

**PRODUCCIÓN DE BIOMASA DE *Lactobacillus casei subsp. rhamnosus*
EMPLEANDO DIFERENTES TIPOS DE SUSTRATOS.**

**BERTHA VIVIANA RUALES GUZMÁN
VLADIMIR ERNESTO VALLEJO CASTILLO**

**UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL
INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL
SAN JUAN DE PASTO
2007**

**PRODUCCIÓN DE BIOMASA DE *Lactobacillus casei subsp. rhamnosus*
EMPLEANDO DIFERENTES TIPOS DE SUSTRATOS.**

**BERTHA VIVIANA RUALES GUZMÁN
VLADIMIR ERNESTO VALLEJO CASTILLO**

**ASESOR
OSCAR BURBANO
Biólogo con énfasis en Microbiología Industrial**

**COASESOR
MILENA GUERRERO
Msc. Ciencias Microbiología**

**UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL
INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL
SAN JUAN DE PASTO
2007**

Nota de aceptación.

JAQUELINE MENA HUERTAS
Jurado

ALVARO CORNEJO PERDOMO
Jurado

OSCAR BURBANO
Asesor

MILENA GUERRERO
Coasesor

San Juan de Pasto, Junio de 2007

PAGINA DE RESPONSABILIDAD DE LOS AUTORES

“Las ideas y conclusiones aportadas en el presente trabajo de grado son responsabilidad exclusiva de sus autores”

Artículo 1° del acuerdo N°. 324 del 11 de Octubre de 1996, emanado del honorable Consejo Directivo de la Universidad de Nariño.

DEDICATORIA

A Dios por estar siempre a mi lado.

A mi madre Carmen Guzmán por su fortaleza y gran amor

A mis hermanas Mary, Magaly y Leidy por su apoyo incondicional.

A Vladimir por su gran Trabajo y Paciencia.

VIVIANA RUALES GUZMAN

DEDICATORIA

A Dios por ser mi Fortaleza y Dar-me Aliento para Continuar.

A Mi Madre Alba Lidia Castillo Astaiza, a Mi Padre Félix Maria Vallejo Pazmiño, a Mis Hermanos David, Camilo, Adrian, y a Mi Cuñada Nancy por su Amor y Apoyo Incondicional.

A Luz Dary por su Amor y apoyo para finalizar este proyecto.

A Mi Compañera de Tesis por su gran Trabajo y Paciencia.

VLADIMIR VALLEJO CASTILLO

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan su agradecimiento a:

Oscar Burbano, Biólogo con énfasis en Microbiología Industrial. Profesor Departamento de Biología de la Universidad de Nariño.

Milena Guerrero, M.Sc. Ciencias Microbiología. Profesora Departamento de Biología de la Universidad de Nariño.

Jaqueline Mena Huertas, M.Sc. Profesora Departamento de Biología de la Universidad de Nariño.

Álvaro Cornejo Perdomo, Ingeniero Químico, Profesor Facultad de Ingeniería Agroindustrial Universidad de Nariño.

Guido Villota, Biólogo con énfasis en Microbiología Industrial, asistente del laboratorio de microbiología de la Universidad de Nariño.

Álvaro Pazos. M.Sc. Microbiología, Profesor Departamento de Biología de la Universidad de Nariño.

Sección de laboratorios de la Universidad de Nariño

A toda esa gente.... que de una u otra forma ayudaron al desarrollo de esta investigación.

TABLA DE CONTENIDO

	pág.
INTRODUCCIÓN	24
1. IDENTIFICACIÓN Y ESTADO ACTUAL DEL PROBLEMA	25
2. DEFINICIÓN DEL PROBLEMA	27
3. JUSTIFICACIÓN E IMPORTANCIA	28
4. OBJETIVOS	30
4.1 OBJETIVO GENERAL	30
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	30
5. MARCO REFERENCIAL	31
5.1 BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS	31
5.1.1 Microbiota intestinal.	31
5.1.2 El epitelio y la mucosidad.	32
5.1.3 Inmunidad específica y no específica.	32
5.2 CARACTERÍSTICAS FISIOLÓGICAS Y MORFOLÓGICAS DE LAS BACTERIAS LÁCTICAS	32
5.3 METABOLISMO DE LAS BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS	32
5.3.1 Homofermentación.	32
5.3.2 Heterofermentación.	34
5.4 CLASIFICACIÓN DE LAS BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS	34
5.4.1 <i>Lactobacillus</i> .	34
5.4.1.1 <i>Lactobacillus casei</i> .	35
5.4.1.1.1 <i>Lactobacillus casei subsp. rhamnosus</i> .	36

5.5 PROPIEDADES ANTIMICROBIANAS DE LAS BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS	36
5.5.1 Peroxido de hidrogeno H ₂ O ₂ .	36
5.5.2 Diacetil.	37
5.5.3 Ácido Láctico.	37
5.5.4 Bacteriocinas.	37
5.6 PROBIÓTICOS – PREBIÓTICOS – SIMBIÓTICOS	38
5.6.1 Probióticos.	38
5.6.1.1 Historia de los Probióticos.	39
5.6.1.2 Probióticos más estudiados.	39
5.6.1.3 Efectos de los probióticos en la salud.	40
5.6.1.3.1 Diarrea.	40
5.6.1.3.2 Antibióticos.	40
5.6.1.3.3 Síndrome del Intestino irritable.	40
5.6.1.3.4 Intolerancia de lactosa.	40
5.6.1.4 Probióticos en productos alimenticios.	41
5.6.2 Prebióticos.	41
5.6.3 Simbióticos.	41
5.7 SUSTRATOS PARA LA FERMENTACIÓN INDUSTRIAL	42
5.7.1 Macronutrientes.	42
5.7.1.1 Sustratos utilizados como fuente de carbono.	43
5.7.1.2 Sustratos utilizados como fuente de nitrógeno.	43
5.7.2 Micronutrientes o elementos trazas.	46
5.8 CRECIMIENTO MICROBIANO.	46

5.8.1 Estequiometría del crecimiento microbiano.	47
5.8.2 Cinética de crecimiento	47
5.9 PERIODO DE VIDA ÚTIL	49
5.10 INGREDIENTES Y ADITIVOS QUE PUEDEN EMPLEARSE EN LA LECHE FERMENTADA	51
6. DISEÑO METODOLÓGICO	52
6.1 FASE I	52
6.1.1 Activación y conservación de <i>Lactobacillus casei subsp. rhamnosus</i> .	52
6.1.2 Cultivo del Inóculo.	52
6.2 FASE II	54
6.2.1 Fermentación.	54
6.3 FASE III	55
6.3.1 Composición de los Sustratos.	55
6.3.2 Diseño experimental.	56
6.4 FASE IV	57
7. PRESENTACION Y DISCUSION DE RESULTADOS	59
7.1 FASE I	59
7.1.1 Activación y conservación de <i>Lactobacillus casei subsp. rhamnosus</i> .	59
7.2 FASE II	63
7.3 FASE III	67
7.3.1 Diseño experimental preliminar.	67
7.3.2 Diseño experimental final.	72
7.3.2.1 Diseño experimental final-Leche en polvo, medio control.	72
7.3.2.2 Diseño experimental final-Leche Pasteurizada, medio 1.	79

7.3.2.3 Diseño experimental final-Leche soya, medio 2.	87
7.3.2.4 Diseño experimental final-Suero, medio 3.	95
7.4 FASE IV	104
7.4.1 Parámetros de fermentación sustrato óptimo.	104
7.4.2 Seguimiento del producto en vida de anaquel.	108
8. CONCLUSIONES	110
9. RECOMENDACIONES	112
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	113
ANEXOS	118

LISTA DE CUADROS

	pág.
Cuadro 1. Bacteriocinas producidas por bacteria ácido lácticas.	38
Cuadro 2. Cepas de <i>Lactobacillus</i> probióticos que se han estudiado completamente <i>in vitro</i> y en humanos	39
Cuadro 3. Composición general de la leche de vaca.	44
Cuadro 4. Composición general del suero lácteo.	45
Cuadro 5. Periodo de vida útil.	50
Cuadro 6. Ingredientes y aditivos que pueden emplearse en la leche fermentada.	51
Cuadro 7. Ensayos para estandarización del Inóculo.	53
Cuadro 8. Composición de los sustratos.	55
Cuadro 9. Composición porcentual de las fuentes de nitrógeno.	56
Cuadro 10. Características Fisicoquímicas del yogur.	58
Cuadro 11. Características Microbiológicas del yogur.	58
Cuadro 12. Muestra de cálculos para la determinación de las constantes cinéticas inóculo 1.	61
Cuadro 13. Constantes de crecimiento para la estandarización del Inóculo.	61
Cuadro 14. Niveles y factores experimentales.	68
Cuadro 15. Composición de los ensayos para la optimización del sustrato por 1 L.	68
Cuadro 16. Niveles y factores experimentales, medio control.	72
Cuadro 17. Composición de los ensayos para la optimización del sustrato por 1 L, medio control.	72
Cuadro 18. Niveles y factores experimentales, medio 1.	79

Cuadro 19. Composición de los ensayos para la optimización del sustrato por 1 L, medio 1.	80
Cuadro 20. Niveles y factores experimentales, medio 2.	87
Cuadro 21. Composición de los ensayos para la optimización del sustrato por 1 L, medio 2.	87
Cuadro 22. Niveles y factores experimentales, medio 3.	95
Cuadro 23. Composición de los ensayos para la optimización del sustrato por 1 L, medio 3.	95
Cuadro 24. Composiciones y respuestas finales de los 4 sustratos evaluados.	103
Cuadro 25. Determinación del mejor sustratos fermentado.	103
Cuadro 26. Seguimiento del producto en vida de anaquel.	109

LISTA DE TABLAS

	pág.
Tabla 1. Descripción del diseño experimental preliminar.	68
Tabla 2. Respuesta optima para la biomasa (Bact/mL).	71
Tabla 3. Respuesta optima para la biomasa (Bact/mL), medio control.	74
Tabla 4. Respuesta optima para el análisis sensorial, medio control.	75
Tabla 5. Respuesta optima para el análisis económico (\$), medio control.	77
Tabla 6. Optimización de respuestas múltiples para el medio control.	77
Tabla 7. Optimización de la conveniencia para el medio control.	79
Tabla 8. Respuesta optima para la biomasa (Bact/mL), medio 1.	82
Tabla 9. Respuesta optima para el análisis sensorial, medio 1.	83
Tabla 10. Respuesta optima para el análisis económico (\$), medio 1.	85
Tabla 11. Optimización de respuestas múltiples para el medio 1.	85
Tabla 12. Optimización de la conveniencia para el medio 1.	87
Tabla 13. Respuesta optima para la biomasa (Bact/mL), medio 2.	89
Tabla 14. Respuesta optima para el análisis sensorial, medio 2.	91
Tabla 15. Respuesta optima para el análisis económico (\$), medio 2.	93
Tabla 16. Optimización de respuestas múltiples para el medio 2.	93
Tabla 17. Optimización de la conveniencia para el medio 2.	94
Tabla 18. Respuesta optima para la biomasa (Bact/mL), medio 3.	97
Tabla 19. Respuesta optima para el análisis sensorial.	99
Tabla 20. Respuesta optima para el análisis económico (\$), medio 3.	100

Tabla 21. Optimización de respuestas múltiples para el medio 3.	101
Tabla 22. Optimización de la conveniencia para el medio 3.	102

LISTA DE GRAFICAS

	pág.
Grafica 1. Constantes cinéticas para el Inóculo 1 para <i>Lactobacillus casei subsp. rhamnosus</i> .	61
Grafica 2. Estandarización del Inóculo para <i>Lactobacillus casei subsp. rhamnosus</i> .	62
Grafica 3. Producción de proteínas de <i>Lactobacillus casei subsp. rhamnosus</i> en el medio miel de panela-leche en polvo.	63
Grafica 4. Formación de biomasa UFC/mL y Bact/mL de <i>Lactobacillus casei subsp. rhamnosus</i> en el medio miel de panela-leche en polvo.	64
Grafica 5. Consumo de azúcares totales y producción de ácido láctico por <i>Lactobacillus casei subsp. rhamnosus</i> en el medio miel de panela-leche en polvo.	65
Grafica 6. Cambios de pH de <i>Lactobacillus casei subsp. rhamnosus</i> en el medio miel de panela-leche en polvo	67
Grafica 7. Diagrama de Pareto para la biomasa (UFC/mL).	69
Grafica 8. Análisis de diagramas inicial para el medio control.	70
Grafica 9. Análisis de diagramas final para biomasa, medio control.	73
Grafica 10. Análisis de diagramas para la respuesta sensorial, medio control.	74
Grafica 11. Análisis de diagramas para la respuesta económico, medio control.	76
Grafica 12. Superficie de respuesta múltiple para leche en polvo.	78
Grafica 13. Contornos estimados para superficie de respuesta múltiple para leche en polvo.	78
Grafica 14. Análisis de diagramas para la biomasa (Bact/mL), medio 1.	80
Grafica 15. Análisis de diagramas para la respuesta sensorial, medio 1.	82
Grafica 16. Análisis de diagramas para la respuesta económico, medio 1.	83
Grafica 17. Superficie de respuesta múltiple para el medio 1.	86

Grafica 18. Contornos estimados para superficie de respuesta múltiple para el medio 1.	86
Grafica 19. Análisis de diagramas para la biomasa (Bact/mL), medio 2.	88
Grafica 20. Análisis de diagramas para la respuesta sensorial, medio 2.	90
Grafica 21. Análisis de diagramas para la respuesta económico, medio 2.	91
Grafica 22. Superficie de respuesta múltiple para el medio 2.	93
Grafica 23. Contornos estimados para superficie de respuesta múltiple para el medio 2.	94
Grafica 24. Análisis de diagramas para la biomasa (Bact/mL), medio 3.	96
Grafica 25. Análisis de diagramas para la respuesta sensorial, medio 3.	97
Grafica 26. Análisis de diagramas para la respuesta económico, medio 3.	99
Grafica 27. Superficie de respuesta múltiple para el medio 3.	101
Grafica 28. Contornos estimados para superficie de respuesta múltiple para el medio 3.	102
Grafica 29. Producción de proteínas de <i>Lactobacillus casei subsp. rhamnosus</i> en el medio miel de panela-suero.	104
Grafica 30. Formación de biomasa (Bact/mL) de <i>Lactobacillus casei subsp. rhamnosus</i> en el medio miel de panela-suero	105
Grafica 31. Cinética de crecimiento para el <i>Lactobacillus casei subsp. rhamnosus</i> en el medio miel de panela-suero.	106
Grafica 32. Consumo de azúcares totales y producción de ácido láctico por <i>Lactobacillus casei subsp. rhamnosus</i> en el medio miel de panela-suero.	107
Grafica 33. Cambios de pH en el medio miel de panela-suero fermentado con <i>Lactobacillus casei subsp. rhamnosus</i>	108

LISTA DE FIGURAS

	pág.
Figura 1. Escala hedónica verbal y grafica de 5 puntos.	57
Figura 2. Morfología macroscópica de <i>Lactobacillus casei subsp. rhamnosus</i> , en medio MRS modificado con azul de anilina.	59
Figura 3. Morfología microscópica de <i>Lactobacillus casei subsp. rhamnosus</i> .	60

LISTA DE ANEXOS

	pág.
ANEXO A. Determinación de azúcares totales.	118
ANEXO B. Determinación de proteínas.	119
ANEXO C. Determinación de ácido láctico por titulación.	120
ANEXO D. Determinación de biomasa por recuento en placa.	121
ANEXO E. Fichas de datos de seguridad.	122
ANEXO F. Balance de materia para el sustrato suero.	137
ANEXO G. Análisis sensorial.	138
ANEXO H. Análisis económico.	139
ANEXO I. Descripción del diseño experimental final para los cuatro medios evaluados.	140
ANEXO J. Resultados de producción de biomasa de <i>Lactobacillus casei subsp. rhamnosus</i> en el medio control.	141
ANEXO K. Muestra de Cálculos de para la estandarización del Inóculo.	142
ANEXO L. Análisis de varianza (ANOVA)	143
ANEXO M. Análisis microbiológico vida de anaquel.	146

GLOSARIO

ADITIVIDAD: la suposición de aditividad consiste en otras palabras, en que la variable de respuesta obtenida es la suma de las contribuciones parciales de cada factor, de tal forma que cuando una de ellas aumente de valor, otra u otras tengan que rebajar su valor o no puedan aumentar cierto límite.

ADENOCARCINOMA: tumor maligno que se origina del epitelio glandular.

ADP: adenosina difosfato, nucleósido que se forma generalmente tras la hidrólisis del ATP, cuando suministra energía para el metabolismo.

AGENTES PROBIÓTICOS: monocultivos o mezclas de microorganismos vivos que al ser ingeridos por el hombre o los animales actúan benéficamente, mejorando el balance microbiano y las propiedades de la microbiota del intestino.

ANOVA: análisis de varianza; consiste en separar la contribución de cada fuente de variación de la variación total observada.

ATP: adenosina 5–trifosfato, molécula muy energética que posee un potencial de transferencia del grupo fosfato elevado, constituyendo la principal “moneda” de energía de la célula.

BACTERICIDA: que produce la muerte de las bacterias.

BACTERIOCINA: moléculas de naturaleza proteica, co-agregados de proteínas o bien glicoproteínas producidas por las bacterias lácticas que poseen una marcada acción inhibitoria sobre otras cepas bacterianas muy similares.

BIOMASA: o masa celular, se puede estimar mediante diversos métodos dependiendo del microorganismo de que se trate.

BIOTA INTESTINAL: microorganismos vivos que se encuentran colonizando el tracto gastrointestinal humano.

CATABOLISMO: parte del metabolismo en el que moléculas grandes, más complejas, se descomponen en otras más pequeñas y sencillas, liberando energía.

CEPA: población de organismos que descienden de un único organismo o de un cultivo puro.

CITOCROMOS: hemoproteínas que transportan energía, normalmente como componentes de la cadena transportadora de electrones.

COLONIA: grupo o conjunto de microorganismos que se multiplican sobre una superficie sólida como la de un medio de cultivo con agar. La colonia se observa a menudo directamente, pero también puede verse solamente con microscopio.

CULTIVO INICIADOR: Inóculo compuesto por una mezcla de microorganismos seleccionados cuidadosamente que se emplea para comenzar una fermentación.

DIAGRAMA DE PARETO: gráfico de barras que representa los efectos ordenados en forma descendente de acuerdo con su magnitud absoluta.

DISEÑO EXPERIMENTAL: consiste en planear un conjunto de pruebas experimentales, de tal manera que los datos generados puedan analizarse estadísticamente para obtener conclusiones válidas y objetivas acerca del sistema o proceso.

ESPECIE: grupo de cepas con muchas propiedades estables en común que difieren significativamente de otro grupo de cepas.

FERMENTACIÓN: proceso liberador de energía en el cual las moléculas orgánicas actúan tanto de donadores como de aceptores de electrones.

FERMENTACIÓN ACIDO LÁCTICA: fermentación que produce ácido láctico como uno o principal producto final.

GASTRITIS: inflamación aguda o crónica del estómago, en especial de su capa mucosa.

HUÉSPED: cuerpo de un organismo que aloja a otro. Se puede considerar, como un microambiente que protege y mantiene el crecimiento y la multiplicación del organismo parásito.

in batch: fermentación discontinua que puede ser considerada como un “sistema cerrado”.

INOCULACIÓN: Pasar microorganismos a la superficie o a la masa de un medio de cultivo.

INÓCULO: crecimiento optimizado de células microbianas que va a dar origen a un proceso fermentativo, reconocido como el “material iniciador”.

in vitro: locución latina que significa vidrio. En general, se aplica a los procesos biológicos cuando se producen experimentalmente aislados del conjunto del organismo.

MICROBIOTA: microorganismos asociados normalmente con un tejido o estructura particular, población microbiana autóctona

PRUEBA DE DURBIN-WATSON: Indica la presencia de correlación entre los residuos consecutivos, que es una posible manifestación de la falta de independencia.

PRUEBAS SENSORIALES: abarca un conjunto de técnicas que, aplicadas de una manera científica, permiten obtener unos resultados fiables sobre las respuestas que nos dan nuestros sentidos a los alimentos. Para ello, se acude a catadores.

SUPERFICIE DE RESPUESTA: es la superficie que resulta de representar gráficamente el modelo ajustado. Esta describe el comportamiento de la respuesta promedio en cada punto de la región experimental.

SUSPENSIÓN CELULAR: se le denomina así a una concentración de células presentes en un cultivo líquido, el cual aparece turbio porque las células dispersan la luz que atraviesa la suspensión. Cuantas más células halla mas luz se dispersa y mas turbia aparece la suspensión.

TINCIÓN DE GRAM: método de tinción usada en bacteriología. Permite diferenciar muchos tipos bacterias que se tiñen (Gram +) por ejemplo: *Staphylococcus*, de otras que no lo hacen (Gram -) por ejemplo: bacterias tifoideas. La tinción se debe a la presencia de las bacterias de una nucleoproteína.

TURBIDIMETRIA: método aplicado para realizar el seguimiento del crecimiento microbiano en medios totalmente solubles, la absorbancia de suspensiones celulares se determina con espectrofotómetro a diferentes longitudes de onda.

UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS (UFC): número de microorganismos que pueden formar colonias cuando se cultiva en medios de cultivos sólidos; indican el número de microorganismos viables en una muestra.

VARIABLE DE RESPUESTA: es la característica del producto cuyo valor interesa mejorar mediante el diseño de experimentos.

VÍA DE EMBEN MEYER-HOFF: vía que degrada la glucosa a piruvato; en la fase de seis carbonos convierte la glucosa en fructosa 1,6 bifosfato y en la fase de tres carbonos produce ATP, transformándose el gliceraldehído 3-fosfato en piruvato.

RESUMEN

En la presente investigación se realizó una optimización de la biomasa de *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* empleando diferentes tipos de sustratos, usando un análisis estadístico, la metodología de superficie de respuestas, con el fin de determinar el medio óptimo que permita obtener la mayor cantidad de biomasa, que sea rentable y que tenga unas características organolépticas aceptables. Se trabajó con un medio control y se propuso tres sustratos diferentes, siendo estos la leche pasteurizada, leche de soya y suero de leche. Como resultado se obtuvo como medio óptimo final el suero de leche- miel de panela, con 131,284g/L de suero de leche, 7,485g/L de miel de panela y 9,36g/L de carbonato de calcio para obtener $2,91 \times 10^{10}$ bact/mL de biomasa, 0,57 en análisis sensorial y un costo de 1427,85 \$/L de sustrato. Al cabo de 15 días de seguimiento de la vida de anaquel del medio óptimo seleccionado se observó que el producto se encuentra dentro de los parámetros exigidos por el INVIMA y para ser considerado como un probiótico, por lo tanto se concluye que es una investigación factible para ser aplicada a nivel industrial.

Palabras claves: Biomasa, sustrato, análisis sensorial, análisis económico, análisis estadístico.

ABSTRACT

In the present investigation was made an optimization of the biomass of *lactobacillus casei subsp rhamnosus* using different types of mediums, using a statistical analysis the response surface methodology, with the purpose of determining the optimum medium that allows to obtain the biggest quantity of biomass and that it were profitable and that it has some acceptable organoleptics characteristics. One works with a control medium and was proposed three different medium, being these the pasteurized milk, soya milk and serum of milk. As result was obtaining as optimum medium final the serum of milk - panela honey, with 131,284g/L of serum of milk, 7,485g/L of panela honey and 9,36g/L of carbonate of calcium to obtain $2,91 \times 10^{10}$ bact/mL of biomass, 0,57 in sensorial analysis and a cost of 1427,85 \$/L of medium. After 15 days of pursuit of the life of shelf of the selected optimum medium one observes that the product is inside of the parameters demanded by the INVIMA and to be considered as a probiotic, therefore was concludes that it is a feasible investigation to be applied at industrial level.

Key words: Biomass, medium, sensorial analysis, economic analysis, statistical analysis.

