en un matraz erlenmeyer.
- Adicionar 100 mL de HCl 3 N y núcleos de ebullición al matraz.
- Colocar el matraz sobre una plancha de calentamiento en campana de extracción.
- Llevar a ebullición lentamente.
- Mantener la ebullición lenta por una hora.
- Remover y dejar enfriar a temperatura ambiente.
- Preparar 6 embudos buchner con papel filtro.
- Verter el contenido del matraz erlenmeyer dentro del embudo y luego filtrar a vacío.
- Adicionar agua destilada caliente, aproximadamente a 60 °C a cada matraz erlenmeyer y agitar para desengrasar las paredes y verterla dentro del embudo.

- Repetir la operación varias veces hasta que el matraz esté totalmente limpio.
- Continuar adicionando agua caliente al embudo hasta que el líquido esté claro ($\text{pH} \approx 7$).
- Cuidadosamente retirar el papel filtro y colocarlo en el cartucho de extracción.
- Secar en un horno a $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 1 – 2 horas antes de pasarlo al extractor.

Peso de los beakers limpios y secos: W_{00}

Tiempo de ebullición: 40 minutos.

Tiempo de extracción: 60 minutos.

Tiempo de evaporación: 10 minutos.

Peso de los beakers con la muestra: W_{22}

Para calcular la grasa: $G_2 = (W_{22} - W_{00})/W_{11}$

Contenido de grasa total: $G_T = G_1 + G_2$

ANEXO 5:

DETERMINACIÓN DE GRASAS POR EL MÉTODO BUTIROMÉTRICO DE GERBER. [33]

1. Principio

Un volumen determinado de la muestra es tratado en el butirómetro con ácido sulfúrico y alcohol amílico. El ácido sulfúrico disuelve las proteínas y el alcohol isoamílico facilita la separación de la grasa.

Mediante centrifugación la grasa es separada en el vástago graduado del butirómetro, en donde es leído directamente el contenido de materia grasa.

2. Reactivos

- Ácido sulfúrico: Deberá tener una densidad a 20 °C de $1,815 \pm 0,002$ g/mL, que equivale a un peso específico 15/15 °C de 1,820 – 1,825 y corresponde a un contenido en ácido sulfúrico del 90 – 91 por 100 (m/m). Deberá ser incoloro y exento de impurezas que afecten la determinación.
- Alcohol isoamílico: Deberá ser transparente e incoloro, con una densidad a 20 °C de 0,080 – 0,818 g/mL.

3. Materiales

- Pipeta para la leche: Pipeta clásica de Gerber de 11 mL.
- Butirómetros y tapones.
- Baño de agua: Que permita mantener a los butirómetros en posición vertical y con las escalas totalmente sumergidas a una temperatura de 65 ± 2 °C.
- Centrífuga: En la que puedan colocarse los butirómetros y capaz de ejercer, una vez cargada, en dos minutos una aceleración centrípeta de 350 ± 50 g en el extremo del tapón del butirómetro.

4. Preparación de la muestra

Atemperar la muestra a 20 ± 2 °C y mezclar el suero cuidadosamente invirtiendo repetidamente el recipiente que lo contiene o mediante trasvases sucesivos, evitando la formación de espuma o el batido de la grasa.

5. Procedimiento

- Adicionar 10 mL de ácido sulfúrico en el butirómetro. No mojar el cuello del butirómetro con el ácido.

- Verter 1 mL de la muestra de suero con la pipeta de Gerber. Nota: adicionar lentamente para evitar la mezcla del ácido sulfúrico con la muestra.
- Verter 1 mL de alcohol isoamílico en el tubo de Gerber.
- Se cierra el tubo con el tapón y se agita vigorosamente sin interrupción y sin invertirlo, hasta que la muestra y el sulfúrico se mezclen y la proteínas se disuelvan. Después se invierte el butirómetro unas pocas veces para mezclar completamente el contenido, y finalmente se agita de nuevo unas pocas veces suavemente.
- Se coloca inmediatamente el butirómetro en el baño María a 65 ± 2 °C durante 5 minutos con el tapón para abajo.
- Retirar el butirómetro del baño María, secarlos con un trapo e introducirlos en la centrífuga. Poner la centrífuga al requerido número de revoluciones en 2 minutos y mantenerse esta velocidad durante 3 minutos más.
- Retirar el butirómetro de la centrífuga y leer en la columna la fase de grasa.

ANEXO 6:

AISLAMIENTO POR DILUCIÓN EN MASA O RECuento ESTANDAR EN PLACA.

Este tipo de técnica se utiliza para realizar recuento de microorganismos vivos en análisis de alimentos.

Técnica:

1. Hacer diluciones de la muestra o el cultivo.
2. Tomar cajas de petri estéril por duplicado en cada dilución y marcar cada una de ellas.
3. Adicionar 1,0 mL de la dilución en la caja de petri estéril correspondiente.
4. Agregar \pm 15 mL de agar APT líquido **atemperado** a \pm 45 °C.
5. Mezclar las cajas con movimientos cuidadosos, como sigue:
 - Moviendo la caja de arriba hacia abajo.

- Rotando la caja haciendo círculos 5 veces en el sentido de las agujas del reloj.
 - Moviendo la caja 5 veces haciendo ángulos rectos.
 - Rotando la caja haciendo círculos 5 veces en sentido contrario de las agujas del reloj.
6. Dejar solidificar el agar y agregar una capa adicional de agar. Dejar solidificar.
 7. Invertir las cajas e incubar a 37 °C durante 48 horas en microarofilia y colocar una caja con medio sin inocular e incubarla con las demás.
 8. Realizar conteo de UFC.

ANEXO 7:

MEDICIÓN DE CRECIMIENTO CELULAR MEDIANTE PESO SECO DE LAS MUESTRAS (g células/L): [4]

- Centrifugar 20 mL a 3 000 rpm durante 20 min. (Garantizando que el cultivo se encuentre en su fase exponencial de crecimiento).
- El sobrenadante se guarda para análisis.
- El precipitado es lavado con agua destilada para una segunda centrifugación de 10 min a la misma velocidad.
- Luego las muestras son secadas, primero a 110 °C durante 3 horas.
- Posteriormente a temperatura ambiente en un desecador durante 12 horas.
- Pesar la muestra seca.
- Determinar los gramos de microorganismos/mililitro de medio.