INTRODUCCIÓN

Una de las tendencias mas importantes de la actualidad es la alimentación saludable, por lo cual cada vez mas personas prestan mayor atención al respecto, de igual manera en el mercado se presentan nuevos productos los cuales buscan satisfacer esta necesidad, los productos lácteos son un ejemplo fiel de esta tendencia, entre los cuales se puede nombrar los productos libres de lactosa, las leches fermentadas y los probióticos, los cuales están abarcando el mercado nacional e internacional de bebidas con efectos positivos en la salud o mas conocidos como alimentos funcionales.

Las bacterias ácido lácticas, tradicionalmente han demostrado tener importantes propiedades como probióticos, por lo cual se plantea la utilización de *Lactobacillus casei subsp. rhamnosus*, un microorganismo ampliamente estudiado, principalmente por su efecto benéfico en la salud, como el aporte nutricional cuando es suplemento en algún sustrato amiláceo o lácteo.

“Se han realizado diversas investigaciones con *Lactobacillus casei subsp. rhamnosus*, en las cuales se ha aislado, identificado y comprobado su capacidad inhibitoria sobre diferentes microorganismos como *Salmonella typhimurium*, *Vibrio cholerae*, *Yersinia enterocolitica*, *Helicobacter pylori* y *Shigella boydii*”¹.

En un estudio sobre el antagonismo *in vitro* de *Lactobacillus casei subsp. rhamnosus* sobre *Helicobacter pylori*, en la cual se realizaron diferentes ensayos comprobando la efectividad de la inhibición del *Lactobacillus casei subsp. rhamnosus* sobre *Helicobacter pylori* recomiendan el medio Melaza con leche en polvo fermentado con *Lactobacillus casei subsp. rhamnosus* como un producto probiótico por su aporte de nitrógeno, carbohidratos y proteínas².

En este sentido en la presente investigación se realizo la optimización de la producción de biomasa de *Lactobacillus casei subsp. rhamnosus*, empleando diferentes tipos de sustratos, con el fin de establecer que tan efectiva y rentable resulta la producción de este probiótico.

Para la optimización se realizo un análisis estadístico utilizando el método de superficie de respuestas, determinando cual medio es el óptimo para obtener la mayor cantidad de biomasa, que sea rentable y que ofrezca buenas características organolépticas.

¹ PAZOS, M. Álvaro Jairo. Protección intestinal contra patógenos específicos a través de sustratos fermentados con *Lactobacillus casei subsp. rhamnosus*. Santiago de Cali 2000.

² MONTES, Andrea. SANTRACRUZ, Ayda. SAÑUDO Jessie. Efecto *in vitro* de *Lactobacillus casei subsp. rhamnosus* sobre el crecimiento de un aislado de *Helicobacter pylori*. San Juan de Pasto, 2003. Trabajo de grado (Biólogo con énfasis en Microbiología). Universidad de Nariño. Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas. Departamento de Biología.

1. IDENTIFICACIÓN Y ESTADO ACTUAL DEL PROBLEMA

Las bacterias ácido lácticas se han empleado para fermentar o generar cultivos de alimentos fermentados durante al menos cuatro milenios, constituyen un vasto conjunto de microorganismos benignos, dotados de propiedades similares que fabrican ácido láctico como producto final de la fermentación. Se encuentran en grandes cantidades en la naturaleza, formando parte de la flora normal de la superficie de material vegetal (frutas y verduras), alimentos ricos en azúcares, leche y derivados, así como en el tracto nasofaríngeo y gastrointestinal humano y animal.³

“Las bacterias lácticas han sido utilizadas tradicionalmente para la fermentación de diversos sustratos primarios (leche, carne, vegetales, etc.) y como agentes probióticos que colonizan el tracto gastrointestinal y modifican este ecosistema en forma benéfica para el consumidor”⁴.

La composición y actividad de los microorganismos son responsables de funciones metabólicas de barrera e interacciones con el huésped. En este sentido, las bacterias ácido lácticas autóctonas del tracto gastrointestinal humano se han usado para producir una variedad de productos fermentados y sus metabolitos conducen a obtener alimentos de alta calidad, menos perecederos y con características organolépticas propias, contribuyendo a posibles beneficios nutricionales en la salud tales como el mejoramiento de la digestión de lactosa y el alivio de ciertos tipos de diarrea la cual es considerada como un problema de salud muy frecuente en cualquier parte del mundo y es particularmente significativa en países en vía de desarrollo como en el caso de Colombia⁵.

En Nariño, existen muy pocas industrias que utilizan en sus productos cultivos probióticos y mas aun que se dediquen a la producción de probióticos, por lo tanto se hace necesario explorar este campo, tanto para producción como para utilización en diferentes sustratos alimenticios, principalmente en los productos lácteos. Considerando que en nuestra región, la industria láctea es una de las cadenas productivas más grande, la presente investigación estuvo dirigida a buscar una solución a esta necesidad, al generar un producto probiótico,

³ STANIER, R. *et al.* The acid lactic bacteria. In: The microbial World. Prentice Hall. 1986. New Jersey. p. 496 – 500

⁴ PARADA, J. L. Bacterias lácticas usos en fermentaciones y como probióticos. Congreso Internacional de Microbiología Industrial. Universidad Javeriana. Santa Fé de Bogotá. 1999.

⁵ GUERRERO F, Milena; GUZMAN, Sofía; YANDAR, Nubia. Capacidad inhibitoria de un sustrato fermentado con *Lactobacillus acidophilus* aislado del tracto gastrointestinal humano sobre *Vibrio Cholerae* 01 Ogawa in Vitro. San Juan de Pasto, 2002. Trabajo de grado (Biólogo con énfasis en Microbiología). Universidad de Nariño. Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas. Departamento de Biología.

viable, de costo atractivo y además con propiedades nutricionales, benéficas para la salud de los consumidores, y con posteriores pretensiones de aplicación como producto agroindustrial.

2. DEFINICIÓN DEL PROBLEMA

La obtención de biomasa del *Lactobacillus casei subsp. rhamnosus* utilizando el medio Melaza-Leche en polvo como lo recomiendan anteriores investigaciones es costoso, debido a que la leche en polvo es un producto con un precio muy alto ya que no se produce en la región y se requiere una gran tecnología para su elaboración, además, aun no se ha realizado la optimización de este medio en cuanto a fuentes de nitrógeno y carbohidratos. Por tal razón se hizo necesario evaluar otros sustratos más económicos y de eficiencia aceptable para la optimización de la producción biomasa del *Lactobacillus casei subsp. rhamnosus*, permitiendo adicionalmente una buena producción de proteínas y otros metabolitos, ya que, el crecimiento del microorganismo depende de la composición del medio de cultivo.

3. JUSTIFICACIÓN E IMPORTANCIA

La presente investigación pretendió optimizar la producción de biomasa de *Lactobacillus casei subsp. rhamnosus*, en la cual se utilizaron diferentes sustratos, brindándole un uso alternativo al suero de leche, ya que este actualmente es desechado o vendido a precios bajos y sería importante su aprovechamiento para la producción de una bebida láctea con fines probióticos, pasando de ser un subproducto de la industria láctea a ser un coproducto; de igual manera observar el comportamiento de la fermentación con leche de soya y utilizarlo como una alternativa para las personas que no pueden consumir leche o simplemente prefieren consumir leche de soya por sus propiedades alimenticias o nutricionales.

Es necesario anotar que la optimización de la producción de biomasa del *Lactobacillus casei subsp. rhamnosus*, es una investigación innovadora, la cual puede ayudar mucho a las industrias lecheras de Nariño y de Colombia, ya que este cultivo probiótico podría utilizarse en algunos productos lácteos y de igual forma mejorar el eslabón de la industrialización de la cadena láctea y tener un gran posicionamiento en el mercado ya que los probióticos proporcionan al consumidor muchos beneficios en cuanto a salud se refiere.

Para esta investigación se escogió el *Lactobacillus casei subsp. rhamnosus*, ya que “es una de las cepas de *Lactobacillus* probióticos que se han estudiado completamente *in vitro* e *in vivo*”⁶, además, en investigaciones nacionales y regionales como la de Pazos, A. 2000, y la de Montes, A *et al.* 2003, se destacan sus efectos antagónicos sobre *Helicobacter pylori* que según Correa, “la infección por *Helicobacter pylori* esta asociada al desarrollo de gastritis, atrofia glandular gástrica, duodenal y adenocarcinoma gástrico”⁷; patologías con alta prevalencia en la zona Andina del Departamento de Nariño.

Esta investigación se enmarca dentro de las investigaciones con probióticos, como las que se han llevado a cabo tanto *in vitro* como *in vivo* y también industrialmente, el estudio desarrollado por Guerin-Danan, planteó “que la toma de leche fermentada con cultivos de yogur y *L. casei* (DN-114 001) modificó en forma benéfica la composición de la microbiota intestinal en niños pequeños y el mismo probiótico restauró a niveles normales el indicador inflamatorio, TNF-alpha, liberado por células inflamadas de la mucosa en pacientes con la enfermedad de Crohn”⁸.

⁶ REID, G. The Scientific Basis for Probiotic Strains of *Lactobacillus*. In: Journal of applied and environmental microbiology, Sept. 1999, p. 3763–3766

⁷ CORREA, Pelayo. Is gastric carcinoma an infections disease. In: Journal Medical. Vol. 325 (1991); p. 1170-1171

⁸ GUERIN-DANAN, C. *et al.* Leche fermentada con cultivos de yogur y *Lactobacillus casei* comparada con yogur y leche gelatinizada: su influencia sobre la flora intestinal en niños sanos. En: Journal Clinico Americano de Nutricion. Vol. 67 (1998); p. 111 – 117

“Diversos estudios clínicos y controlados con placebos han demostrado que el consumo oral de *Lactobacillus casei* reduce la duración de la diarrea y en particular las gastroenteritis por rotavirus en niños”⁹. Además también “puede ayudar a reducir la antibioterapia y la diarrea del viajero”¹⁰.

Lactobacillus casei subsp. rhamnosus es quizá una de las bacterias más estudiadas en el campo de los probióticos. Se ha demostrado su utilidad para resistir las sales y ácidos biliares, se unen a las células epiteliales humanas, colonizan el tracto intestinal, producen sustancias antibacterianas, mejoran el movimiento intestinal, etc. Ésta es la cepa de bacteria probiótica ideal, capaz de contribuir en gran parte a mantener un estado equilibrado en la microbiota humana para la prevención de los desórdenes intestinales¹¹.

La utilización de bacterias probióticas ha ido ganando la aceptación del público en general en todo el mundo a medida que los estudios continúan confirmando sus numerosos efectos beneficiosos. En 1988, Salminen *et al.* “recalaron la importancia de mantener una microbiota intestinal equilibrada para preservar la integridad intestinal”¹². En 1994, Isolauri *et al.* “propusieron una bacterioterapia oral, usando *Lactobacillus casei subsp. rhamnosus*, para tratar la gastroenteritis viral”¹³. Un año más adelante, Kaila *et al.* “experimentaron el mismo terreno y fueron un paso más lejos revelando que el *Lactobacillus casei subsp. rhamnosus* estimula respuestas específicas de los anticuerpos IgA para la reducción perceptible de infecciones intestinales”¹⁴.

⁹ SAXELIN, M. *et al.* The use of a human *Lactobacillus casei* strain GG in the prevention and treatment of diarrhoea. *In*: Les Bacteries Lactiques. Recherche at Applications Industrielles en Agroalimentaire / Actes du colque LACTC. Vol. 91 (1992)

¹⁰ SALMINÉN, S. *et al.* Lactic Acid Bacteria in health and disease/ Salminen Von Wright. *In*: Lactic Acid Bacteria. (1993); p. 199-219

¹¹ LEOVIZ DISTRIBUCIONES, SL. Beneficios de los Probióticos, (visitada viernes 27 de enero de 2006); disponible en Internet: www.probioticos.net

¹² SALMINÉN, S. *et al.*, Op, cit., p. 199.

¹³ ISOLAURI, E., *et al.* Oral bacteriotherapy for viral gastroenteritis. *In*: Digestive diseases and sciences. 1994, vol. 39, No. 12, pp. 2595-2600

¹⁴ KAILA, M., E. ISOLAURI, E. SOPPI, E. VIRTANEN, S. LAINE, and H. Arvilommi. Enhancement of the circulating antibody secreting cell response in human diarrhea by a human *Lactobacillus* strain. . *In*: Pediatr Res. 1992, vol 32, p. 141-144

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Optimizar la producción de biomasa de *Lactobacillus casei subsp. rhamnosus* empleando diferentes tipos de sustratos.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estandarizar la concentración de inóculo para iniciar la fermentación en el sustrato control, fermentado con *Lactobacillus casei subsp. rhamnosus*.
- Determinar parámetros de fermentación *in batch* en el medio control y en el sustrato óptimo fermentado con *Lactobacillus casei subsp. rhamnosus*.
- Proponer un sustrato más adecuado para la producción de biomasa de *Lactobacillus casei subsp. rhamnosus*.
- Evaluar las características microbiológicas y organolépticas en la vida de anaquel del sustrato fermentado seleccionado.

5. MARCO REFERENCIAL

5.1 BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS

Las bacterias ácido lácticas obtienen energía exclusivamente por fermentación de azúcares, carecen de ciclo de Krebs funcional, el rendimiento de su cultivo es muy bajo, en algunos casos pueden usar azúcares para formar polímeros extracelulares de dextrano, requieren una gran cantidad de factores nutritivos (aminoácidos, bases nitrogenadas, algunas vitaminas); tiene unas posibilidades anabólicas muy limitadas lo que reduce el rendimiento de su crecimiento, toleran bien concentraciones relativamente altas de ácidos y valores de pH mas bajos que el resto de las bacterias por lo que pueden desplazarlas de los habitats que colonizan¹⁵.

“Varios estudios realizados en animales y humanos sugieren que las bacterias del ácido láctico o las leches fermentadas producen un efecto benéfico sobre las defensas naturales del organismo, por medio de tres líneas de defensa: La microbiota intestinal y su efecto barrera, el epitelio y la mucosidad, la inmunidad específica y no específica”¹⁶.

5.1.1 Microbiota intestinal. La microbiota intestinal es un ecosistema vivo en el que conviven microorganismos benéficos y dañinos simultáneamente. Bajo condiciones normales el equilibrio de estos organismos es estable. Sin embargo, factores tales como el uso de antibióticos, el estrés, el consumo excesivo de azúcar u otros agentes, causan un cambio en el nivel de la acidez intestinal que puede alterar su equilibrio. En esas circunstancias el número de bacterias benéficas no se incrementa como sería necesario, permitiendo que los microbios indeseados comiencen a colonizar y a extenderse incontroladamente, produciendo desórdenes intestinales tales como diarrea, colitis y otros síntomas como dolor de estómago y flatulencia¹⁷.

La relación positiva entre los seres humanos y las bacterias probióticas ha quedado largamente demostrada. En 1956, Freter observó un fenómeno que él describió como "antagonismo bacteriano" por el cual el crecimiento de microbios patógenos fue inhibido por las bacterias probióticas. Más adelante, Ducluseau. *et al.* 1977, divulgaron la misma observación: se producía un “efecto barrera ” contra las infecciones intestinales. En 1979, Gilliland sugirió el uso de ciertos microorganismos como complementos dietéticos.

¹⁵ STANIER, R. *et al.*, Op. Cit., p. 23.

¹⁶ KATO, Y. *et al.* Activación de macrofagos por *Lactobacillus casei* en ratas. En: Microbiologia inmunologica. Vol. 27 (1983); p. 611-613.

¹⁷ FUJISAWA, T., Y. BENNO, T. YAESHIMA, and T. Mitsuoka.. Taxonomic study of the *Lactobacillus acidophilus* group, with recognition of *Lactobacillus gallinarum* sp. nov. and *Lactobacillus johnsonii* sp. nov., and synonymy of *Lactobacillus acidophilus* group A3 (Johnson et al. 1980) with the type strain of *Lactobacillus amylovorus* (Nakamura 1981). In: Int. J. Syst. Bacteriol. 1992, vol 42, p. 487–491.

Últimamente, las investigaciones de Salminen en 1990 y Strus en 1996 confirmaron los resultados que todavía apoyan este “efecto barrera” en una microbiota sana.

“El papel preventivo de las bacterias probióticas contra infecciones patógenas se logra realzando el mecanismo de defensa del huésped por medio de la estabilización de la microbiota”¹⁸.

5.1.2 El epitelio y la mucosidad. El mejor modelo a observar en la interacción de la biota intestinal del epitelio es el modelo gnotoxénico. En el animal axénico la mucosa intestinal y la capa de moco son muy finas. Tan pronto se agrega algo de flora al animal el tamaño de la mucosa intestinal aumenta y la cantidad de moco se incrementa. El ácido butírico producido durante la fermentación de las colonias actúa como combustible para los colonocitos, y es capaz de modular su metabolismo. El responsable del efecto conocido como “trópico” sobre las células epiteliales. Se ha demostrado recientemente que las bacterias exógenas pueden modular la secreción del moco del portador¹⁹.

5.1.3 Inmunidad específica y no específica. La estimulación del sistema inmunológico no específico se ha medido a través de: el índice de fagocitosis, la actividad de las células asesinas naturales y la inducción de diversas citosinas. La respuesta del sistema inmunológico específico ha sido mediante: la secreción de inmunoglobulina en la sangre, la concentración de linfocitos B, linfocitos T, y algunas citosinas. Ambos sistemas pueden ser estimulados por diversos probióticos y se han utilizado varias especies de *Lactobacillus casei* en diversos estudios con humanos y con animales²⁰.

5.2 CARACTERÍSTICAS FISIOLÓGICAS Y MORFOLÓGICAS DE LAS BACTERIAS LÁCTICAS

Son un grupo de bacterias en forma de cocos o bacilos Gram positivos inmóviles y no esporulados, no tienen citocromos, catalasa ni porfirinas; no realizan fosforilación por transporte de electrones y por lo tanto, obtiene la energía solo por fosforilación a nivel de sustrato. Todas las bacterias del ácido láctico crecen anaerobicamente. No obstante, a diferencia de muchos anaerobios, la mayoría no son sensibles al oxígeno y pueden crecer tanto en presencia como en ausencia del mismo; y por lo tanto, se consideran como anaerobios aerotolerantes. Además son tolerantes a la acidez y algunos son termófilos, sin embargo pueden desarrollar crecimiento entre 30-35°C. Algunas cepas pueden usar oxígeno con la mediación de sistemas de flavoproteína oxidasa,

¹⁸ LEOVIZ DISTRIBUCIONES, SL, 2006. Op, cit., p. 27.

¹⁹ THOREUX, K. *et al.* Modulación de la proliferación, Segundo nivel de mensaje y expresión morfológica de la línea epitelial del intestino de las ratas IEC-6 por la acción de la leche fermentada. *En*: Ciencia láctea. Vol. 79 (1996); p. 33-43.

²⁰ PERDIGÓN, G. *et al.* El efecto de *Lactobacillus* administrados oralmente sobre la activación de macrófagos en ratas. *In*: Infection Immunology. Vol. 53 (1986); p. 404 – 410.

produciendo peróxido de hidrógeno, aunque la mayoría de las cepas no poseen catalasa y eliminan el peróxido de hidrógeno mediante la enzima peroxidasa. En la reacción de flavoproteína oxidasa no se forma ATP pero el sistema oxidasa puede utilizarse para reoxidación del NADH generado durante la fermentación. La mayor parte de las bacterias del ácido láctico obtienen energía solo del metabolismo de los azúcares y compuestos relacionados fermentables, por lo cual su hábitat se restringe a medios ricos en azúcares. Normalmente, su capacidad biosintética es limitada y sus complejos requerimientos nutritivos incluyen aminoácidos, vitaminas, purinas y pirimidinas²¹.

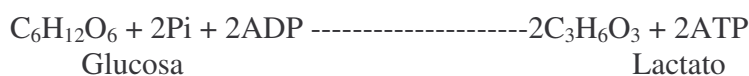
5.3 METABOLISMO DE LAS BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS

Orla Jensen (1920) “clasificó a las bacterias lácticas, atendiendo a sus características bioquímicas en dos grupos: Homofermentativas y Heterofermentativas”²².

5.3.1 Homofermentación. Tiene prácticamente un solo producto de fermentación, el ácido láctico. La desarrollan todos los miembros del género *Streptococcus*, *Pediococcus* y muchas especies de *Lactobacillus*. Es la principal ruta del catabolismo de la glucosa, conocido como glucólisis, o vía de Embden-Meyerhof-Parnas donde una mol de glucosa, o cualquier otro sustrato glucosídico es convertido a dos moles de ácido láctico, sin oxígeno molecular.

Consta de dos fases: en la primera la glucosa es fosforilada por ATP y activada para formar gliceraldehído fosfato en la segunda, el gliceraldehído fosfato es convertido en ácido láctico en una serie de reacciones de oxidación-reducción que están acopladas por medio de moléculas de NADH y NAD a la fosforilación del ATP para permitir el desarrollo de los ciclos de fermentación subsiguientes. En esta vía se produce doble masa celular y muy poco o ausencia de CO₂²³.

“El piruvato es reducido a ácido láctico por la enzima deshidrogenasa láctica. En esta vía se forman en total cuatro moléculas de ATP por molécula de glucosa fermentada, pero como se consumen dos moléculas la producción neta son dos moléculas de ATP por molécula de glucosa fermentada, como se muestra en la reacción”²⁴:



²¹ MADIGAN, M. *et al.* Biología de los microorganismos. Madrid, España, Prentice Hall Iberia. Ed., 1999. p. 718 – 722.

²² MATEUS, G. Pedro. F. Producción intestinal de productos lácteos. *s.l.*

²³ WILLETT. H.P. Microbiología: Metabolismo energético. 18ed. Buenos Aires, Argentina. 1989. p. 54-84.

²⁴ Ibid., p.54.

5.3.2 Heterofermentación. La realizan algunos tipos de bacterias ácido lácticas como *Leuconostoc* y algunas especies de *Lactobacillus*. Este tipo de fermentación se lleva a cabo por las vías de las pentosas-fosfato o vía de Dickens; se caracteriza porque la glucosa vía pentosa-fosfato es fermentada a ácido láctico en un 50% y el resto a CO₂, alcohol, ácido acético o ácido formico, paralelamente con una molécula de ATP y de NADH₂ – NAD para permitir que el proceso de fermentación continúe, como lo indica la reacción²⁵:



5.4 CLASIFICACIÓN DE LAS BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS

“La clasificación de las bacterias lácticas basada en sus relaciones filogenéticas se sustenta en el análisis comparativo de secuencias de RNAr de las subunidades 16S o 23S ribosomales”²⁶. Teniendo en cuenta estos datos, las bacterias Gram positivas forman dos líneas descendientes una llamada phylum *Clostridium* y otra llamada phylum *Actinomycetal*. Las típicas bacterias lácticas como *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Camobacterium* y *Streptococcus* pertenecen al phylum *Clostridium*, mientras que *Bifidobacterium* y otras bacterias Gram positivas importantes en la producción de alimentos como *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Microbacterium*, *Propionibacterium* son miembros del phylum *Actinomycetal*. De los anteriores los mas importantes géneros de bacterias ácido lácticas son *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Camobacterium*, *Streptococcus* y *Bifidobacterium*.

5.4.1 Lactobacillus. “El nombre *lactobacillus* etimológicamente proviene de lacto que significa leche o lácteo y bacilo, barra o baston pequeño, así *Lactobacillus* seria bastón de la leche. Son típicamente bacilares variando desde bacilos largos y delgados a cortos y curvados que comúnmente forman cadenas, inmóviles, aunque pueden presentar flagelos peritricos”²⁷.

“Algunas cepas exhiben cuerpos bipolares o granulaciones internas, comprenden especies que son homofermentativas en su mayor parte aunque algunas especies son heterofermentativas, microaerofilicos, crecen en medios sólidos como MRS -De Man – Rogosa et Sharper (1960) a baja presión de oxígeno y con 5-10% de CO₂ en un rango de temperatura entre 2-53°C, optima entre 30-40°C”²⁸.

²⁵ WILLETT. H.P., Op, cit., p. 31.

²⁶ SCHLEIFER, K. H. *et al.* Phylogenetic relation chips of lactic Acid Bacteria. *In*: Research and industrial application in the Agrofood Industries. (1991); p. 23 – 32.

²⁷ KANDLER, U. *et al.* Gram positive rods. *In*: Bergey S. Manual of Systematic Bacteriology. Vol. 2 (1990); Batimore, Estados Unidos: Williams and Wilkins. P. 1209-1234.

²⁸ DE MAN J.C., ROGOSA, M., SHARPE, M.E. A medium for the cultivation of Lactobacilli. *In*: Journal Appl. Bacteriology. 1960. Vol. 23, p. 130-135.

El género ha sido dividido en tres principales subgrupos y se reconocen más de 70 especies. Los lactobacilos se encuentran normalmente en productos lácteos y algunas cepas se usan en la preparación de derivados fermentados en la leche. Por ejemplo, *Lactobacillus delbrueckii* se usa en la preparación del yogur. Normalmente los lactobacilos resisten mejor las condiciones de acidez que las restantes bacterias del ácido láctico; pueden crecer bien a valores de pH alrededor de 4 o 5 lo que le permite su aislamiento selectivo a partir de muestras naturales empleando medios de cultivo de pH ácido que contengan carbohidratos. Su resistencia a la acidez les permite seguir creciendo durante las fermentaciones lácticas, cuando el valor de pH ha descendido demasiado para que otras bacterias del ácido láctico puedan crecer, por consiguiente, los lactobacilos llevan a cabo las últimas fases de la mayoría de las fermentaciones ácido-lácticas, además se ha comprobado que estos microorganismos casi nunca son patógenos²⁹.

“El genero *Lactobacillus* conforma un apreciado porcentaje del total de la microbiota intestinal, muchas especies de ellos están distribuidos a lo largo del intestino tenue y craso”³⁰. A continuación se citan “siete de las especies que se han aislado del tracto intestinal humano”³¹:

- *L. acidophilus**
- *L. casei**
- *L. fermentum*.
- *L. cellobiosus*.
- *L. plantanum*.
- *L. salivarius*.
- *L. bifidus**

*Utilizados como coadyuvantes dietéticos.

5.4.1.1 *Lactobacillus casei*. El grupo de *Lactobacillus casei* consta de diversas especies de bacterias mesofilicas ácido lácticas, anaerobias facultativas y homo o heterofermentativas. Su metabolismo proporciona cualidades organolépticas a diversas leches fermentadas, quesos y más recientemente a las nuevas leches fermentadas. Su habilidad para sobrevivir en cantidades adecuadas al tránsito a lo largo del tracto intestinal además de tener un efecto fisiológico asociado con sus beneficios potenciales sobre la salud, hacen que *Lactobacillus casei* sea un candidato ideal para considerarlo como probiótico³².

²⁹ MADIGAN, M. *et al.* Op. cit., p. 31.

³⁰ FULLER, R. Probiotics in man and animals. *In*: J. Appl. Bacteriol. 1989. Vol 66:365–378.

³¹ WILLIAMS, E.S. Roles of *Lactobacillus* in the intestinal tract. *In*: Journal of food Protection. 1979. Vol 42, N°3 ; p. 259-262.

³² GAON, D. *et al.* Lactose digestion by milk fermented with *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* of human origin. *In*: Medicine.1995. Vol. 55; p. 237-242.

Además de ser la especie modelo del género *Lactobacillus*, tiene gran importancia como bacteria intestinal (algunas cepas se utilizan como probióticas) y como cultivo iniciador de productos lácteos. Actualmente se dispone de herramientas genéticas y conocimientos suficientes sobre la regulación génica para tratar de descifrar los procesos genéticos y ambientales que controlan la expresión de los genes de la ruta glucolítica, así como de las rutas alternativas del piruvato, siendo estas últimas responsables de la formación de compuestos volátiles importantísimos en alimentos³³.

5.4.1.1.1 *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus*. Fue descrito por Hasen (1968). La especie *casei* toma su nombre por la fuente donde fue aislado, el queso: la subespecie *rhamnosus* por la particularidad de asimilar la rhamnosa. Se destaca por ser el único lactobacilo homofermentativo de la especie que desarrolla buen crecimiento de 15°C a 45°C. Puede ser aislado de la leche, el queso, productos lácteos, harinas fermentadas, estiércol de vaca, tracto intestinal humano, boca y vagina³⁴.

En 1988, Sato. *et al.* divulgaron el aumento en la resistencia del huésped contra las infecciones de *Listeria* gracias al *Lactobacillus casei*. Resultados similares fueron obtenidos por Nader de Mamas. *et al.* en 1992 quienes recomendaron la ingestión de leche fermentada con el *Lactobacillus acidophilus* y el *Lactobacillus casei* como profiláctico contra infecciones intestinales por shigella. Las ventajas de estas bacterias también fueron reveladas por Perdigón. *et al.* en 1993, quienes además descubrieron su importante papel protector en la prevención de infecciones entéricas produciendo un aumento en la secreción de anticuerpos IgA. En 1993, Vescovo también estudió las mismas bacterias y observó que se segregaban compuestos antimicrobianos activos contra *Clostridium tyrobutyricum*. En el mismo año Chateau. *et al.* estudiaron y observaron que las bacterias *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* y *Salmonella enteritidis* se inhibían por acción de los lactobacilos³⁵.

5.5 PROPIEDADES ANTIMICROBIANAS DE LAS BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS

“Las bacterias lácticas pueden producir sustancias de origen proteínico o químico, antibacterial altamente específico, secretada por una determinada cepa y activa contra otras cepas de la misma o de otra especie”³⁶.

5.5.1 Peroxido de hidrogeno H₂O₂. Ciertas cepas de bacterias lácticas son capaces de tomar oxígeno para formar peróxidos mediante flavoproteína-oxidasa o mediante

³³ PÉREZ, M. G. *et al.* Factores que regulan la glucólisis en *Lactobacillus casei*. En: Manual de ciencia y tecnología. 2001.

³⁴ KANDLER, U. *et al.*, Op, cit., p. 32.

³⁵ LEOVIZ DISTRIBUCIONES, SL, Op, cit., p. 30.

³⁶ DAESCHEL, M. A. Antimicrobial substances from lactic acid bacteria for use as food preservatives. In: Food Technology. 1989. p. 164-167.

peroxidasa. El peróxido de hidrógeno producido y liberado al medio resulta extremadamente tóxico para otras bacterias que comparten el hábitat y son así eliminadas. La acumulación de peróxido de hidrógeno en los productos fermentados ocurre por que los *Lactobacillus* no poseen la enzima catalasa. Este compuesto posee actividad antimicrobiana cuando se acumula y su efecto es antagónico para el crecimiento de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas sp*³⁷.

5.5.2 Diacetil. “Es un producto final del ciclo de fermentación butanodiolica, que se lleva a cabo en uno de los destinos del piruvato. Este compuesto es conocido por impartir aroma agradable en alimentos fermentados y por su actividad microbiana, inhibe el crecimiento de levaduras, bacterias Gram negativas y Gram positivas no lácticas”³⁸.

5.5.3 Ácido Láctico. “Las bacterias lácticas que producen este metabolito secundario no lo utilizan y lo secretan al exterior. El ácido láctico contribuye al desarrollo de sabor, aroma, textura de los alimentos, pero también a su estabilidad mediante la inhibición de microorganismos alterantes”³⁹.

“Las bacterias lácticas pueden sobrevivir y desarrollarse en presencia de pH relativamente bajo a diferencia de otros grupos microbianos, con metabolismo respiratorio”⁴⁰.

“Se ha observado que la baja de pH debido al incremento de ácido láctico en procesos de fermentación inhibe el crecimiento de microorganismos indeseables. Estudios en este sentido han observado la inhibición antagónica del crecimiento bacteriano por metabolitos ácido lácticos”⁴¹.

5.5.4 Bacteriocinas. “En general, son moléculas de naturaleza proteica, coagregados de proteínas o bien glicoproteínas producidas por bacterias lácticas”⁴², las cuales ejercen acción bactericida o bacteriostática en cepas cercanamente emparentadas o susceptibles.

“Las bacteriocinas se pueden dividir en tres clases: L - antibióticos (Nisina –a y –z, Lacticina 481); caracterizadas por contener inusuales aminoácidos como la Santonina, No

³⁷ DAESCHEL, M. A. Op, cit., p. 34.

³⁸ SALMINÉN, S. *et al.* Op. Cit., p. 27.

³⁹ REQUENA, T. y PELAEZ, C. Actividad antimicrobiana de bacterias lácticas producción de bacteriocinas. En: Revista Española de Ciencia y Tecnología de Alimentos. 1995. Vol. 35, No. 1; p. 535 – 549.

⁴⁰ Ibid., p. 535.

⁴¹ LEMUS, C. B. *et al.* Inhibition of food-borne bacterial pathogens by bacteriocins from lactic acid bacteria isolated from meat. In: Applied and Environmental Microbiology. 1991. Vol. 57, No 6; p. 1683 – 1688.

⁴² PARADA, J. L. Op. Cit., p. 23.

Lantibioticos termoestables, pequeñas (Lactococcina a, Lactaccina F) y Bacteriocinas, No Lantibioticos termolabiles (Caseicina 80)”⁴³. Ver cuadro 1.

Cuadro 1. Bacteriocinas producidas por bacteria ácido lácticas.

Microorganismo	Bacteriocina	Referencias
<i>Lactococcus lactis</i> , subsp. <i>lactis</i> ATCC 11444 NIZO 22186 CNRZ 481	Nisina A Nisna Z Lacticina 481	Rogers (1998) Mulders <i>et al</i> (1991) Piart <i>et al</i> (1990)
<i>Lactococcus lactis</i> , subsp. <i>lactis</i> var. <i>diacetylactis</i> DPC 938	Lactocina D	Morgan & Hill (1993)
<i>Lactococcus lactis</i> , subsp. <i>cremoris</i> LMG 2081	Lactococcina G	Nissen-Meyer <i>et al</i> (1992)
<i>Lactobacillus acidophilus</i> M 46	Bacteriocina M 46	Ten Brink (1990)
<i>Lactobacillus casei</i> B 80	Caseisina 80	Ramelsberg & Raddler (1990)
<i>Lactobacillus plantarum</i> MI 406	Plantaricina 406	Larsen <i>et al</i> (1993)
<i>Carnobacterium psicicola</i> UI 49	Carnocin UI 49	Stoffels <i>et al</i> (1992)
<i>Pediococcus acidilactici</i> SJ-1	Pediocina SJ-1	Schved <i>et al</i> (1993)
<i>Pediococcus pentosaceus</i> L-7230	Pediocina A	Daeschel & Klaenhammer
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> UL5	Mesenterocina 5	Daba <i>et al</i> (1993)
<i>Streptococcus thermophilus</i> Sfi 13	Termofilina 13	Maciset & Mollet (1993)
<i>Enterococcus faecalis</i> 226	Enterocina 226 NWc	Villani <i>et al</i> (1993)

Fuente: PARADA, J. L.1999.

“Las bacteriocinas son resistentes al calor, la acidez y a la baja Aw (actividad de agua). Pueden utilizarse para incrementar la seguridad y la vida útil de muchos alimentos tratándose además de aditivos naturales elaborados por microorganismos considerados como seguros en los alimentos”⁴⁴.

5.6 PROBIÓTICOS – PREBIÓTICOS – SIMBIÓTICOS

5.6.1 Probióticos. El Dr. Roy Fuller definió un probiótico como “suplemento microbiano vivo de la alimentación que afecta de forma benéfica a su huésped animal mejorando su equilibrio microbiano intestinal”. Esta definición acentúa la importancia de las células vivas como componentes esenciales de los probióticos. La palabra probiosis proviene del griego: pro (favorable) y biosis (vida), y tiene, por tanto un significado contrario a antibiosis, promoviendo la proliferación de especies bacterianas dentro del aparato gastrointestinal. La probiosis se define como “la característica de la flora normal del adulto para resistir el crecimiento y establecimiento excesivo de componentes extraños” y es reforzada o reestablecida por los probióticos. El concepto del probiótico aplicado a la medicina preventiva se utiliza

⁴³ PARADA, J. L. Op. Cit., p. 23.

⁴⁴ BARNEY, Carmen. E. Bacterias lácticas bacteriocinogenicas efecto sobre bacterias patógenas asociadas a alimentos. Santiago de Cali, 1996. Tesis (Magíster en Microbiología). Universidad del Valle. Departamento de Microbiología.

desde las investigaciones del Dr. Metchnikoff. Él postuló que la longevidad observada en los pueblos balcánicos era debida al consumo regular de leche fermentada que contenía *Lactobacillus bulgaricus*⁴⁵.

Se ha demostrado que los probióticos actúan por los siguientes mecanismos:

- Competición por los nutrientes.
- Competición por los lugares de adherencia.
- Estímulo del sistema inmunológico.
- Efecto antimicrobiano directo.
- Mejora en la digestión.

5.6.1.1 Historia de los Probióticos. Los probióticos han estado con nosotros desde que los seres humanos comenzaron a tomar leche fermentada pero su relación con sus beneficios para la salud datan de principios del siglo XX, cuando a Metchnikoff le llamó la atención los efectos nocivos de la microflora intestinal en el huésped y sugirió que la ingestión de leche fermentada disminuye esta “autointoxicación”. Trabajos posteriores, basados en la teoría de que la colonización del intestino era esencial para un máximo efecto, utilizando razas de bacterias intestinales como el *Lactobacillus acidophilus* en el tratamiento del estreñimiento.

5.6.1.2 Probióticos más estudiados.

Cuadro 2. Cepas de *Lactobacillus* probióticos que se han estudiado completamente *in vitro* y en humanos.

Cepas	Distribuidor*	Sitio de aplicación en humanos
L. rhamnosus GG	Valio, Helsinki, Finlandia. Campina Melkunie, Zaltbommel, Países Bajos.	Intestino
L. acidophilus NCFM	Rhodia, Madison, Wis.	Intestino
L. casei Shirota	Yakult, Tokio, Japón.	Intestino
L. reuteri MM53	BioGaia, Estocolmo, Suecia.	Intestino
L. casei CRL431	Chr. Hansen, Milwaukee, Wis.	Intestino
L. rhamnosus GR-1	Urex, Londres, Canadá	Tracto Urogenital
L. fermentum RC-14	Urex, Londres, Canadá	Tracto Urogenital

* No necesariamente el distribuidor exclusivo o dueño.

Fuente: REID, G. 1999.

Las bacterias probióticas por sí solas o en productos lácteos fermentados pueden mejorar la mala absorción e intolerancia a la lactosa. Las bacterias *S. thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus* que se emplean comúnmente para hacer el yogurt, al igual que otros lactobacilos, producen lactasa y pueden digerir lactosa en vivo en el lumen intestinal. Cuando se ingiere lactosa con o en productos que contienen organismos

⁴⁵ FULLER, R. Probiotics in human medicine. 1991. In: Gut 32:439–442.

vivos que producen lactasa, la digestión luminal aumenta y la absorción mejora. Asimismo, la ingestión de lactobacilos congelados, deshidratados o liofilizados o añadidos a un vaso de leche, producirá efectos similares a ingerir leche con lactosa hidrolizada⁴⁶.

5.6.1.3 Efectos de los probióticos en la salud. Los probióticos, junto con un rango diverso de otras bacterias, colonizan el cuerpo humano. Estas bacterias juegan un papel significativo en la fisiología humana. Por ejemplo, los probióticos han mostrado bajar el pH del tracto intestinal para que las bacterias patógenas no puedan sobrevivir. Además, creciendo bacterias beneficiosas compiten con los patógenos con los nutrientes y espacio en el tracto intestinal. Los probióticos también están asociados con prevenir la diarrea, aliviando el estreñimiento, construyendo inmunidad, previniendo la alergia de la piel y mejorando en las mujeres la salud urogenital. Además de los dos mas comunes probióticos – *L. ácidophilus* y el *B. bifidum* – otras bacterias productoras de ácido láctico han sido clínicamente estudiadas y mostrado positivamente su efecto en la salud⁴⁷.

5.6.1.3.1 Diarrea. Una investigación publicada en 2002 revisó nueve estudios sobre el efecto de *Lactobacillus* para el tratamiento de la diarrea en niños. Esta investigación concluyó que "*Lactobacillus* es seguro y efectivo como un tratamiento para los niños con diarrea infecciosa aguda".

5.6.1.3.2 Antibióticos. El propósito de los antibióticos es matar las bacterias perjudiciales, desafortunadamente, ellos frecuentemente matan también las bacterias normales, produciendo a menudo daños en la flora bacteriana, provocando la diarrea y otras perturbaciones intestinales. Reimplantando la flora con las bacterias normales durante y después de que la terapia antibiótica parece minimizar efectos disociadores del uso de antibióticos.

5.6.1.3.3 Síndrome del Intestino irritable. El síndrome del intestino irritable (IBS) es un desorden del intestino funcional que puede caracterizarse por los síntomas de dolor abdominal, calambres, gas, hinchamiento, diarrea y estreñimiento. Alguna mejora de los síntomas (principalmente de diarrea o el dolor abdominal o hinchamiento) se ha informado en estudios publicados a la fecha⁴⁸.

5.6.1.3.4 Intolerancia de lactosa. La incapacidad de algunos adultos para digerir la lactosa, o azúcar de leche, es prevaleciente mundial. Las personas de descendencia del

⁴⁶ SAAVEDRA, José. Los probióticos y la salud infantil, (visitada, viernes 27 de enero de 2006). Disponible en el Internet: <http://www.probiotics-amsterdam.org/>

⁴⁷ DAIRY MANAGEMENT INC. Journal of Dairy & foods. Issue 2, Volume 2, Fall. 2004.

⁴⁸ CDRF, DAIRY & FOOD CULTURE TECHNOLOGIES. Probiotics Basics, 2004, (visitada 12 de noviembre de 2005). Available from Internet: www.usprobiotics.org

norte de Europa son las únicas que tienen la habilidad de producir en la madurez la enzima lactasa que digiere la lactosa. El consumo de lactosa puede resultar en síntomas de diarrea, hinchamiento, dolor abdominal y flatulencia. Estos síntomas son debidos a la lactosa no digerida, que alcanza el intestino grueso y se fermentan por los microbios colónicos. El consumo de productos lácteos por las personas con intolerancia a la lactosa puede ser factible mediante la ingesta de bacterias probióticas⁴⁹.

5.6.1.4 Probióticos en productos alimenticios. “En el caso de productos alimenticios, el nivel de bacterias viables no se indica normalmente. Los niveles exigidos de 0.1-10 billón son comunes en los productos de suplemento dietético. En los productos lácteos, generalmente la leche con probióticos contienen aproximadamente 200 - 300 millones por taza”⁵⁰.

5.6.2 Prebióticos. El término prebiótico se introdujo por Gibson y Roberfroid quién intercambió “pro” por “pre,” el cual significa “antes de” o “para.” Ellos definieron prebióticos como “un ingrediente de comida no digerible que beneficiosamente afecta al huésped estimulando el crecimiento selectivamente y/o actividad de una o un número limitado de bacterias en el colon.” Esta definición coincide más o menos con la definición de fibra dietética, con la excepción de su selectividad con ciertas especies. Esta selectividad se mostró para bifidobacteria que se puede promover por la ingestión de sustancias como fructooligosacaridos e inulina y oligosacaridos de la soja⁵¹.

5.6.3 Simbióticos. “El término simbiótico se usa cuando un producto contiene ambos probióticos y prebióticos”⁵².

En ciertas leches fermentadas (probióticos) las bacterias ácido lácticas producen prebióticos tales como los oligosacaridos. Este efecto combinado se conoce como simbiotismo, y teóricamente podría mejorar la sobrevivencia e implantación de suplementos dietéticos de microbios vivos. Las leches fermentadas pueden ser útiles como probióticos o simbióticos ya que proveen tanto bacterias vivas benéficas, como productos de fermentación que pueden afectar de manera positiva la microflora intestinal⁵³.

⁴⁹ CDRF, DAIRY & FOOD CULTURE TECHNOLOGIES. Op. Cit., p. 23.

⁵⁰ Ibid., p. 23.

⁵¹ GIBSON, GR., *et al.* Dietary modulation of the human colonic microbiota. Introducing the concept of prebiotics. In: The Journal of Nutrition. 1995, p 125:1401–12.

⁵² SCHREZENMEIR, Jürgen, *et al.* Probiotics, prebiotics, and synbiotics - approaching a definition. In: The American Journal of Clinical Nutrition, 2001; 73 (suppl): 361S–4S.

⁵³ RAMÍREZ, C. Manual de metodologías para el seguimiento del proceso de fermentación láctica. Universidad del Valle. Departamento de ciencia y tecnología de alimentos. 2000.

5.7 SUSTRATOS PARA LA FERMENTACIÓN INDUSTRIAL

Los medios utilizados en el cultivo de los microorganismos contienen todos los elementos en una forma adecuada para la síntesis del material celular y para la producción de productos metabólicos. En la investigación de laboratorio con microorganismos pueden utilizarse productos químicos definidos puros para la obtención de medios de cultivo, pero en las fermentaciones industriales, se utilizan frecuentemente, por motivos económicos, sustratos complejos, casi indefinibles⁵⁴.

En muchos casos los ingredientes de los medios son subproductos de otras industrias y son extremadamente variados en composición. Entonces, las recomendaciones para el desarrollo de las cepas y el control de la fermentación son las siguientes:

- Un medio de cultivo bien equilibrado es obligatorio para conseguir el óptimo resultado, debe utilizarse si fuera necesario un suplemento de elementos críticos. Los medios de cultivo podrían optimizarse utilizando métodos estadísticos en programas diseñados por ordenador.
- La composición de los medios de cultivo debe ser constantemente adaptada al proceso de fermentación. Los lotes nuevos de los sustratos tienen que ser evaluados cuidadosamente en fermentaciones de prueba antes de que puedan ser utilizados en la producción.
- En las fermentaciones de prueba además del rendimiento de producto, debe examinarse la recuperación de producto.
- Si la represión catabólica o la represión por fosfato no pueden ser eliminadas por optimización de los nutrientes del medio o por manejo adecuado de la fermentación (por ej., mediante alimentación), deben utilizarse como cepas de producción mutantes derregulados.

Además de los costos del material y del rendimiento de producto, debe considerarse si los materiales utilizados son fácilmente disponibles en cantidad suficiente sin altos costos de transporte y si las impurezas dificultaran la recuperación del producto o aumentarán los costos de recuperación del producto⁵⁵.

Para los nutrientes que pueden necesitar los microorganismos es posible efectuar la distinción de las siguientes categorías de componentes:

5.7.1 Macronutrientes. Agregados en cantidades de gramos por litro que están representados por las fuentes de C, N, S, P, K y Mg.

⁵⁴ BAYONA, Martin, *et al.* Microorganismos de interes industrial Manual de laboratorio. Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias, Departamento de Microbiologia. Santa fe de Bogota, 2001.

⁵⁵ CRUEGER, W., Crueger, A. Biotecnologia: Manual de Microbiologic Industrial. Ed. Acribia, 3ed. Zaragoza. España. 1993.

5.7.1.1 Sustratos utilizados como fuente de carbono. Los requerimientos de carbono están determinados por el tipo de metabolismo celular, ya sea autotrófico, que corresponde a los microorganismos que obtienen el carbono del CO₂ como las algas y algunas bacterias, y los heterotróficos que necesitan compuestos orgánicos como fuente de carbono (Ertola, R. *et al.*). Los carbohidratos son tradicionalmente las fuentes de energía en la industria de fermentación. Por razones económicas la glucosa o la sacarosa puras rara vez son utilizadas como única fuente de carbono excepto en los procesos que exigen el control exacto de la fermentación, por lo tanto se suele utilizar los coproductos de la obtención de sacarosa, como es el caso de la melaza⁵⁶.

- **Melaza.** “Es el subproducto constituido por el residuo de jarabe recogido durante la fabricación o el refinado del azúcar procedente de la caña de azúcar (*Saccharum officinarum* y especies afines)”⁵⁷. Es una de las fuentes mas baratas de carbohidratos. Además de una gran cantidad de azúcar, las melazas contienen sustancias nitrogenadas, vitaminas y elementos traza. Sin embargo la composición de las melazas varia dependiendo de la materia prima utilizada para su producción. “Existen considerables variaciones en la calidad de las melazas dependiendo de la localidad, las condiciones climáticas y el proceso de producción en cada factoría individual”⁵⁸. “La melaza sin diluir se sitúa, generalmente, entre 80-90 °Brix. La melaza sin clarificar, se prepara mediante la inversión parcial del jugo de caña de azúcar para evitar la cristalización de la sacarosa, concentrándolo hasta 80-85 °Brix”⁵⁹.
- **Miel de panela.** Es la miel obtenida por la evaporación del agua contenida en los jugos de caña por calentamiento a 96°C. Esta operación se llevan a cabo en pailas o fondos dispuestos en línea, que reciben diferentes denominaciones técnicas y regionales. Entre los carbohidratos, el azúcar sacarosa es el principal constituyente de la miel de panela, con un contenido que varía entre 75 y 85% del peso seco. Por su parte, los azúcares reductores (entre 6 y 15%), poseen una disponibilidad de uso inmediato para el microorganismo, lo cual representa una gran ventaja energética, estos son fácilmente metabolizados, transformándose en energía necesaria requerida⁶⁰.

5.7.1.2 Sustratos utilizados como fuente de nitrógeno. Las fuentes de nitrógeno pueden ser de naturaleza inorgánica u orgánica. El nitrógeno es utilizado para la biosíntesis de proteínas, ácidos nucleicos y polímeros de la pared celular. Para la

⁵⁶ MADIGAN, M. *et al.* Op. cit., p. 31.

⁵⁷ TOMMIE, G. Tecnología para la fabricación de alimentos balanceados. Colombia: AFIA, 1994, p. 78

⁵⁸ CRUEGER, W., Crueger, A. Op. cit, p. 40.

⁵⁹ LINDSEY, J. y Smith, P. Cuadernillos agropecuarios para extensionistas. Chile: Fao, 1990.

⁶⁰ FEDEPANELA. Proceso de elaboración de la panela. (Visitada viernes 23 de febrero de 2007); disponible en Internet: www.fedepanela.org.co.

síntesis de proteína se requieren en general L-aminoácidos, aunque también son necesarios algunos aminoácidos de la serie D como D-alanina y D-aspartico para su incorporación a la pared de las células. Muchos procesos a gran escala utilizan amonio, sales, urea o amonio gaseoso como fuentes de nitrógeno. Las fuentes de nitrógeno comúnmente utilizadas son, soya, leche, suero, harina de yuca, entre otras⁶¹.

- **Harina de soya.** “El residuo de las judías de la soya después de la extracción del aceite de soya es un sustrato complejo. El análisis muestra un contenido de proteína del 50%, un contenido en carbohidratos del 30 % (sacarosa, estaquiosa, rafinosa, arabinoglucano, arabinano y polisacáridos ácidos), 1% de grasa residuales y 1,8 % de lecitina”⁶².
- **La leche.** “Es el líquido secretado por las glándulas mamarias, tanto del ser humano (leche de mujer o leche humana), como de las hembras de animales mamíferos, cuyo fin es servir de alimento al recién nacido. En términos lactológicos, el concepto de leche se refiere únicamente a la leche de vaca, obtenida como materia prima (leche cruda) en las explotaciones agrícolas”⁶³. “Los nutrientes de la leche generalmente se encuentran dentro de intervalos, según se muestra en la cuadro 3, debido a las diferentes razas de mamíferos que la producen y a las diferentes etapas de producción de los mismos. No obstante, también se observa que los componentes de la leche se pueden dividir en tres grandes grupos: agua, sólidos grasos y sólidos no grasos”⁶⁴.

Cuadro 3. Composición general de la leche de vaca ⁽¹⁾.

Constituyente	Valores (%)	
	Menor	Mayor
Agua	70,00	90,50
Grasa ⁽²⁾	2,20	8,00
Proteínas ⁽³⁾	2,70	4,80
Carbohidratos (Lactosa) ⁽³⁾	3,50	6,00
Cenizas ⁽³⁾	0,65	0,9
Sólidos totales	9,05	19,70

⁽¹⁾ Fuente: REVILLA, A. 1985.

⁽²⁾ Sólidos grasos 3.80% de la leche.

⁽³⁾ Sólidos no grasos 9.20% de la leche.

- **Suero de leche.** “Es un producto derivado de la elaboración de queso. Contiene gran cantidad de constituyentes nutricionales como la lactosa, albúmina, y la mayor parte de los minerales de la leche. Además, presenta características funcionales para ser

⁶¹ ERTOLA, Rodolfo, *et al.* Monografía Microbiología Industrial. s.l.

⁶² CRUEGER, W., Crueger, A. Op. cit., p. 40.

⁶³ SPREER, E. Lactología Industrial. Editorial Acribia, Zaragoza, España. 1991.

⁶⁴ REVILLA, A. Tecnología de la leche; procesamiento Manufactura y Análisis. IICA. San José, Costa Rica, 1985. p. 399

procesado como alimento para la humanidad”⁶⁵. Por otra parte “el suero representa cerca del 82.2% del volumen total de leche utilizado en la producción de quesos”⁶⁶. “La composición del suero (Tabla 4) varía dependiendo del tipo de queso del cual sea coproducto”⁶⁷.

Cuadro 4. Composición general del suero lácteo.

Constituyente	Suero (%)	
	Dulce	Ácido
Agua	93 – 94	94 – 95
Grasa	0,2 – 0,7	0,04
Proteínas	0,8 – 1,0	0,8 – 1,0
Carbohidratos (Lactosa)	4,5 – 5,2	4,5 – 5,0
Cenizas	0,05	0,40
Sólidos totales	5,6 – 6,8	5,7 – 6,4

Fuente: MADRID, A. 1996.

Observando los componentes nutritivos tales como proteínas carbohidratos y minerales que el suero ofrece se puede destacar que el suero es una materia prima de alta calidad nutritiva para la alimentación humana y como fuente de nitrógeno en fermentaciones. Por lo que es recomendable procesar el suero de la manera más eficientemente posible con la finalidad de aprovechar al máximo sus componentes nutricionales. Por otra parte, “cuando el suero es desechado al ambiente, causa un impacto negativo a los sistemas acuíferos cercanos”⁶⁸.

Otros macronutrientes como el P y el S son suministrados en forma de P_0_4 H y SO_4 (o aminoácidos azufrados). El fósforo se incorpora en ácidos nucleicos, y polímeros celulares. El S es asimilado para la síntesis de aminoácidos azufrados, y además se necesita para la biotina, coenzima A, tiamina y otros componentes. Los requerimientos de K y Mg son también esenciales. Una parte importante del primero está unida al RNA de manera que los requerimientos de K aumentan con los factores que influyen en el aumento del RNA de las células, como la velocidad de crecimiento. El ión K actúa como coenzima y probablemente actúa como catión en la estructura aniónica de varios componentes celulares. El ión Mg es esencial para la estabilidad de los ribosomas y actúa como cofactor en numerosas reacciones del metabolismo. Tanto el K como el Mg se incorporan a los medios en forma de sales como fosfato y sulfato⁶⁹.

⁶⁵ JUDKINS, H; La leche; Su producción y procesos industriales. CECSA. Mexico D.F. 1984. p. 495.

⁶⁶ ALAIS, Ch. Ciencia de la Leche; Principios de Técnica Lechera. Editorial REVERTE. Barcelona, España. p. 873.

⁶⁷ MADRID, A. Curso de industrias Lácteas. Mundi-Prensa Libros S.A. Madrid, España. 1996. p. 604.

⁶⁸ ARTAVIA, Walter. Elaboración de Queso Ricotta a partir de suero lácteo. Guacimo, Costa Rica. Diciembre de 1999. Trabajo de Grado (Ingeniería Agronómica con el grado de Licenciatura).

⁶⁹ ERTOLA, Rodolfo, *et al.*, Op. cit., p. 42.

5.7.2 Micronutrientes o elementos trazas. Representados por las sales de Fe, Mn, Mo, Ca, Zn y Co que se agregan a los medios en cantidades de miligramos o microgramos por litro. Se distinguen 3 categorías:

- Los que son frecuentemente esenciales para el crecimiento como Ca, Mn, Fe, Co, Cu y Zn.
- Los que son raramente esenciales como B, Na, Al, Si, Cl, V, Cr, Ni, As, Se, Mo, Sn, e I. En general los requerimientos de trazas de elementos son conocidos cualitativamente.

A veces es difícil formular la cantidad requerida de un micronutriente porque generalmente está presente en suficiente cantidad como impureza de los componentes principales. Los requerimientos de éstos compuestos pueden aumentar varias veces cuando el cultivo ha estado sujeto a "strees", como por ejemplo por aumento de temperatura por encima de un valor óptimo dado.

- Factores de crecimiento, que están constituidos generalmente por componentes orgánicos suministrados en baja concentración y que no son sintetizados ni metabolizados por las células, sino incorporados a estructuras celulares y de función metabólica específica, como vitaminas, algunos aminoácidos, ácidos grasos no saturados, etc. Comprenden ciertos aminoácidos y vitaminas del grupo B como tiamina, riboflavina, ácido pantotético, niacina, etc., que representan para muchas bacterias y levaduras factores esenciales en los medios sin los cuales no se produce crecimiento celular. La mayor parte de las vitaminas son constituyentes de coenzimas. Otros factores de crecimiento son las purinas, poliaminas, putrescinas, etc.⁷⁰.

Además los medios pueden clasificarse, considerando la naturaleza química de los componentes, en:

- Medios sintéticos o medios químicamente definidos.
- Medios complejos, en cuya composición intervienen sustancias de origen animal o vegetal como peptonas, extracto de levadura, macerado de maíz, harina de soja, etc., que aportan los nutrientes fundamentales ya mencionadas, pero que son químicamente indefinidas y de composición variable⁷¹.

5.8 CRECIMIENTO MICROBIANO.

Se define como el aumento del número de microorganismos a lo largo del tiempo. Cuando se siembran microorganismos en un medio de cultivo apropiado, los mismos comienzan a dividirse activamente empleando los nutrientes que le aporta el medio de cultivo para "fabricar" nuevos microorganismos. Este proceso continúa hasta que algún nutriente del medio de cultivo se agota (sustrato limitante) y el crecimiento se detiene. También puede detenerse el crecimiento por acumulación de alguna sustancia

⁷⁰ MADIGAN, M. *et al.* Op. cit., p. 31.

⁷¹ BAYONA, Martin, *et al.* Microorganismos de interés industrial Manual de laboratorio. Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias, Departamento de Microbiología. Santa fe de Bogota, 2001.

inhibidora formada por los mismos microorganismos, pero supóngase por ahora que éste no es el caso y que la primera alternativa es la válida. Y hay dos aspectos claramente diferenciados que hacen al crecimiento microbiano: uno *estequiométrico*, por el cual la concentración final de microorganismos obtenidos dependerá de la concentración y composición del medio de cultivo, y el otro *cinético*, el que dirá con qué velocidad se lleva a cabo el proceso.

5.8.1 Estequiometría del crecimiento microbiano. La aplicación de la estequiometría requiere conocer los rendimientos. Estos se definen como la relación entre el producto obtenido y el sustrato consumido (usualmente la fuente de carbono y energía). El rendimiento celular se define como:

$$Y_{x/s} = - \frac{\Delta X}{\Delta S}$$

X y S representan la concentración de biomasa y sustrato respectivamente. Si además de microorganismos se forma algún producto en particular, el rendimiento en producto estará dado por:

$$Y_{p/s} = - \frac{\Delta P}{\Delta S}$$

P y S representan la concentración de Producto y sustrato respectivamente.⁷²

5.8.2 Cinética de crecimiento. Si la bacteria crece en un medio líquido, en la mayoría de los casos las células que se producen en cada división continúan su vida independientemente formándose una suspensión de células libres.

En un cultivo discontinuo de bacterias en medio líquido, se pueden diferenciar cuatro fases en la evolución de los parámetros que miden el crecimiento microbiano:

- **Fase lag o de adaptación** durante la que los microorganismos adaptan su metabolismo a las nuevas condiciones ambientales (abundancia de nutrientes y condiciones de cultivo) para iniciar la fase de crecimiento exponencial.
- **Fase exponencial o logarítmica:** en ella la velocidad de crecimiento es máxima y el tiempo de generación es mínimo. Durante esta fase las bacterias consumen a velocidad máxima los nutrientes del medio. La evolución del número de células durante esta fase se explica con los modelos matemáticos que describiremos a continuación.
- **Fase estacionaria:** en ella no se incrementa el número de bacterias (ni la masa u otros parámetros del cultivo). Las células en fase estacionaria desarrollan un metabolismo diferente al de la fase exponencial y durante ella se produce una acumulación y liberación de metabolitos secundarios que pueden tener importancia

⁷² ERTOLA, Rodolfo, *et al.* Op. cit., p. 42.

industrial. Los microorganismos entran en fase estacionaria porque se agota algún nutriente esencial del medio o porque los productos de desecho que han liberado durante la fase exponencial hacen que el medio sea inhóspito para el crecimiento microbiano. La fase estacionaria tiene gran importancia porque probablemente represente con mayor fidelidad el estado metabólico real de los microorganismos en los ambientes naturales.

- **Fase de muerte:** se produce una reducción del número de bacterias viables del cultivo.⁷³

Debido a la naturaleza autocatalítica del crecimiento microbiano, es lógico suponer que la concentración de microorganismos, X , influye en la velocidad con que aumenta la población, r_x . Así:

$$r_x = \mu X$$

En esta ecuación, μ es la velocidad específica de crecimiento, la cual para un tipo de microorganismo dado depende principalmente de la composición y concentración del medio de cultivo, presencia de inhibidores, temperatura y pH.

Existen diversas expresiones para μ : la más difundida es la ecuación de Monod, que relaciona el valor de μ con la concentración de un componente del medio de cultivo que está en defecto respecto de los requerimientos del microorganismo: el sustrato limitante.

Ecuación de Monod:

$$\mu = \mu_m \frac{S}{K_s + S}$$

Donde, S es la concentración de sustrato limitante, μ_m es la velocidad de crecimiento específica máxima, y K_s se conoce como constante de saturación. El valor de K_s está inversamente relacionado con la afinidad del microorganismo por el sustrato.

Suponiendo que no se forma producto y que la relación μ - S puede ser representada por la ecuación de Monod surge que:

$$\frac{dX}{dt} = \mu_m \frac{XS}{K_s + S}$$

Cuando $S \gg K_s$, μ toma el valor de μ_m y r_x sólo depende de X , entonces:

$$\frac{dX}{dt} = \mu_m X$$

Integrando la ecuación anterior durante el tiempo de cultivo, se transforma en la siguiente función exponencial:

$$X = X_0 e^{\mu_m t}$$

⁷³ MADIGAN, M. *et al.* Op. cit., p. 31.

La transformación de esta ecuación en una recta (tomando logaritmos) rinde lo siguiente:

$$\ln X = \ln X_0 + \mu_m t$$

Esto es: el incremento del logaritmo del número de células aumenta linealmente con el tiempo siendo la constante de proporcionalidad μ_m . Con la ecuación anterior es posible calcular el valor de μ_m graficando el $\ln X$ en función del tiempo.⁷⁴

Las bacterias crecen siguiendo una progresión geométrica en la que el número de individuos se duplica al cabo de un tiempo determinado denominado tiempo de generación

(τ). De esta forma, podemos calcular el número de bacterias (X) al cabo de un número de generaciones (n) usando la ecuación siguiente:

$$X = X_0 2^n$$

Siendo X_0 el número de células en el momento actual. El número de generaciones se puede calcular de la siguiente forma:

$$n = t / \tau$$

Donde t es el tiempo transcurrido.

Por consiguiente, combinando las dos ecuaciones anteriores:

$$X = X_0 2^{t/\tau}$$

Las ecuaciones exponenciales son muy difíciles de manejar gráficamente, por ello es mejor transformarlas en otras más simples. Para transformar una ecuación exponencial en una recta, tomamos logaritmos en los dos términos y resulta:

$$\ln X = \ln X_0 + (t/\tau) \ln 2$$

Esto es: el logaritmo del número de células crece linealmente con el tiempo a razón de una constante igual a $\ln 2/\tau$. Si el tiempo de generación τ es muy grande, el crecimiento tendrá poca pendiente (será lento) y si τ es pequeño el crecimiento será rápido.

Comparando las dos ecuaciones logarítmicas, se puede concluir que $\mu = \ln 2/\tau$ y, por consiguiente, que $\tau = \ln 2/\mu$. Es decir, que hay una correlación inversa entre el valor de la tasa de crecimiento (μ) y el tiempo de generación (τ)⁷⁵.

5.9 PERIODO DE VIDA ÚTIL

Se define como la Duración sanitaria, periodo durante el cual el producto, después de su fabricación, conserva sus características organolépticas, fisicoquímicas y microbiológicas

⁷⁴ DORAN, Pauline. Principios de ingeniería de los bioprocesos. Editorial ACRIBIA, S.A., España. 1995.

⁷⁵ ERTOLA, Rodolfo, *et al.*, Op. cit., p. 42.

que lo hacen apto para el consumo sin deterioro de su valor nutritivo. Para efectos de los derivados lácteos estos tienen una duración sanitaria de acuerdo a la siguiente tabla.

Cuadro 5. Periodo de vida útil.

Producto	DURACIÓN SANITARIA
Arequipe y manjar blanco. presentados en envase no hermético	60 días
Arequipe y manjar blanco. presentados en envase hermético	90 días
Crema de leche pasteurizada. refrigerada	21 días
Leche con saborizantes, pasteurizada, refrigerada.	2 días
Leche en polvo azucarada presentada en envases de polietileno grado alimenticio	60 días
Mezcla base pasteurizada para helados mantenidos entre 0°C y 4°C	15 días
Mantequilla pasteurizada. refrigerada	60 días
Postre de leche y flanes pasteurizados presentados en envase no hermético. refrigerados	15 días
Postres de leche y flanes. pasteurizados presentados en envase hermético. refrigerados	21 días
Queso fresco -Requesón- en envase plástico. refrigerado	30 días
Queso fresco, presentado en empaques herméticos. refrigerado	18 días
Queso fresco, empacado al vacío. refrigerado	30 días
Queso fresco, de pasta cocida, refrigerado.	30 días
Quesos madurados, semiduros y duros.	90 días
Queso fundido, empacado en aluminio o plástico	90 días
Quesos semimadurados, refrigerados	60 días
Quesos madurados, semi blandos y blandos.	60 días
Yogur y kumis, presentados en envase no hermético, refrigerados.	15 días

Fuente: Resolución 02310 del 24 de Febrero de 1986. (Visitada viernes 23 de febrero de 2007); disponible en Internet: www.invima.org

5.10 INGREDIENTES Y ADITIVOS QUE PUEDEN EMPLEARSE EN LA LECHE FERMENTADA

Cuadro 6. Ingredientes y aditivos que pueden emplearse en la leche fermentada.

Ingredientes	Aditivos	
	Gelificantes, Emulsificantes.	Estabilizantes
Leche entera.	Solos o en mezcla en una cantidad máxima de 5 g/kg	Solos o en mezcla en una cantidad máxima de 10g/kg
Leche en polvo.	Ácido algínico y sus sales de amonio, calcio, potasio y propilenglicol.	Carbonato de calcio, potasio y sodio
Otras fuentes de Proteínas diferentes a la leche.	Agar	Cifrra de calcio, potasio y sodio
Azúcares.	Carboximetil celulosa de Sodio	Ortofosfato de potasio y sodio
Suero de leche.	Carragenina	Polifosfato de potasio, sodio y calcio
Frutas o concentrados de frutas.	Goma Guar	
Cultivos lácticos específicos, característicos de cada producto.	Goma Arábica	
Otros cultivos lácticos para dar características especiales al producto.	Goma Karaya	
	Goma Xantan	
	Gelatina	
	Pectina	

Fuente: Resolución 02310 del 24 de Febrero de 1986. (Visitada viernes 23 de febrero de 2007); disponible en Internet: www.invima.org

6. DISEÑO METODOLÓGICO

El desarrollo del presente trabajo se realizó en cuatro fases:

FASE I. Se activo y conservo la cepa de *Lactobacillus casei subsp. rhamnosus*, a continuación se estandarizó la cantidad óptima de inóculo para iniciar la fermentación en el sustrato control miel de panela-leche en polvo fermentado con *Lactobacillus casei subsp. rhamnosus*.

FASE II. Con el sustrato control se determinó la cinética de crecimiento y diferentes parámetros de fermentación *in batch* como producción de ácido láctico, consumo de azúcares, producción de proteína, formación de biomasa y pH.

FASE III. Se optimizó un sustrato para la producción de biomasa de *Lactobacillus casei subsp. rhamnosus* teniendo en cuenta parámetros de fermentación, costos y análisis sensorial.

FASE IV. Se realizó un seguimiento microbiológico, físicoquímico y organoléptico en la vida de anaquel al mejor sustrato fermentado.

6.1 FASE I

La cepa a utilizar ha sido empleada en varios estudios previos como en el de Pazos, A, y en el de Montes, A *et al.*, en las cuales se ha caracterizado y se han descrito sus propiedades probióticas, fermentativas y antagónicas sobre diferentes tipos de microorganismos.

6.1.1 Activación y conservación de *Lactobacillus casei subsp. rhamnosus*. Se activó el *Lactobacillus casei subsp. rhamnosus* a partir de un preservado criogénico, en caldo MRS (Man, Rogosa et Sharpe) (OXOID) incubándolo por un periodo de 20-24 horas a 35-37°C, luego se realizó un repique de 10 % (V/V) en caldo MRS y se incubó a las mismas condiciones iniciales. Posteriormente se repicó en cajas con agar MRS azul de anilina y se incubó por 20 horas a 35-37°C, después de este tiempo se realizó una tinción de Gram, para constatar que las cepas son morfológicamente compatibles. Y por último se conservaron en agar MRS glucosa para construir un stock reciente, el cual se construyó inoculando colonias aisladas del medio agar MRS azul de anilina, en profundidad y en superficie en tubos inclinados que contenían MRS glucosa 5 g/L mas agar al 1,5 %, estos preservados fueron utilizados como cepas de trabajo, se incubaron por 20-24 horas a 35-37°C, y se almacenaron a 4 °C.

6.1.2 Cultivo del Inóculo. El inóculo se preparó activando la cepa proveniente de un stock reciente en caldo MRS comercial (OXOID). Para tal efecto se inoculó una asada del preservado en un erlenmeyer que contenía 40 mL de caldo MRS comercial (OXOID) estéril. Se incubó por 24 horas a 35 ó 37 °C. Nuevamente se realizó un repique de 4 mL de

este caldo a otros 40 mL de caldo MRS comercial (OXOID) estéril y se incubó en las mismas condiciones.

Según Crueger y Crueger (1993) el porcentaje de inóculo se debe ajustar al 10 % (V/V) para iniciar la fermentación, de igual forma este porcentaje ha sido utilizado con buenos resultados en las investigaciones de Montes, A *et al.* 2003, y Guerrero, M. *et al.* 2002.

Después se preparó un inóculo con el sustrato a fermentar, inoculando al 10 % (V/V) el caldo MRS de la fermentación anterior, incubándolo en las mismas condiciones anteriores. Después de este tiempo se calculó el número de bact/mL. De esta manera se preparó el inóculo inicial para realizar los ensayos de fermentación en los diferentes sustratos.

A continuación se realizó una estandarización del inóculo en la cual se determinó que cantidad de bact/mL es la óptima para iniciar la fermentación, esta estandarización se realizó en el medio miel de panela-leche en polvo, partiendo de la población $4,65 \times 10^8$ bact/mL, siendo esta la población obtenida después de 24 horas de fermentación de este sustrato, la cual se determinó tomando 1 mL del inóculo miel de panela-leche en polvo y se vertió en 9 mL de solución peptonada, de esta solución se tomó 0,1 mL y se observó en la cámara de Neubauer. Teniendo en cuenta esta población se realizaron cinco ensayos con las siguientes cantidades de población bacteriana:

Cuadro 7. Ensayos para estandarización del inóculo.

Ensayo	Población bacteriana (Bact/mL)
1	$4,65 \times 10^8$
2	11×10^7 *
3	$4,65 \times 10^7$
4	11×10^6
5	$4,65 \times 10^6$

* Valor recomendado por Montes, A *et al.* 2003.

Para reducir la población bacteriana de la establecida se adicionó caldo estéril teniendo en cuenta la siguiente fórmula:

$$C_1 V_1 = C_2 V_2$$

Donde,

C₁: Concentración inicial (bact/mL)

V₁: Volumen de inóculo (mL)

C₂: Concentración final (bact/mL) $4,65 \times 10^8$ bact/mL

V₂: Volumen Total (mL) (Caldo estéril + V₁)

Para determinar cual es la cantidad óptima de inóculo para iniciar la fermentación se determinó la cinética de cada ensayo, evaluando densidad óptica versus tiempo.

6.2 FASE II

6.2.1 Fermentación. Se llevó a cabo en un biorreactor de 500 mL en un proceso *in batch*, proporcionando condiciones controladas, temperatura 35 ó 37 °C y agitación constante, las cuales aseguraron el crecimiento eficaz del *Lactobacillus casei subsp. rhamnosus* mejorando el rendimiento metabólico y de esta manera lograr una mayor confiabilidad en parámetros de fermentación.

Se preparó el medio control en matraz y se esterilizaron en autoclave a 121 °C y 15 psi por 15 min. Los medios que contenían leche se esterilizaron sin ella, ya que sus proteínas se pueden desnaturalizar. Este mismo procedimiento se realizó para todos los sustratos.

A continuación, se inoculó la bacteria al 10% (V/V) en cámara de flujo laminar tipo II y se incubó con agitación constante en plancha magnética rotacional (Multi 15 Stirrer VELP Científica), previa homogenización. Se tomaron muestras por duplicado en tiempo cero y subsecuentemente en lapsos de una hora hasta las 24 horas. La medición de pH se realizó en pH-metro digital (691 pH Meter Metrhom), la absorbancia de la suspensión celular se determinó en el espectrofotómetro (Portable Datalogging Spectrophotometer HACH DR/ 20-10) a una longitud de onda de 460 nm (Montes, A *et al.* 2003), se realizaron diferentes diluciones para obtener una lectura correcta, 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} . Con los datos de absorbancia se determinó la cinética de crecimiento, además se conoció el tiempo de duplicación y se trazo la curva de crecimiento exponencial.

Los azúcares totales se determinaron por el método de Antrona o Dubois ver anexo A, la determinación de proteínas totales se realizó por el método de Lowry Modificado ver anexo B, del ácido láctico por el método de titulación ver anexo C y la biomasa se determinó por recuento en placa ver anexo D.

El tiempo de cosecha se determinó donde hubo la mayor producción de proteínas, formación e biomasa y cuando el crecimiento exponencial comenzó a detenerse.

6.3 FASE III

6.3.1 Composición de los Sustratos.

Cuadro 8. Composición de los sustratos.

COMPONENTES		MEDIOS			
		Control	1	2	3
Aforar con Agua destilada a 1000 mL. [®]					
Citrato de Amonio 2 g. [®]					
Fosfato de Potasio 2 g. [®]					
Fuente de Carbono	Miel de panela 14,97 g. ^{*®}	X	X	X	X
Fuente de Nitrógeno	Leche en Polvo 72 g. ^{*®}	X			
	Leche Pasteurizada**		X		
	Leche de Soya **			X	
	Suero de Leche **				X
	Harina de Soya Hidrolizada **		X	X	X
Carbonato de Calcio 20g.*		X	X	X	X

* La cantidad en gramos de estos componentes variará dependiendo del análisis estadístico.

** Las cantidades en gramos de estos componentes dependen de su porcentaje en proteína, con relación al medio control.

Fuente: Montes, A *et al.* Op. cit., p. 1.[®]

Se utilizó miel de panela como fuente de carbono en todos los medios, debido a la escasez de melaza y a su alto costo, ocasionado principalmente por su utilización como materia prima para la producción de alcohol carburante.

La soya se utilizara en forma de harina y leche hidrolizada comercial, “como una fuente vegetal de proteínas, ya que de esta forma puede ser asimilada por los microorganismos”⁷⁶.

Las fichas de seguridad Merck para el carbonato de calcio, citrato de amonio, fosfato de potasio, se muestran en el anexo E. El carbonato de calcio, se utilizó para estabilizar el pH alterado por el ácido láctico, además, se evaluó la concentración de este componente debido a su difícil disolución en el medio lo cual afecta las características organolépticas del producto y su posible efecto en la producción de biomasa; el citrato de amonio, se utilizó como una fuente inorgánica de nitrógeno, y el fosfato de potasio como micronutriente.

A cada una de las fuentes de nitrógeno a utilizar se las comparó con la fuente modelo (leche en polvo) en cuanto a su cantidad de proteína, para otras fuentes de nitrógeno que contengan menor contenido proteico se agregara harina de soya hidrolizada con el fin de igualar el contenido proteico con la fuente modelo con base en lo anterior se propuso la cuadro 9, en la cual se realizó un balance de materia (ver anexo F), con el cual se consiguió estandarizar la cantidad final de proteína y la cantidad en gramos final de las fuentes de nitrógeno siendo estas iguales a la cantidad de leche en polvo, esto con el fin de no alterar

⁷⁶ GUERRERO, M. *et al.* Op. cit., p. 23.

la formulación del medio control y evitar que el costo final se incremente, por el uso de una cantidad excesiva de una fuente de proteína.

Cuadro 9. Composición porcentual de las fuentes de nitrógeno.

Fuente de Nitrógeno	% proteína (100g)	Gramos Aportados	Cantidad proteína (g)	Cantidad Harina Soya a agregar (g)	Cantidad proteína (g)	Cantidad proteína total (g)	Cantidad final fuente N ₂ (g)
Leche en Polvo	36	72	25,92	0	25,92	25,92	72
Leche Pasteurizada	3,1	12.63	0,39	59.37	25.7	25,92	72
Suero de Leche	12	16.79	2.01	55.21	23.91	25,92	72
Leche de soya	23,28	26,27	6,12	45,73	19,8	25,92	72
Harina de soya	43,3						

6.3.2 Diseño experimental. Después de determinado el tiempo de cosecha y de conocer la composición porcentual de las fuentes de nitrógeno, se evaluó la eficiencia de cada sustrato respecto a producción de biomasa, para lo cual se utilizó el método estadístico de superficie de respuestas para la optimización de procesos, para esto se realizó la metodología planteada por Leal-Sánchez, M. *et al.*⁷⁷, la cual propone el uso de un diseño experimental preliminar de 2^{3-2}_{III} fraccional factorial de dos niveles, de acuerdo a este diseño se seleccionaron las variables que presentaron mayor influencia en la maximización de la biomasa. A continuación se realizó un nuevo diseño experimental 3^{2-1}_{III} fraccional factorial de tres niveles, con el cual se evaluó la producción de biomasa, la aceptación global (análisis sensorial) y el análisis económico. Con este experimento se construyeron las superficies de respuesta y se analizaron los efectos para cada respuesta, se obtuvo un sustrato en el cual se maximizó la producción de biomasa, la aceptación global y se minimizó el costo, es decir se obtuvo un sustrato óptimo por cada fuente de proteína. Posteriormente, para elegir el mejor sustrato se le asignó una ponderación a cada una de las respuestas que se evaluaron, a la biomasa se le asignó un ponderado de 50 %, debido a que se debe asegurar una cantidad alta de bacterias para garantizar que el producto tenga el efecto deseado, en cuanto a la aceptación global se le asignó una ponderación del 35 %, teniendo en cuenta que el consumidor final busca un producto con un buen sabor. El peso asignado al análisis económico fue el mas bajo 15%, ya que el consumidor final, no le importaría el precio siempre y cuando se garantice un producto de excelentes características, en este caso un nivel optimo de biomasa.

⁷⁷ LEAL-SÁNCHEZ, M. *et al.* Optimization of Bacteriocin Production by Batch Fermentation of *Lactobacillus plantarum* LPCO10. In: Applied And Environmental Microbiology, Sept. 2002, Vol. 68, No. 9 p. 4465–4471.

En cuanto al análisis económico se tuvo en cuenta los costos asociados a la producción de biomasa del *Lactobacillus casei subsp. rhamnosus*, los cuales son la materia prima e insumos.

Para realizar el análisis sensorial se utilizó una escala hedónica verbal y grafica de 5 puntos, la escala que se utilizó se muestra a continuación:

Figura 1. Escala hedónica verbal y grafica de 5 puntos.



Fuente: Anzaldúa-Morales.1994.

La evaluación fue realizada por “25 personas para que la prueba tenga validez, las cuales se eligieron al azar”⁷⁸. El cuestionario utilizado para la evaluación se muestra en el anexo G. Para evitar que se produzca algún sesgo en la evaluación, esta se realizó entre las 11 de la mañana y la 1 de la tarde, además, para reducir el sabor residual de las muestras, “entre cada una los panelistas debían comer un galleta de sal y luego un sorbo de agua”⁷⁹.

6.4 FASE IV

Después de encontrar el mejor sustrato en el cual se maximice la biomasa, la aceptación global y se minimice el costo, se realizó el seguimiento del producto en la vida de anaquel, realizando para esto diferentes pruebas microbiológicas y fisicoquímicas establecidas por el INVIMA para bebidas lácteas, las cuales se describen en la cuadro 9 y 10, las evaluaciones se realizaron cada 5 días hasta que el producto supere los límites establecidos. Para el seguimiento organoléptico se realizaron análisis sensoriales periódicos para evaluar la aceptación de la bebida entre los consumidores. También se realizó el conteo en cámara de Neubauer, el cual debe ser superior a $9,8 \times 10^6$ Bact/mL, ya que esta concentración es la mejor para inhibir el crecimiento de *Helicobacter pylori* como lo afirma Montes, A. *et al.*⁸⁰, si el número de bacterias es inferior al mencionado, el seguimiento del producto en la vida de anaquel culminará, debido a que ésta es una característica fundamental en el producto final.

⁷⁸ Rojas, Ana. Módulo de Evaluación Sensorial. Editorial UNISUR. Bogotá. 1986.

⁷⁹ Anzaldúa-Morales. La evaluación sensorial de los alimentos en la teoría y la práctica. Editorial ACRIBIA, S.A., España. 1994.

⁸⁰ Montes, A *et al.* Op. cit., p. 22.

Cuadro 10. Características Fisicoquímicas del yogur.

Característica	Entero	Semidescremado	Descremado
Acidez como ácido láctico %	0,70-1,50	0,70-1,50	0,70-1,50

Fuente: INVIMA

Cuadro 11. Características Microbiológicas del yogur.

Característica	m	M
NMP Coliformes <i>totales</i> /g	20	93
NMP Coliformes <i>fécales</i> /g	<3	-
Hongos y levaduras/g	200	500

Fuente: INVIMA

Para identificar los índices permisibles señalados se adoptan las siguientes convenciones:

m: Índice máximo permisible para identificar nivel de buena calidad.

M: Índice máximo permisible para identificar nivel de calidad aceptable.

Al mejor sustrato, se le determinó los diferentes parámetros de fermentación, con el fin de confirmar los datos de optimización que se obtuvo del diseño experimental, y además para conocer el comportamiento del *Lactobacillus casei subsp. rhamnosus* en este sustrato fermentado.

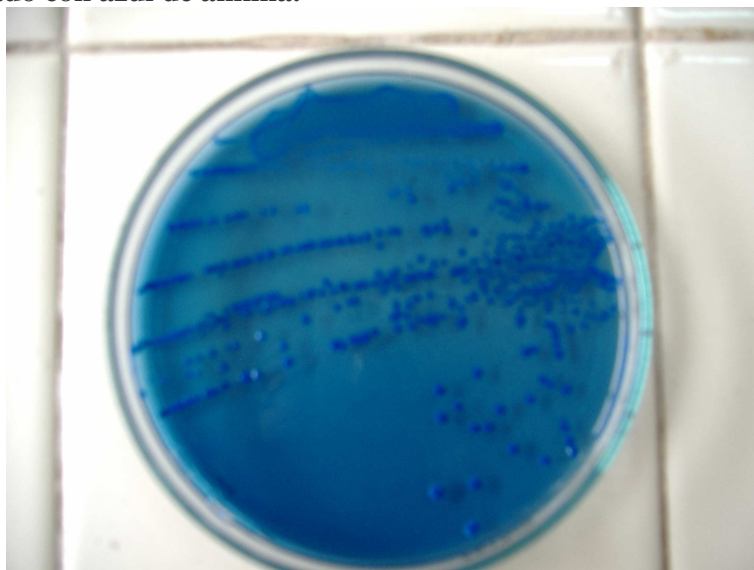
7. PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

7.1 FASE I

7.1.1 Activación y conservación de *Lactobacillus casei subsp. rhamnosus*. La cepa de *Lactobacillus casei subsp. rhamnosus* proviene del trabajo “Protección intestinal contra patógenos específicos a través de sustratos fermentados con *Lactobacillus casei subsp. rhamnosus*”⁸¹. Esta cepa se activo completamente de 20 a 24 horas en caldo MRS comercial (OXOID) estéril. Se realizo su cultivo en Agar MRS modificado con azul de anilina para constatar su morfología tanto macroscópica como microscópica y mediante coloración de Gram se confirmó su pureza.

En el medio MRS modificado con azul de anilina se observaron colonias pequeñas, convexas, brillantes y cremosas, características de esta bacteria. Ver figura 2.

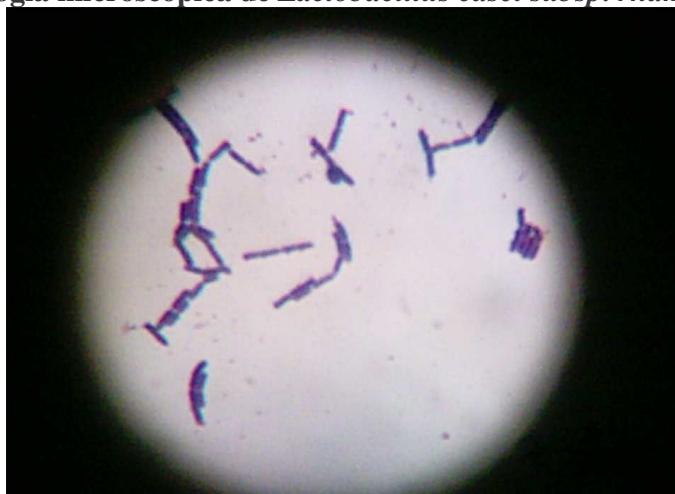
Figura 2. Morfología macroscópica de *Lactobacillus casei subsp. rhamnosus*, en medio MRS modificado con azul de anilina.



Con la tinción de Gram se observaron bacilos cortos Gram positivos, formando empalizadas, ver figura 3.

⁸¹ PAZOS, M. Álvaro Jairo. Op. Cit., p. 22.

Figura 3. Morfología microscópica de *Lactobacillus casei subsp. rhamnosus*.



Para la estandarización de la cantidad óptima de inóculo para iniciar la fermentación en el sustrato miel de panela-leche en polvo, fermentado con *Lactobacillus casei subsp. rhamnosus*, se determinó la cinética de crecimiento en cada ensayo desde el tiempo cero, cada 2 horas, por espacio de 11 horas. Para el inóculo 3 la fase exponencial es estable, ya que la producción de biomasa aumenta con el tiempo como también lo afirma Montes, A *et al*⁸², hasta casi llegar a la fase estacionaria como se observa en la figura 5, por el contrario en los otros inóculos se observa que la fase exponencial no ha terminado, lo cual incrementaría el tiempo de cosecha, ya que los microorganismos continúan con su crecimiento y por lo tanto con la formación de biomasa. “El tiempo de cosecha debe estar durante la fase exponencial y no en la fase estacionaria ya que, en esta ultima un nutriente esencial del medio de cultivo se usa y llega a ser un factor limitante de crecimiento o bien se acumulan en el medio algunos productos de desecho hasta niveles inhibitorios que hace que cese el crecimiento y además conlleva a una degeneración genética”⁸³.

Para la determinación de las constantes cinéticas (μ , td) se utilizaron las ecuaciones y la metodología planteada en el parágrafo 5.8.2.

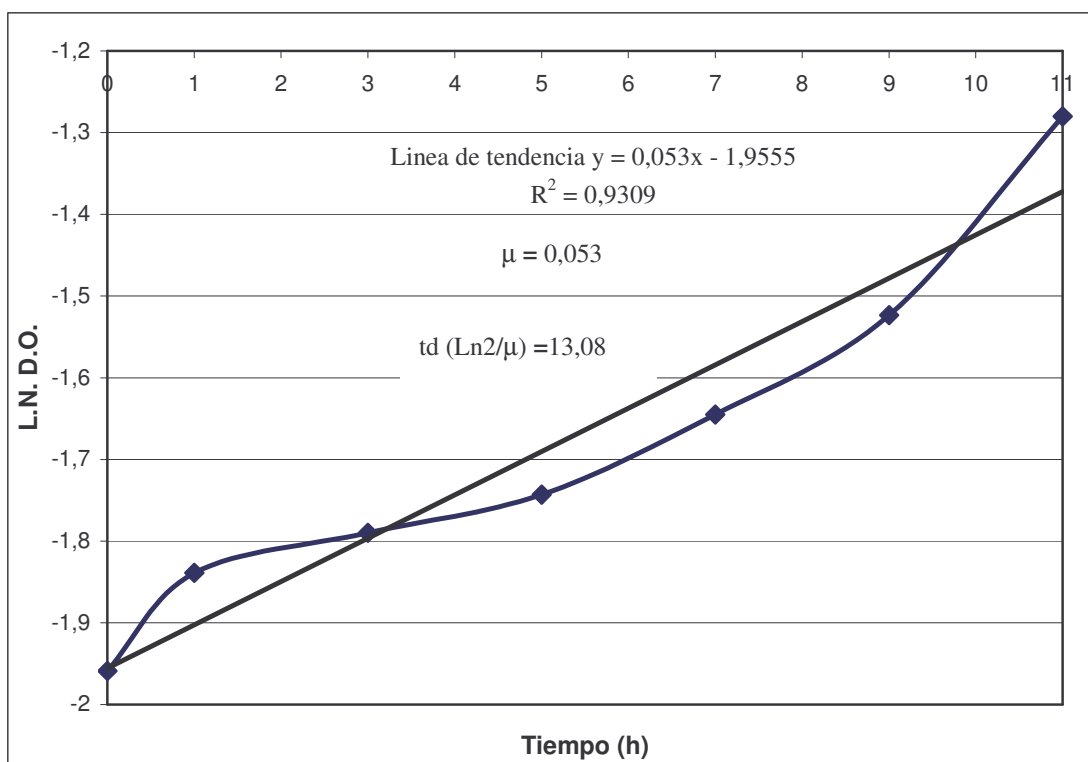
⁸² MONTES, A *et al.* Op. cit., p. 22.

⁸³ MADIGAN, M. *et al.* Op. cit., p. 31.

Cuadro 12. Muestra de cálculos para la determinación de las constantes cinéticas inóculo 1.

Hora	D.O.	Ln (D.O.)
0	0,141	-1,959
1	0,159	-1,839
3	0,167	-1,790
5	0,175	-1,743
7	0,193	-1,645
9	0,218	-1,523
11	0,278	-1,280

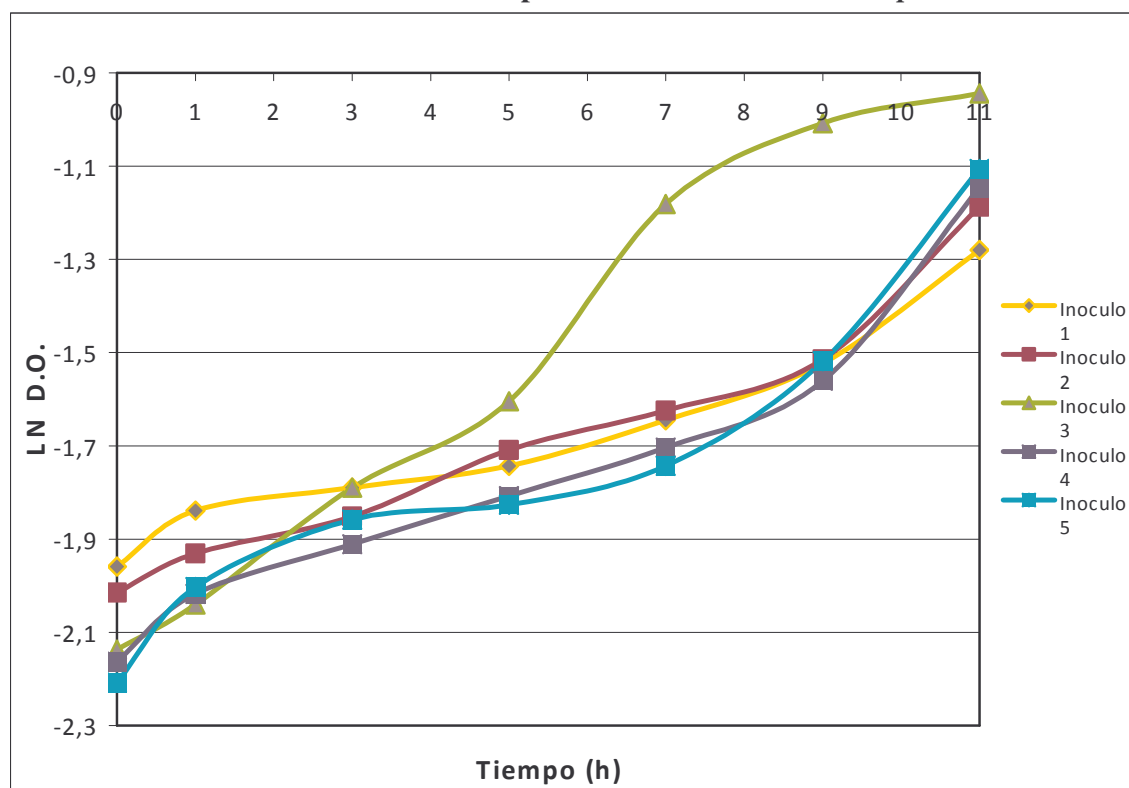
Grafica 1. Constantes cinéticas para el inóculo 1 para *Lactobacillus casei subsp. rhamnosus*.



Cuadro 13. Constantes de crecimiento para la estandarización del inóculo.

	Inoculo 1	Inoculo 2	Inoculo 3	Inoculo 4	Inoculo 5
Ecuación	$y = 0,053x - 1,96$	$y = 0,067x - 2,04$	$y = 0,118x - 2,14$	$y = 0,078x - 2,16$	$y = 0,082x - 2,18$
$\mu (h^{-1})$	0,053	0,067	0,118	0,078	0,082
Coef. corr.	0,93	0,948	0,974	0,927	0,904
td (Ln2/ μ)	13,08	10,35	5,87	8,89	8,45

Grafica 2. Estandarización del Inóculo para *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus*.



Con el incremento de tamaño del inóculo desde $4,65 \times 10^7$ Bact/mL en el inóculo 3 hasta $4,65 \times 10^8$ Bact/mL en el inóculo 1 se obtuvo una disminución de μ , esto podría deberse a “la limitación del sustrato por el aumento del número de células”,⁸⁴ y con el uso de un inóculo menor al 3 hasta el inóculo 5 se obtuvo una velocidad específica de crecimiento (pendiente) inferior. Con lo anterior se puede concluir que no existe una correlación entre μ y la cantidad de inóculo, debido además a que el valor más alto de la pendiente es para el inóculo 3.

El inóculo que presentó mayor velocidad específica de crecimiento fue el inóculo 3 como se observa en la tabla 13, con el menor tiempo de duplicación. En la investigación realizada por Montes, A *et al.* 2003⁸⁵, el inóculo recomendado tiene una velocidad específica de crecimiento de $0,06 \text{ h}^{-1}$ y un tiempo de duplicación de 10,83, estos datos son similares a los presentados en la tabla 13 para el inóculo 2, lo cual nos da pie a asegurar que los datos obtenidos se los determino correctamente.

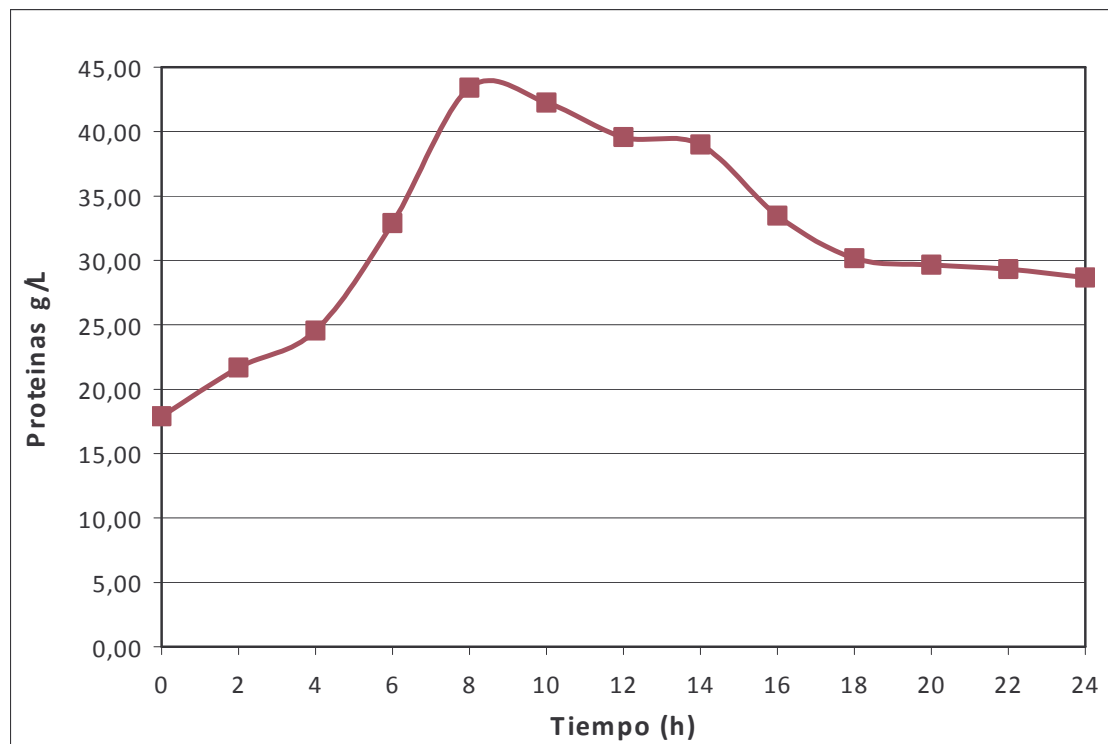
⁸⁴ LIONG, M.T. *et al.* Optimization of Growth of *Lactobacillus casei* ASCC 292 and Production of Organic Acids in the Presence of Fructooligosaccharide and Maltodextrin. *In: Journal of food science*. 2005, Vol. 70, Nr. 2.

⁸⁵ MONTES, A. *et al.* Op. cit., p. 22.

Se eligió este inóculo, debido a que presenta el mayor valor de μ y un tiempo de duplicación relativamente bajo respecto a los otros inóculos, lo que indica que la población se duplica en 5,87 h. Lo anterior se ve reflejado en que la culminación de la fase exponencial sea más rápida, disminuyendo así el tiempo de cosecha respecto a los otros inóculos.

7.2 FASE II

Grafica 3. Producción de proteínas de *Lactobacillus casei subsp. rhamnosus* en el medio miel de panela-leche en polvo.



Al evaluar la producción de proteínas de *Lactobacillus casei subsp. rhamnosus* en el medio miel de panela-leche en polvo se observó que la producción se incrementó desde las 0 hasta las 8 horas (grafica 3), obteniéndose en este tiempo una producción de proteínas de 25,52 g/L, siendo este resultado mayor al reportado por Pazos, M.⁸⁶ y por Montes, A. *et al*⁸⁷. Esto se pudo deber al cambio de la fuente de carbono “ya que la melaza es el coproducto de la producción de azúcar y por lo tanto ha perdido varios nutrientes termolabiles”⁸⁸.

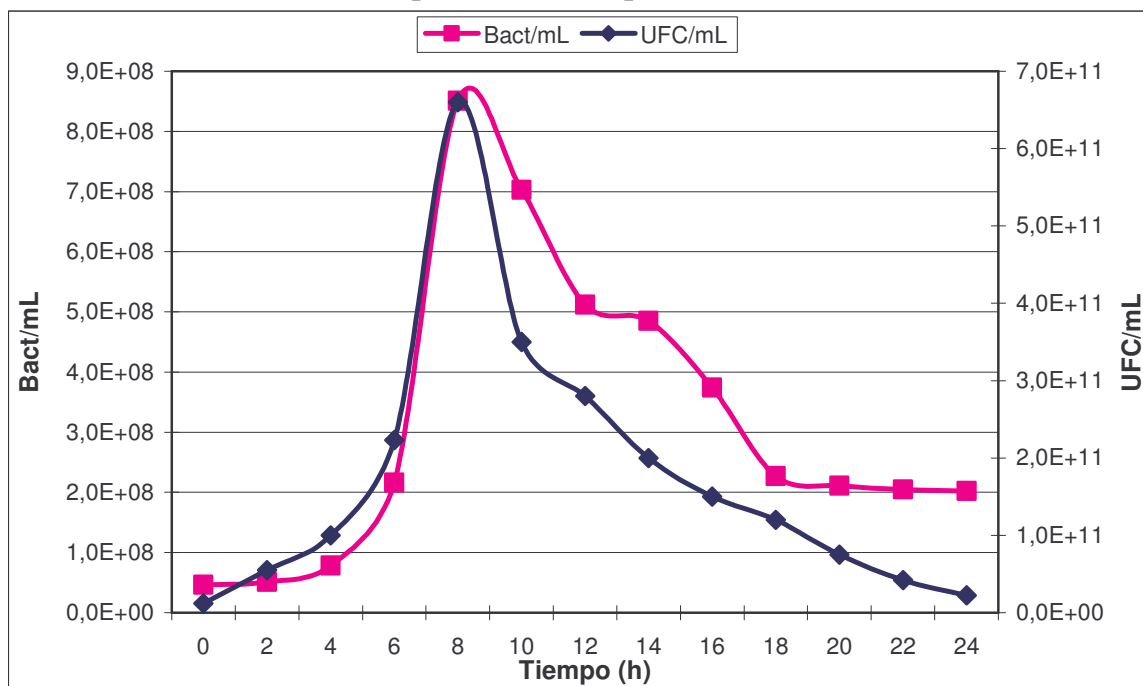
⁸⁶ PAZOS, M. Álvaro Jairo. Op. Cit., p. 22.

⁸⁷ MONTES, A. *et al*. Op. cit., p. 22.

⁸⁸ TOMMIE, G. Op. cit., p. 41.

Después de las 8 horas comenzó a disminuir levemente la producción de proteínas, hasta que finalmente se estabilizó, ya que este tiempo esta cercano al comienzo de la fase estacionaria, “comenzando así la disminución del crecimiento bacteriano y por ende la producción de proteínas”⁸⁹.

Grafica 4. Formación de biomasa UFC/mL y Bact/mL de *Lactobacillus casei subsp. rhamnosus* en el medio miel de panela-leche en polvo.



En la figura 7 se puede observar que la producción de biomasa a las 8 horas alcanza su mayor concentración con un valor de $6,6 \times 10^{11}$ UFC/mL superior al valor reportado por Montes, A. *et al*⁹⁰ en el medio melaza – leche en polvo y en la grafica 7 a las 8 horas alcanza una concentración de $8,51 \times 10^8$ Bact/mL, posteriormente se observo un descenso rápido hasta las 10 horas, continuando una estabilización de la producción, lo cual puede atribuirse al agotamiento de los nutrientes en el medio y a la alta concentración de ácido láctico.

Para el calculo del rendimiento de biomasa $Y_{x/s}$, es necesario disponer de la cantidad de ésta en g/L, por lo cual en nuestro caso no se pudo calcular este rendimiento, debido a que la técnica utilizada para la determinación de la biomasa fue el conteo de bacterias por cámara de neubauer la cual arroja datos en Bact/mL, además esta técnica tiene algunas limitantes como:

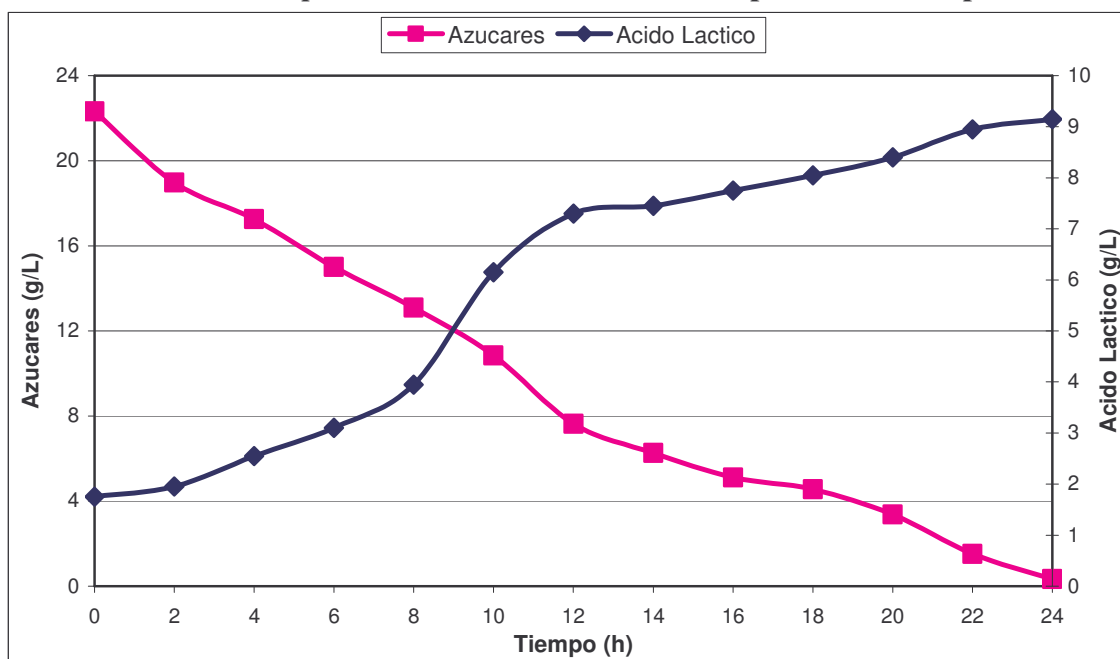
⁸⁹ DORAN, Pauline. Op. cit., p. 47.

⁹⁰ MONTES, A. *et al*. Op. cit., p. 22.

- Generalmente las células muertas no pueden distinguirse de las vivas.
- Las células pequeñas son difíciles de ver al microscopio y algunas pueden ser dejadas de lado en el recuento.
- Solo pueden contarse suspensiones densas de células, debido a que debe haber un número suficiente en la pequeña parte que puede observarse al microscopio⁹¹.

“Otra manera para determinar la biomasa en g/L es asumir un peso molecular para cada bacteria de acuerdo a su formula elemental, para esto es necesario conocer la cantidad de bacterias vivas”⁹², esto no se puede lograr con el método utilizado debido a las limitaciones anteriormente nombradas.

Grafica 5. Consumo de azúcares totales y producción de ácido láctico por *Lactobacillus casei subsp. rhamnosus* en el medio miel de panela-leche en polvo.



Al inicio de la fermentación se registro una concentración de 22,32 g/L de azúcares y 1,75 g/L de ácido láctico, y transcurridas las 24 horas se consumieron 21,98 g/L y se produjo 7,4g/L de azucars y acido láctico respectivamente; cabe destacar que la producción de ácido láctico se hace mas notable entre las 8 y las 10 horas donde se registran concentraciones de 3,95 y 6,15 g/L respectivamente.

De acuerdo a los datos de la figura 8, se calculó $Y_{p/s}$.

⁹¹ MADIGAN, M. *et al.* Op. cit., p. 31.

⁹² DORAN, Pauline. Op. cit., p. 47.

$$Y_{p/s} = \frac{Pf - Pi}{Si - Sf}$$

Pf = g/L ácido láctico final
 Pi = g/L ácido láctico inicial
 Si = g/L azúcares iniciales
 Sf = g/L azúcares finales.

$$Y_{p/s} = \frac{9,15 - 1,75}{22,32 - 0,34} = 0,34 = 34 \%$$

Este dato se puede comparar con la investigación de Pazos, M. en la reporta un $Y_{p/s}$ de 39% para el sustrato melaza-leche en polvo, indicando así una menor producción de ácido en el medio miel de panela - leche polvo. Según Tseng⁹³, la alta concentración de azúcares disponibles de la miel de panela podría causar una inhibición de la síntesis de este metabolito.

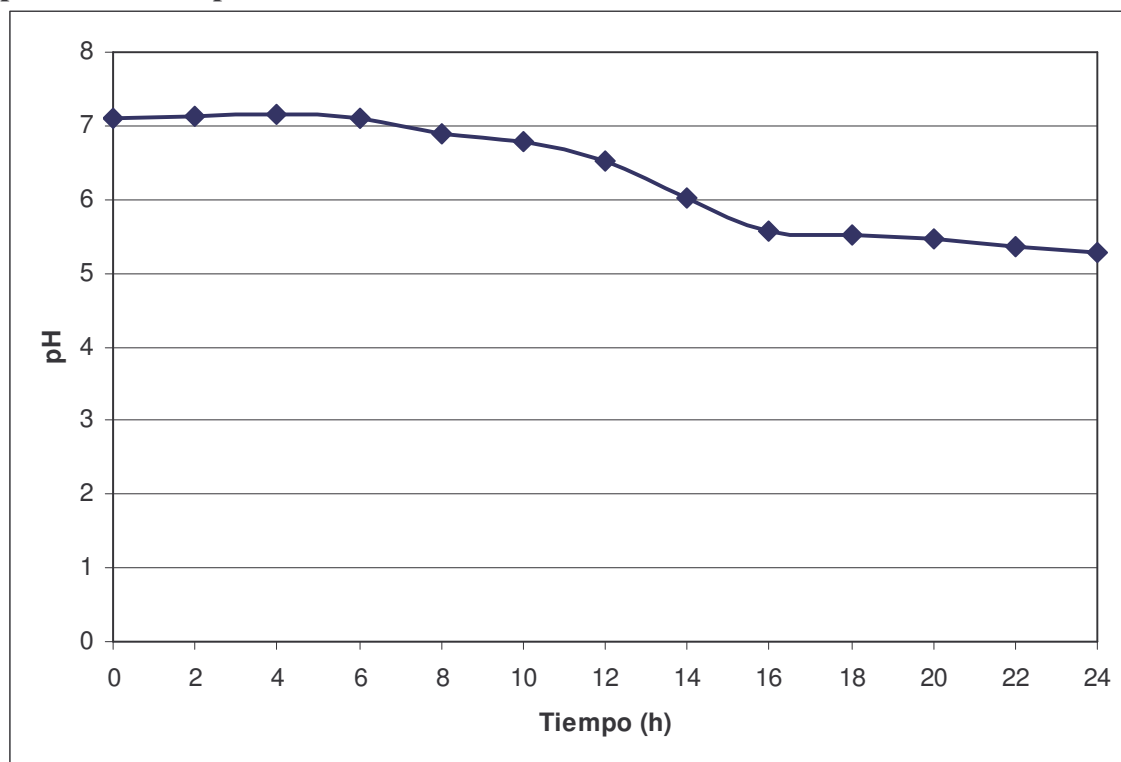
De la misma forma se calculó $Y_{p/s}$ para las 8 horas.

$$Y_{p/s} = 23,86 \%$$

Se determinó como tiempo de cosecha 8 horas de fermentación, debido a que se presenta la mayor producción de biomasa, proteínas y el mayor incremento en la producción de ácido láctico. De acuerdo a la grafica 2, en este tiempo termina la fase exponencial, y es el momento en que la producción de biomasa comienza a estabilizarse.

⁹³ TSENG, C.P., Montville. Metabolic regulation of end product distribution in lactobacilli: causes and consequences. In: Biotechnol. Program. 1993. Vol. 9. p. 113 – 121.

Grafica 6. Cambios de pH de *Lactobacillus casei subsp. rhamnosus* en el medio miel de panela-leche en polvo



El pH inicial en el medio miel de panela-leche en polvo fue de 7,09 alcanzando a las 24 horas de fermentación un valor de 5,28. En el transcurso de este tiempo se observó un descenso moderado del pH, el cual puede ser atribuido a la presencia de carbonato de calcio en el medio, ya que este actúa como sustancia buffer en los alimentos según en el INVIMA⁹⁴ y también utilizado por Kwon, S. *et. al*⁹⁵ con el mismo fin.

7.3 FASE III

7.3.1 Diseño experimental preliminar. Se trabajo un diseño experimental preliminar de 2^{3-2} fraccional factorial de dos niveles, como se muestra a continuación (extraído de *Statgraphics* CD-ROM, Programa estadístico, versión 5.0, 2000):

⁹⁴ Resolución 4126 del 5 de Abril de 1991. (Visitada viernes 23 de febrero de 2007); disponible en Internet: www.invima.org

⁹⁵ KWON, S. *et. al*. Production of lactic acid by *Lactobacillus rhamnosus* with vitamin-supplemented soybean hydrolysate. In: *Enzyme and Microbial Technology*. 2000. Vol. 26. p. 209–215

Tabla 1. Descripción del diseño experimental preliminar.

Design class: Multilevel Factorial
Base Design

Number of experimental factors: 3 Number of blocks: 1
Number of responses: 1
Number of runs: 8 Error degrees of freedom: 1
Randomized: Yes

Factors	Levels	Units
---------	--------	-------

Miel de panela	2	g
Carbonato	2	g
Leche en Polvo	2	g

Responses	Units
-----------	-------

Biomasa	UFC/mL
---------	--------

Cuadro 14. Niveles y factores experimentales.

Factor	Nivel		
	-1	0	+1
Miel de Panela	7,485	14,97	22,455
Leche en Polvo	36	72	108
Carbonato de Calcio	10	20	30

Después de realizar el análisis estadístico con el programa *Statgraphics* CD-ROM, Programa estadístico, versión 5.0, 2000, se obtuvo los siguientes resultados. La variable de respuesta para biomasa en UFC/mL, fue transformada con Ln de acuerdo a Leal-Sánchez, M. *et al.*⁹⁶

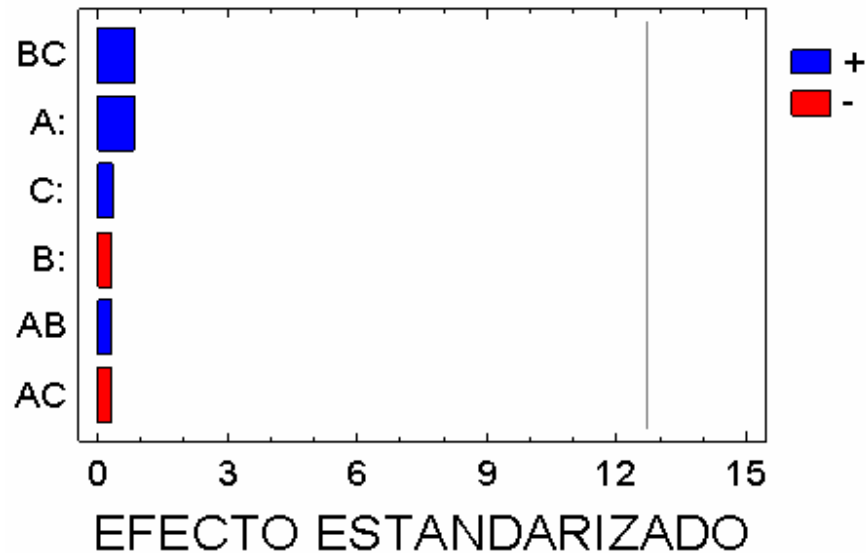
Cuadro 15. Composición de los ensayos para la optimización del sustrato por 1 L.

Ensayo	Miel de panela	Leche en Polvo (g)	Carbonato de calcio (g)	Producción (UFC/mL)	Producción (Bact/mL)
1	22,455	108	10	2,93E+13	2,18E+09
2	7,485	36	30	2,90E+12	1,58E+09
3	22,455	36	10	2,10E+13	6,54E+08
4	7,485	108	10	1,82E+11	2,34E+09
5	7,485	108	30	2,99E+13	1,09E+09
6	7,485	36	10	2,99E+13	1,00E+09
7	22,455	36	30	2,99E+13	1,35E+09
8	22,455	108	30	2,13E+13	8,24E+08

⁹⁶ LEAL-SÁNCHEZ, M. *et al.* Op. cit., p. 54.

- **Análisis de varianza para la biomasa.**

Grafica 7. Diagrama de Pareto para la biomasa (UFC/mL).



Según el análisis de análisis de varianza (ANOVA) para la biomasa (UFC/mL), medio control preliminar (ver anexo L) se puede explicar que: el R - cuadrado indica que el diseño se explica en un 64,64 % de variabilidad para la variable de respuesta, biomasa. El R – cuadrado ajustado para los grados de libertad es 0 %, lo cual indica las variables no tienen ningún efecto sobre la respuesta. La prueba de Durbin-Watson, evalúa los residuos para determinar si hay correlación significativa basada en el orden en el cual se generan los datos.

Se observó que el efecto de las variables (Miel de Panela, Leche en Polvo y Carbonato de Calcio) sobre la respuesta (biomasa,) y la interacción entre ellas presentan valores de P mayores a 0,05, lo cual mostró un efecto poco significativo en la variable respuesta.

En el diagrama de Pareto (grafica 7), se observa que ninguna variable tiene efecto significativo en la variable respuesta.

De acuerdo al análisis ANOVA, se observó que las variables no tienen ningún efecto sobre la biomasa, lo cual se puede atribuir a la técnica utilizada para determinar la biomasa, ya que como se observa en el anexo J la cantidad de inóculo utilizado en cada ensayo fue diferente, contrario al conteo de bacterias en cámara de Neubauer, en la cual la cantidad inicial de inóculo fue la misma. Este resultado se puede atribuir a que “en el recuento en placa una agrupación de dos o más células solo producirá una colonia, de modo que el recuento de viables será erróneo, además el recuento de viables se expresa como unidades formadoras de colonias obtenidas, más que como número de células viables”⁹⁷.

⁹⁷ MADIGAN, M. *et al.* Op. cit., p. 31.

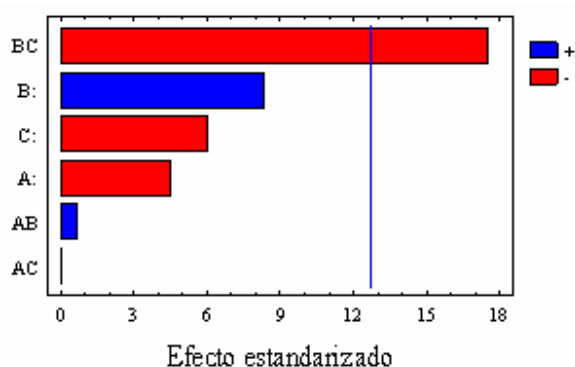
Según lo planteado anteriormente de aquí en adelante se utilizó como técnica para la determinación de biomasa el recuento de bacterias por cámara de Neubauer.

- **Análisis de varianza para la biomasa.**

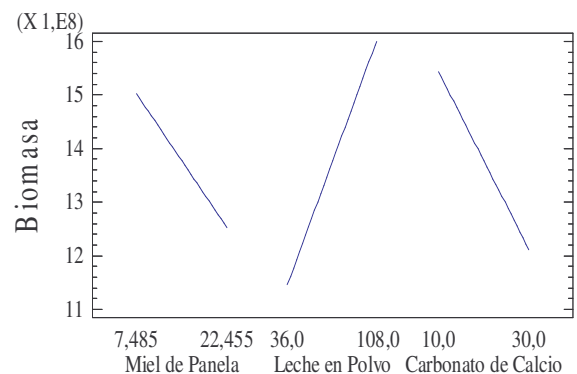
En el Análisis de varianza para la biomasa (Bact/mL), medio control preliminar (ver anexo L), el R - cuadrado indica que el diseño se explica en un 99,769 % de variabilidad para la variable de respuesta, biomasa. El R – cuadrado ajustado para los grados de libertad es 98,38 %, lo cual indica que las variables tienen efecto sobre la respuesta. Se observó que el efecto de las variables (Miel de Panela, Leche en Polvo y Carbonato de Calcio) sobre la respuesta (biomasa), la interacción miel de panela-leche en polvo y miel de panela-carbonato de calcio presentan valores de P mayores a 0,05, lo cual mostró un efecto poco significativo en la variable respuesta. La interacción leche en polvo-carbonato de calcio presenta un valor de P menor a 0,05, lo que indica un efecto significativo sobre la variable de respuesta.

Grafica 8. Análisis de diagramas inicial para el medio control.

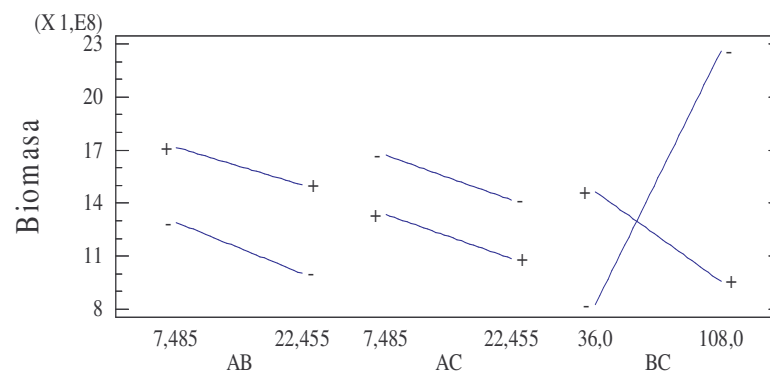
a). Diagrama de Pareto.



b). Diagrama de efectos principales.



c). Diagrama de Interacciones.



En la grafica 8a (diagrama de pareto), la interacción leche en polvo-carbonato es el único factor que influye sobre la variable de respuesta. En la grafica 8b (diagrama de efectos principales), y de acuerdo al ANOVA (ver anexo L), que la variable miel de panela y carbonato de calcio, tienen un efecto inversamente proporcional y la variable leche en polvo, tiene un efecto directamente proporcional. En la grafica 8c (diagrama de interacciones), el efecto de la interacción miel de panela-leche en polvo, presenta su mejor comportamiento en el nivel mínimo de concentración, al igual que la interacción miel de panela-carbonato de calcio y la interacción leche en polvo-carbonato de calcio presenta su mejor comportamiento en el nivel máximo de leche en polvo y mínimo de carbonato.

Tabla 2. Respuesta optima para la biomasa (Bact/mL).

Goal: maximize Biomasa	
Optimum value = 2,36775E9	
Factor	Optimum
Miel de Panela	7,485
Leche en Polvo	138,0
Carbonato de Calcio	14,0

De acuerdo al análisis estadístico se seleccionaron las variables que presentaron mayor influencia en la maximización de la biomasa, las cuales fueron leche en polvo y carbonato de calcio, con las cuales se siguieron trabajaron los posteriores diseños. La miel de panela se la tomo como constante con un valor de 7,485 g como se observa en la tabla 17 debido a que no tuvo un efecto significativo sobre la respuesta y los valores óptimos para la combinación leche en polvo y carbonato de calcio fueron 138 y 14 g respectivamente, los cuales se tomaron como punto central en todos los medios.

Comparando los datos que se muestran en la tabla 2, con las concentraciones utilizadas en investigaciones anteriores de Barney, Carmen. E.⁹⁸, Pazos, M.⁹⁹ y Montes, A.¹⁰⁰, en donde se utiliza concentración de 14,97 g, 72 g y 20 g de melaza, leche en polvo y carbonato de calcio respectivamente, se puede observar que se obtuvo una mayor producción de biomasa en el medio con la composición planteada en el diseño experimental preliminar, debido a que la producción de biomasa se ve influenciada positivamente por el aumento de la leche en polvo y negativamente por la miel de panela y por el carbonato de calcio.

⁹⁸ BARNEY, Carmen. E., Op. Cit., p. 36.

⁹⁹ PAZOS, M. Álvaro Jairo., Op. Cit., p. 32.

¹⁰⁰ MONTES, A. *et al.*, Op. cit., p. 32.

A continuación se realizó un nuevo diseño experimental 3^2_{3-1} fraccional factorial de tres niveles, con el cual se evaluó la producción de biomasa, la aceptación global (análisis sensorial) y el análisis económico.

7.3.2 Diseño experimental final.

7.3.2.1 Diseño experimental final-Leche en polvo, medio control (Anexo I).

Cuadro 16. Niveles y factores experimentales, medio control.

Factor	Nivel		
	-1	0	+1
Leche en Polvo	69	138	207
Carbonato de Calcio	7	14	21

Cuadro 17. Composición de los ensayos para la optimización del sustrato por 1 L, medio control.

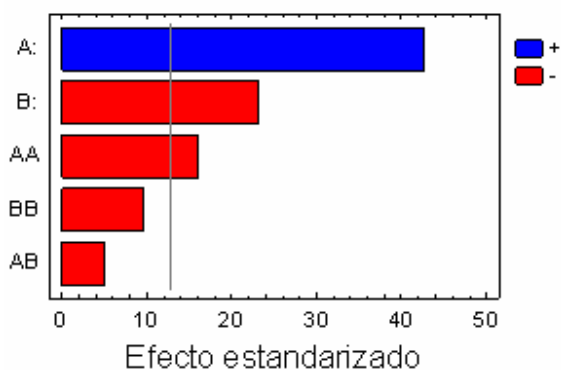
Ensayo	Leche en Polvo (g)	Carbonato de calcio (g)
1	138	14
2	69	14
3	69	7
4	138	14
5	69	21
6	207	21
7	138	21
8	207	14
9	207	7
10	138	7

- **Análisis de varianza para la biomasa.**

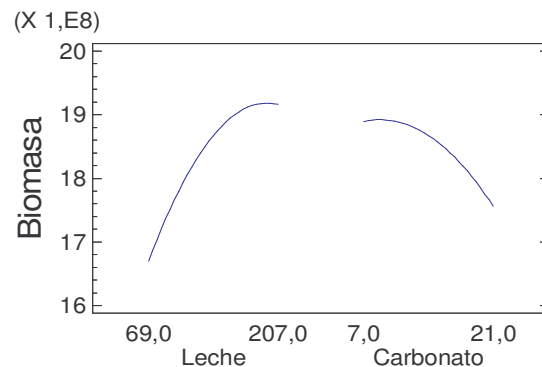
En el Análisis de varianza para la biomasa (Bact/mL), diseño final medio control (ver anexo L), el R - cuadrado indica que el diseño se explica en un 99,6443 % de variabilidad para la variable de respuesta, biomasa. El R – cuadrado ajustado para los grados de libertad es 99,1997 %, lo cual indica si las variables tienen efecto sobre la respuesta, lo que permite decir que el modelo fue bien ajustado. La prueba de falta de ajuste (lack of fit), determina si el diseño seleccionado es adecuado para describir los datos obtenidos o si debe emplearse otro modelo. El valor P para el lack of fit es mayor o igual a 0,05; por lo tanto el diseño planteado para este caso es el adecuado para los datos obtenidos, con un 95% de nivel de confianza. Se observó que el efecto de las variables (Leche en Polvo y Carbonato de Calcio) sobre la respuesta (biomasa) y el efecto de la leche en polvo al cuadrado presentan un valor de P menor a 0,05 lo que indica el efecto significativo sobre la variable de respuesta; mientras que el efecto del carbonato de calcio al cuadrado y la interacción leche en polvo-carbonato de calcio presentan valores de P mayores a 0,05, lo cual muestra un efecto poco significativo en la variable respuesta.

Grafica 9. Análisis de diagramas final para biomasa, medio control.

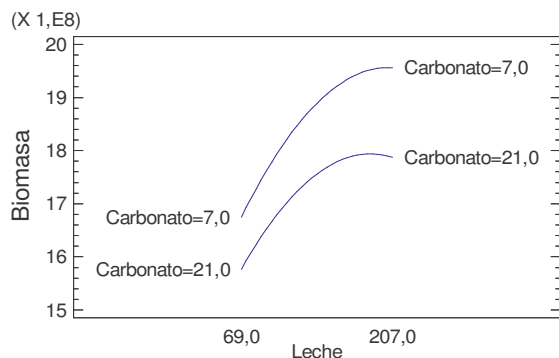
a) Diagrama de pareto.



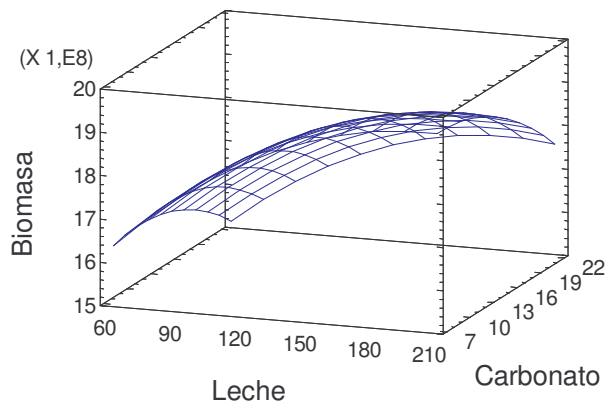
b) Diagrama de efectos principales



c) Diagrama de interacciones.



d) Superficie de respuesta



La grafica 9a (diagrama de pareto), muestra que la leche en polvo, tiene un efecto positivo; y que al contrario el carbonato de calcio y el carbonato de calcio al cuadrado tienen un efecto negativo sobre la variable de respuesta. La grafica 9b (diagrama de efectos principales), evidencia el efecto directamente proporcional de leche polvo sobre la variable de respuesta; el carbonato de calcio, tienen un efecto inversamente proporcional. El efecto de la leche en polvo y del carbonato de calcio son cuadráticos, es decir que hay un punto máximo, que puede estar cerca de los 207 g y 7g, respectivamente. La grafica 9c (diagrama de interacciones), el efecto de la interacción leche en polvo-carbonato de calcio, presenta su mejor comportamiento en el nivel mínimo de concentración de carbonato de calcio y con el nivel máximo de concentración de leche en polvo; además demuestra que las variables presentan aditividad, por lo cual su efecto es irrelevante en la variable de respuesta debido a su baja significancia.

La ecuación que describe el modelo matemático ajustado, representa el comportamiento del *Lactobacillus casei subsp. rhamnosus* en el sustrato Leche en polvo-carbonato de calcio.

$$\text{Biomasa} = 1,20952\text{E}9 + 6,6011\text{E}6 \cdot \text{Leche} + 2,07823\text{E}7 \cdot \text{Carbonato} - 15603,0 \cdot \text{Leche}^2 - 36231,9 \cdot \text{Leche} \cdot \text{Carbonato} - 903790,0 \cdot \text{Carbonato}^2$$

En la grafica 9d (superficie de respuesta), se puede observar que la mejor respuesta se encuentra en la combinación de los niveles alto y bajo (207 g y 7 g), respectivamente para las variables leche en polvo y carbonato de calcio.

Tabla 3. Respuesta óptima para la biomasa (Bact/mL), medio control.

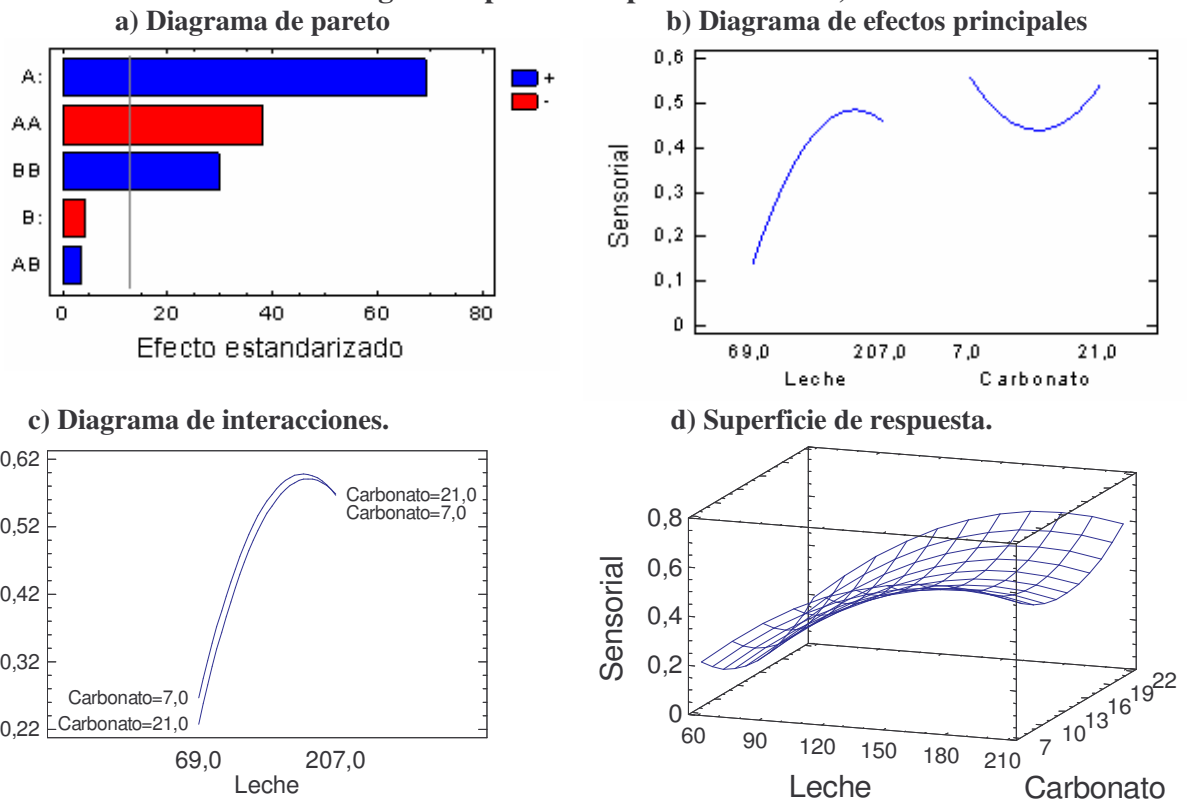
Goal: maximize Biomasa			
Optimum value = 1,95644E9			
Factor	Low	High	Optimum
Leche	69,0	207,0	202,893
Carbonato	7,0	21,0	7,43026

La tabla 3 muestra la combinación de niveles de las variables, los cuales maximizan la producción de biomasa. Según este análisis la producción máxima de biomasa será de $1,956 \times 10^9$ Bact/mL, en los niveles óptimos de las variables.

- **Análisis para la respuesta sensorial.**

La variable de respuesta “sensorial”, que se evaluó mediante análisis sensorial y del cual se obtuvo una respuesta total (ver ANEXO G).

Grafica 10. Análisis de diagramas para la respuesta sensorial, medio control.



La grafica 10a (diagrama de pareto), muestra que la leche en polvo y el carbonato de calcio al cuadrado, tienen un efecto positivo; y que al contrario la leche en polvo al cuadrado tienen un efecto negativo sobre la variable de respuesta.

La grafica 10b (diagrama de efectos principales), evidencia el efecto directamente proporcional de leche polvo sobre la variable de respuesta, debido a que a medida que se aumenta su cantidad la variable de respuesta aumenta; el carbonato de calcio, evidencia una curva cuadrática negativa alcanzando el mejor valor de respuesta a su menor nivel. El efecto de la leche en polvo y del carbonato de calcio son cuadráticos, es decir que hay un punto máximo aunque en dos regiones diferentes, que puede estar cerca de los 207 g y 7 g, respectivamente. La grafica 10c (diagrama de interacciones), el efecto de la interacción leche en polvo-carbonato de calcio, presenta su mejor comportamiento en el nivel mínimo y máximo de concentración de carbonato de calcio y con el nivel máximo de concentración de leche en polvo; además demuestra que las variables presentan aditividad, por lo cual su efecto es irrelevante en la variable de respuesta debido a su baja significancia.

La ecuación que describe el modelo matemático ajustado, representa el comportamiento del análisis sensorial en el sustrato Leche en polvo-carbonato de calcio fermentado con del *Lactobacillus casei subsp. rhamnosus*.

$$\text{Sensorial} = 0,0518095 + 0,0102443*\text{Leche} - 0,0672109*\text{Carbonato} - 0,0000297657*\text{Leche}^2 + 0,0000207039*\text{Leche}*\text{Carbonato} + 0,00225073*\text{Carbonato}^2$$

En la grafica 10d (superficie de respuesta), se puede observar que la mejor respuesta se encuentra en la combinación de los niveles alto, bajo y alto (207 g y 7 , 21 g), respectivamente para las variables leche en polvo y carbonato de calcio.

Tabla 4. Respuesta optima para el análisis sensorial, medio control.

Goal: maximize Sensorial Optimum value = 0,598169			
Factor	Low	High	Optimum
Leche	69,0	207,0	174,52
Carbonato	7,0	21,0	7,0

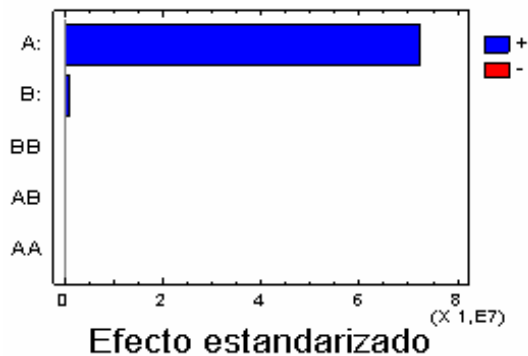
La tabla 4 muestra la combinación de niveles de las variables, los cuales maximizan el análisis sensorial. Según este análisis el valor optimo para el análisis sensorial será de 0,598, en los niveles óptimos de las variables.

- **Análisis para la respuesta económico.**

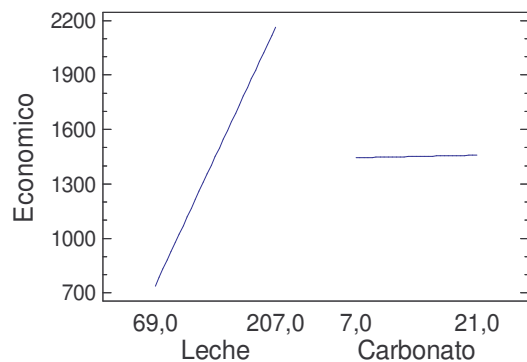
La variable de respuesta “económico”, se evaluó mediante los costos asociados a la producción de biomasa del *Lactobacillus casei subsp. rhamnosus*, los cuales son la materia prima e insumos (ver ANEXO H).

Grafica 11. Análisis de diagramas para la respuesta económico, medio control.

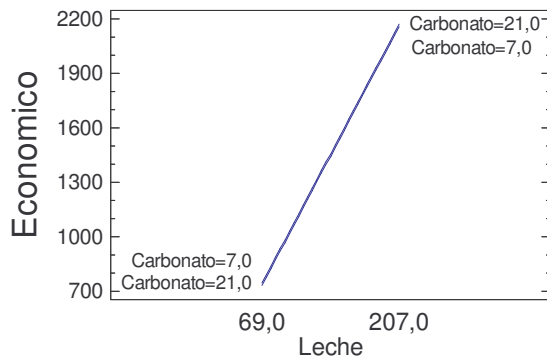
a) Diagrama de pareto.



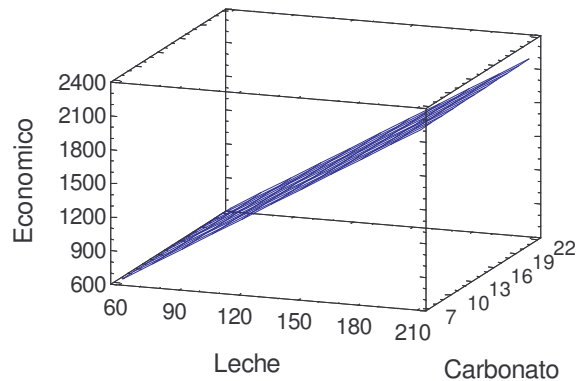
b) Diagrama de efectos principales



c) Diagrama de interacciones.



d) Superficie de respuesta.



La grafica 11a (diagrama de pareto), muestra que la leche en polvo y el carbonato de calcio son las únicas variables que tienen efecto en la respuesta. La grafica 11b (diagrama de efectos principales), evidencia el efecto directamente proporcional de leche polvo sobre la variable de respuesta, debido a que a medida que se aumenta su cantidad la variable de respuesta aumenta; el carbonato de calcio, evidencia que este es casi independiente debido a su linealidad. El efecto de la leche en polvo y del carbonato de calcio son lineales, es decir que no hay un punto máximo, debido a que la respuesta será menor a menor nivel de las variables. La grafica 11c (diagrama de interacciones), el efecto de la interacción leche en polvo-carbonato de calcio, presenta su menor comportamiento en el nivel mínimo de concentración de carbonato de calcio y de leche en polvo; además demuestra que las variables presentan aditividad, por lo cual su efecto es irrelevante en la variable de respuesta debido a su baja significancia.

La ecuación que describe el modelo matemático ajustado, representa el comportamiento del análisis económico en el sustrato Leche en polvo-carbonato de calcio fermentado con del *Lactobacillus casei subsp. rhamnosus*.

$$\text{Económico} = 11,81 + 10,33 * \text{Leche} + 1,0 * \text{Carbonato}$$

En la grafica 11d (superficie de respuesta), se puede observar que la mejor respuesta se encuentra en la combinación de los niveles más bajos, (69 g y 7 g), respectivamente para las variables leche en polvo y carbonato de calcio.

Tabla 5. Respuesta optima para el análisis económico (\$), medio control.

Factor	Goal: minimize Economico Optimum value = 731,58		
	Low	High	Optimum
Leche	69,0	207,0	69,0
Carbonato	7,0	21,0	7,0

La tabla 5 muestra la combinación de niveles de las variables, los cuales minimizan el análisis económico. Según este análisis el valor optimo para el análisis económico será de \$731,58, en los niveles óptimos de las variables. Con los resultados de los anteriores para biomasa, sensorial y económico, se determino el sustrato optimo en cuanto a estos análisis, mediante el análisis estadístico para la optimización de respuestas múltiples.

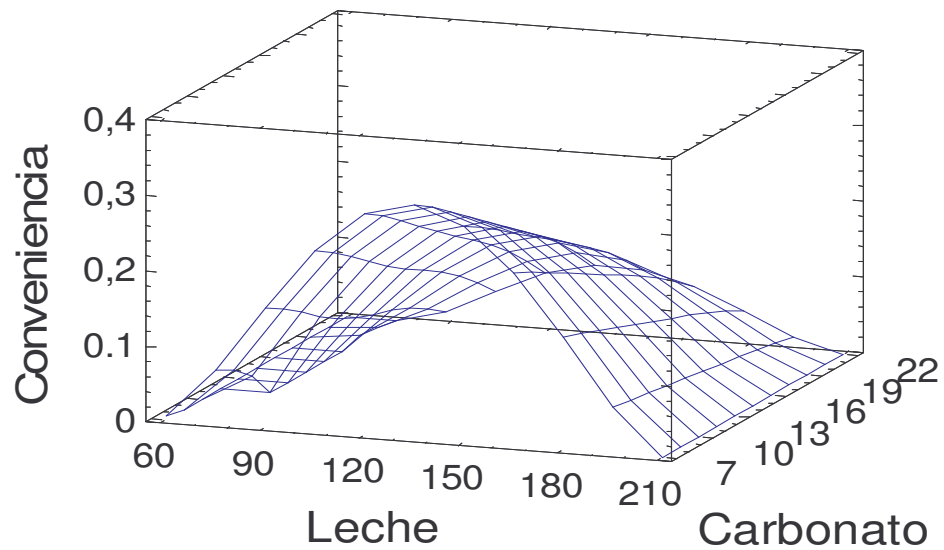
- Optimización de respuestas múltiples para el medio control.

Tabla 6. Optimización de respuestas múltiples para el medio control.

Respuesta	Conveniencia		Objetivo	Peso	
	Bajo	Alto			Impacto
Biomasa	1,58E9	1,95E9	Maximize	5,0	3,0
Económico	731,58	2171,12	Minimize	3,5	3,0
Sensorial	0,2	0,624	Maximize	1,5	3,0

La tabla 6 muestra los niveles altos y bajos de conveniencia, el objetivo para cada respuesta, además del peso asignado para cada una de ellas.

Grafica 12. Superficie de respuesta múltiple para leche en polvo.



Grafica 13. Contornos estimados para superficie de respuesta múltiple para leche en polvo.

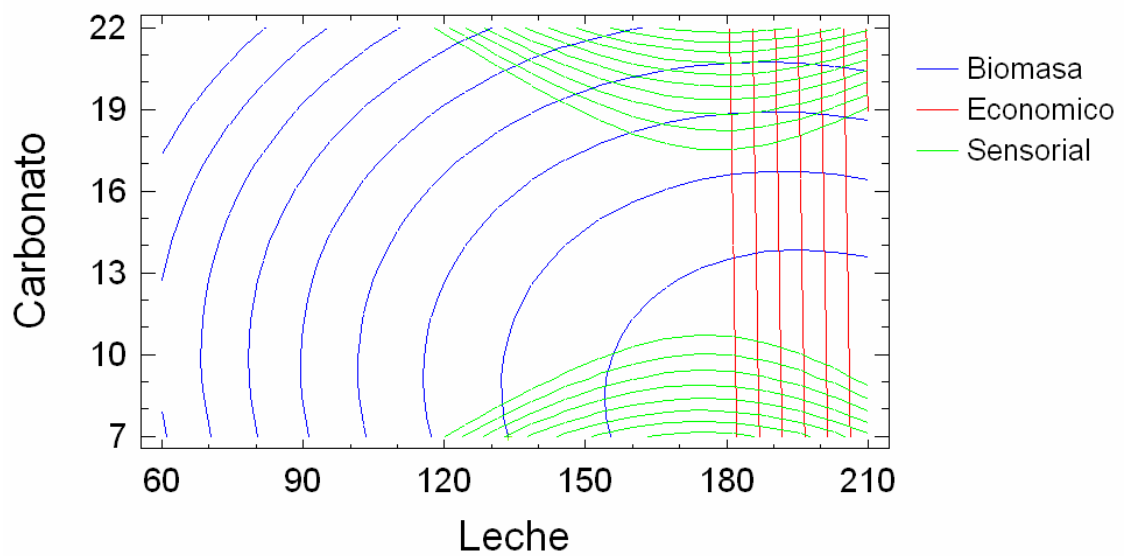


Tabla 7. Optimización de la conveniencia para el medio control.

Optimum value = 0,30941			
Factor	Low	High	Optimum
Leche	69,0	207,0	133,628
Carbonato	7,0	21,0	7,0
Response		Optimum	
Biomasa		1,8803E9	
Económico		1399,18	
Sensorial		0,548402	

En la grafica de la superficie de respuesta múltiple (grafica 12), se puede observar que la mejor respuesta se encuentra en la combinación de los niveles medios y bajos, (130 g y 7 g), para las variables leche en polvo y carbonato de calcio respectivamente, con un nivel de conveniencia 0,30941.

En la grafica de contornos estimados para superficie de respuesta múltiple para leche en polvo (grafica 13), se puede observar los contornos estimados para cada respuesta obtenidos de los análisis anteriores.

La tabla 7 muestra la combinación de niveles de las variables, los cuales maximizan la biomasa, el análisis sensorial y minimizan el análisis económico. Según este análisis el valor optimo para la respuesta múltiple fue, biomasa $1,88 \times 10^9$ Bact/mL, económico \$1399,18 por litro, y sensorial de 0,548, en los niveles óptimos de las variables.

7.3.2.2 Diseño experimental final-Leche Pasteurizada Medio 1 (Anexo I).

Cuadro 18. Niveles y factores experimentales, medio 1.

Factor	Nivel		
	-1	0	+1
Leche	69	138	207
Carbonato de Calcio	7	14	21

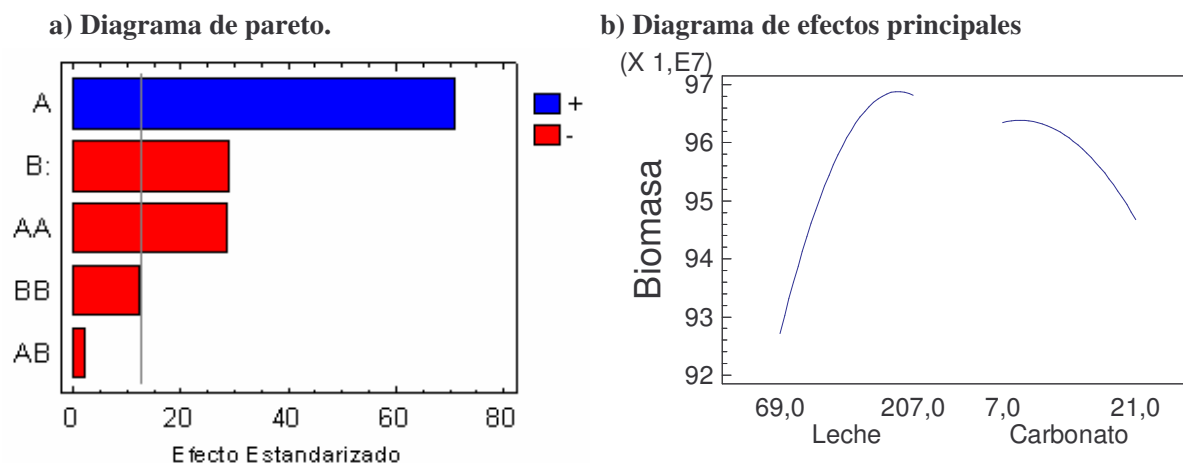
Cuadro 19. Composición de los ensayos para la optimización del sustrato por 1 L medio 1.

Ensayo	Leche	H. Soya	Total	Carbonato de calcio
1	17,43	120,57	138	14
2	12,10	56,90	69	14
3	12,10	56,90	69	7
4	17,43	120,57	138	14
5	12,10	56,90	69	21
6	36,31	170,69	207	21
7	17,43	120,57	138	21
8	36,31	170,69	207	14
9	36,31	170,69	207	7
10	17,43	120,57	138	7

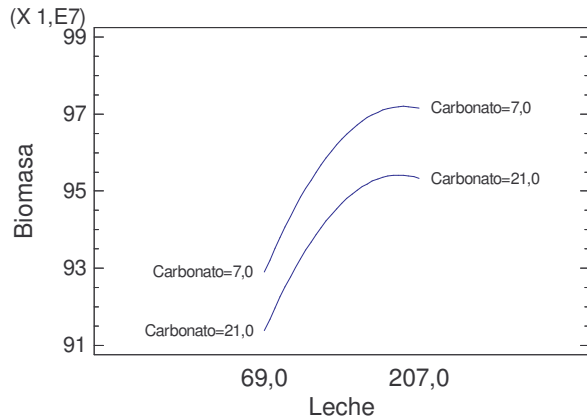
• **Análisis de varianza para la biomasa.**

En el Análisis de varianza para la biomasa (Bact/mL), medio 1 (ver anexo L), el R - cuadrado indica que el diseño se explica en un 96,9991 % de variabilidad para la variable de respuesta, biomasa. El R – cuadrado ajustado para los grados de libertad es 93,2481 %, lo cual indica si las variables tienen efecto sobre la respuesta, lo que permite decir que el modelo fue bien ajustado. La prueba de falta de ajuste (lack of fit), determina si el diseño seleccionado es adecuado para describir los datos obtenidos o si debe emplearse otro modelo. El valor P para el lack of fit es mayor o igual a 0,05; por lo tanto el diseño planteado para este caso es el adecuado para los datos obtenidos, con un 95% de nivel de confianza. Se observó que el efecto de las variables (Leche en Polvo y Carbonato de Calcio) sobre la respuesta (biomasa) y el efecto de la leche en polvo al cuadrado presentan un valor de P menor a 0,05 lo que indica el efecto significativo sobre la variable de respuesta; mientras que el efecto del carbonato de calcio al cuadrado y la interacción leche en polvo-carbonato de calcio presentan valores de P mayores a 0,05, lo cual muestra un efecto poco significativo en la variable respuesta.

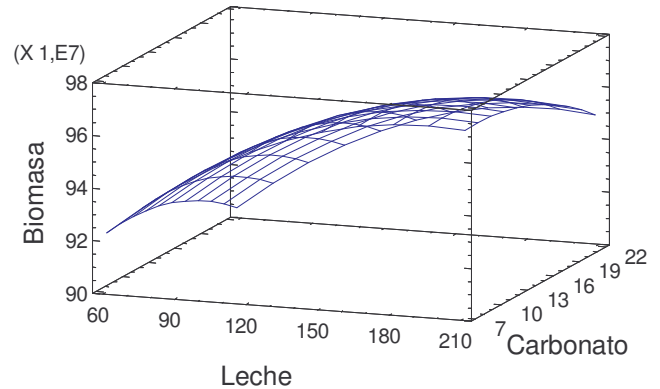
Grafica 14. Análisis de diagramas para la biomasa (Bact/mL), medio 1.



c) Diagrama de interacciones.



d) Superficie de respuesta



La grafica 14a (diagrama de pareto), muestra que la leche pasteurizada, tiene un efecto positivo; y que al contrario el carbonato de calcio y la leche pasteurizada al cuadrado tienen un efecto negativo sobre la variable de respuesta. La grafica 14b (diagrama de efectos principales), evidencia el efecto directamente proporcional de leche sobre la variable de respuesta, debido a que a medida que se aumenta su cantidad la variable de respuesta aumenta; el carbonato de calcio, tienen un efecto inversamente proporcional, ya que a medida que aumenta la cantidad de éste se disminuye la respuesta. El efecto de la leche y del carbonato de calcio son cuadráticos, es decir que hay un punto máximo, que puede estar cerca de los 207 g y 7 g, respectivamente. La grafica 14c (diagrama de interacciones), el efecto de la interacción leche-carbonato de calcio, presenta su mejor comportamiento en el nivel mínimo de concentración de carbonato de calcio y con el nivel máximo de concentración de leche; además demuestra que las variables presentan aditividad, por lo cual su efecto es irrelevante en la variable de respuesta debido a su baja significancia.

La ecuación que describe el modelo matemático ajustado, representa el comportamiento del *Lactobacillus casei subsp. rhamnosus* en el sustrato Leche-carbonato de calcio.

$$\text{Biomasa} = 8,5781\text{E}8 + 1,08489\text{E}6 \cdot \text{Leche} + 2,28912\text{E}6 \cdot \text{Carbonato} - 2775,53 \cdot \text{Leche}^2 - 1552,8 \cdot \text{Leche} \cdot \text{Carbonato} - 116618,0 \cdot \text{Carbonato}^2$$

En la grafica 14d (superficie de respuesta), se puede observar que la mejor respuesta se encuentra en la combinación de los niveles alto y bajo (207 g y 7 g), respectivamente para las variables leche y carbonato de calcio.

Tabla 8. Respuesta optima para la biomasa (Bact/mL), medio 1.

Goal: maximize Biomasa

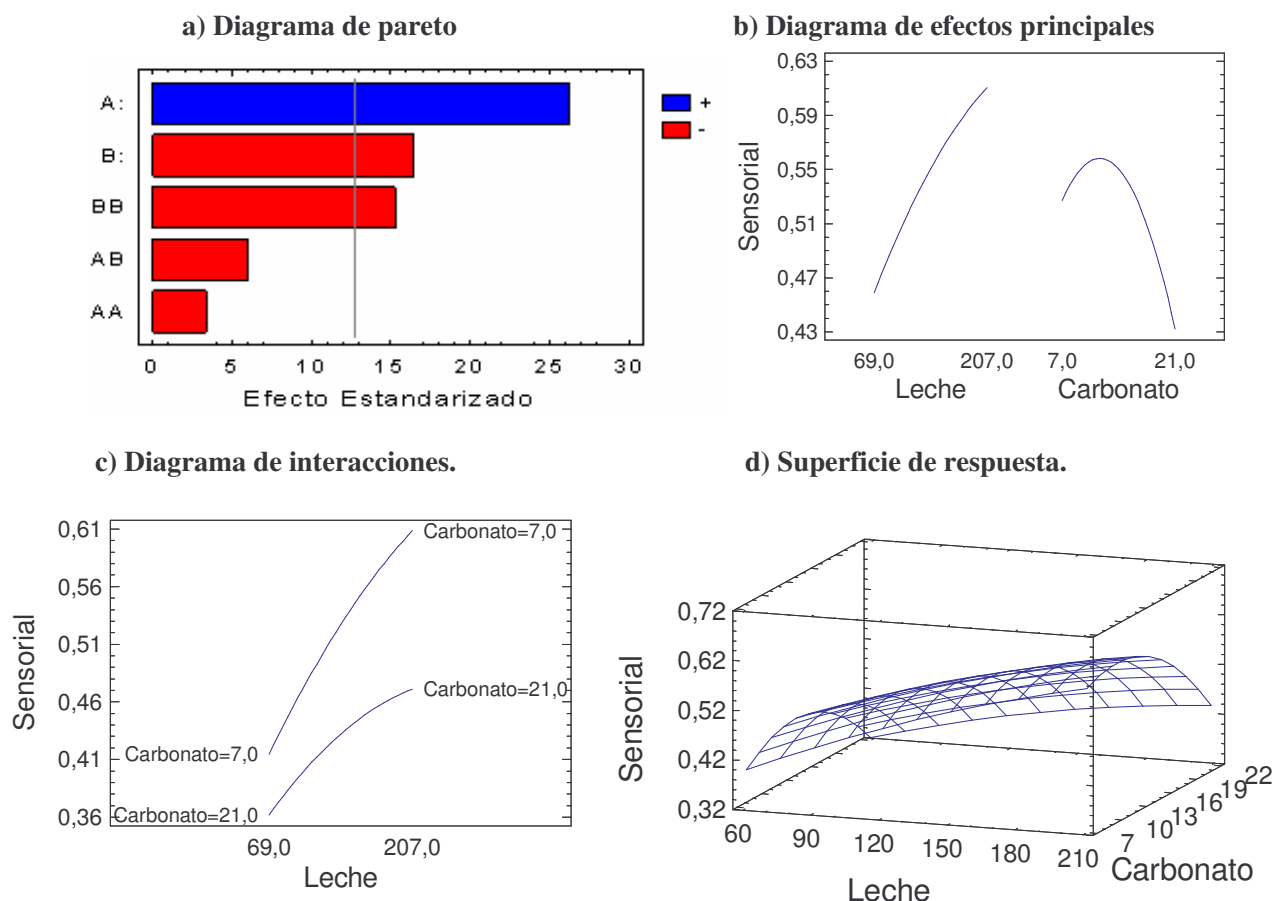
Optimum value = 9,72292E8

Factor	Low	High	Optimum
Leche	69,0	207,0	193,029
Carbonato	7,0	21,0	8,52692

La tabla 8 muestra la combinación de niveles de las variables, los cuales maximizan la producción de biomasa. Según este análisis la producción máxima de biomasa será de $9,72 \times 10^8$ Bact/mL, en los niveles óptimos de las variables.

- **Análisis para la respuesta sensorial.**

Grafica 15. Análisis de diagramas para la respuesta sensorial, medio 1.



La grafica 15a (diagrama de pareto), muestra que la leche tiene un efecto positivo; y que al contrario el carbonato de calcio y el carbonato de calcio al cuadrado tienen un efecto negativo sobre la variable de respuesta. La grafica 15b (diagrama de efectos principales), evidencia el efecto directamente proporcional de leche sobre la variable de respuesta, debido a que a medida que se aumenta su cantidad la variable de respuesta aumenta; el carbonato de calcio, evidencia una curva cuadrática negativa alcanzando el mejor valor de respuesta a su menor nivel. El efecto de la leche y del carbonato de calcio son cuadráticos, es decir que hay un punto máximo aunque en dos regiones diferentes, que puede estar cerca de los 207 g y 14 g, respectivamente. La grafica 15c (diagrama de interacciones), el efecto de la interacción leche -carbonato de calcio, presenta su mejor comportamiento en el nivel mínimo de concentración de carbonato de calcio y con el nivel máximo de concentración de leche; además demuestra que las variables presentan aditividad, por lo cual su efecto es irrelevante en la variable de respuesta debido a su baja significancia.

La ecuación que describe el modelo matemático ajustado, representa el comportamiento del análisis sensorial en el sustrato Leche -carbonato de calcio fermentado con del *Lactobacillus casei subsp. rhamnosus*.

$$\text{Sensorial} = 0,0629762 + 0,00262595*\text{Leche} + 0,0396939*\text{Carbonato} - 0,00000330063*\text{Leche}^2 - 0,0000439959*\text{Leche}*\text{Carbonato} - 0,00144315*\text{Carbonato}^2$$

En la grafica 15d (superficie de respuesta), se puede observar que la mejor respuesta se encuentra en la combinación de los niveles alto y bajo (207 g y 10 g), respectivamente para las variables leche y carbonato de calcio.

Tabla 9. Respuesta óptima para el análisis sensorial, medio 1.

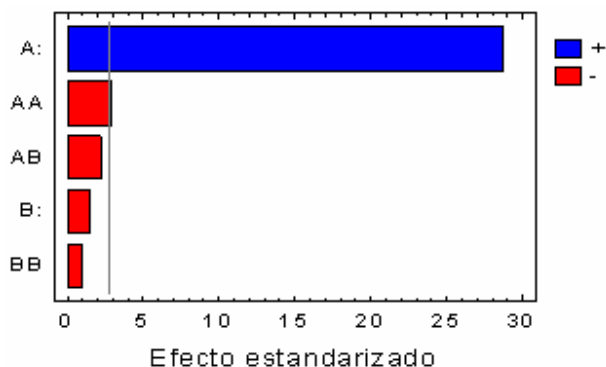
Goal: maximize Sensorial			
Optimum value = 0,627186			
Factor	Low	High	Optimum
Leche	69,0	207,0	207,0
Carbonato	7,0	21,0	10,5976

La tabla 9 muestra la combinación de niveles de las variables, los cuales maximizan el análisis sensorial. Según este análisis el valor óptimo para el análisis sensorial será de 0,627, en los niveles óptimos de las variables.

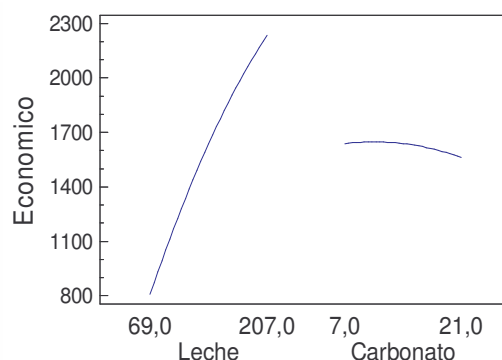
- Análisis para la respuesta económico.

Grafica 16. Análisis de diagramas para la respuesta económico, medio 1.

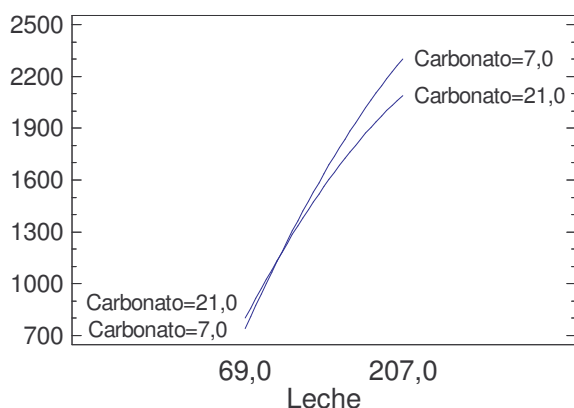
a) Diagrama de pareto.



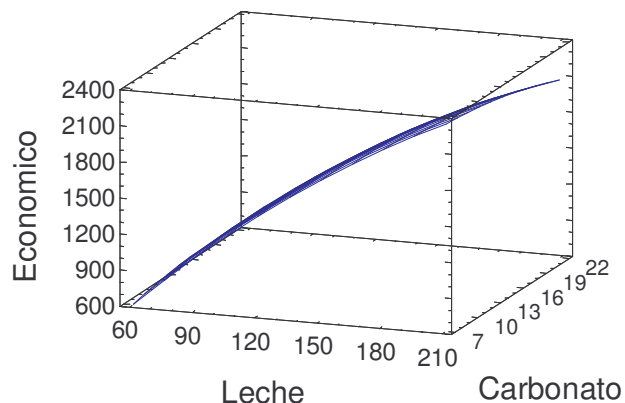
b) Diagrama de efectos principales



c) Diagrama de interacciones.



d) Superficie de respuesta.



La grafica 16a (diagrama de pareto), muestra que la leche y el cuadrado de la leche son las únicas variables que tienen efecto en la respuesta. La grafica 16b (diagrama de efectos principales), evidencia el efecto directamente proporcional de leche sobre la variable de respuesta, debido a que a medida que se aumenta su cantidad la variable de respuesta aumenta; el carbonato de calcio, evidencia que este es casi independiente debido a su linealidad. El efecto de la leche y del carbonato de calcio son cuadráticos, es decir que hay un punto máximo, que puede estar cerca de los 207 g y 7 g, respectivamente. La grafica 16c (diagrama de interacciones), el efecto de la interacción leche -carbonato de calcio, presenta su menor comportamiento en el nivel mínimo de concentración de carbonato de calcio y de leche; además demuestra que las variables presentan aditividad, por lo cual su efecto es irrelevante en la variable de respuesta debido a su baja significancia.

La ecuación que describe el modelo matemático ajustado, representa el comportamiento del análisis económico en el sustrato Leche -carbonato de calcio fermentado con del *Lactobacillus casei subsp. rhamnosus*.

$$\text{Económico} = -601,836 + 19,0469 * \text{Leche} + 35,898 * \text{Carbonato} - 0,0245141 * \text{Leche}^2 - 0,139752 * \text{Leche} * \text{Carbonato} - 0,787172 * \text{Carbonato}^2$$

En la grafica 16d (superficie de respuesta), se puede observar que la mejor respuesta se encuentra en la combinación de los niveles más bajos, (69 g y 7 g), respectivamente para las variables leche y carbonato de calcio.

Tabla 10. Respuesta óptima para el análisis económico (\$), medio 1.

Goal: minimize Economico			
Factor	Optimum value = 740,903		Optimum
	Low	High	
Leche	69,0	207,0	69,0
Carbonato	7,0	21,0	7,0

La tabla 10 muestra la combinación de niveles de las variables, los cuales minimizan el análisis económico. Según este análisis el valor optimo para el análisis económico será de \$740,903, en los niveles óptimos de las variables.

Con los resultados de los anteriores para biomasa, sensorial y económico, se determino el sustrato optimo en cuanto a estos análisis, mediante el análisis estadístico para la optimización de respuestas múltiples.

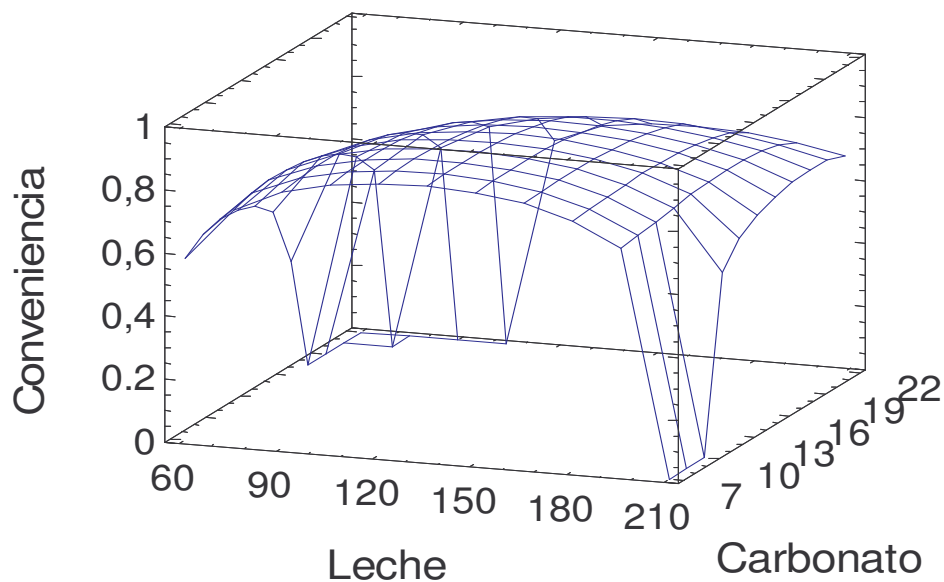
- **Optimización de respuestas múltiples para leche.**

Tabla 11. Optimización de respuestas múltiples para el medio 1.

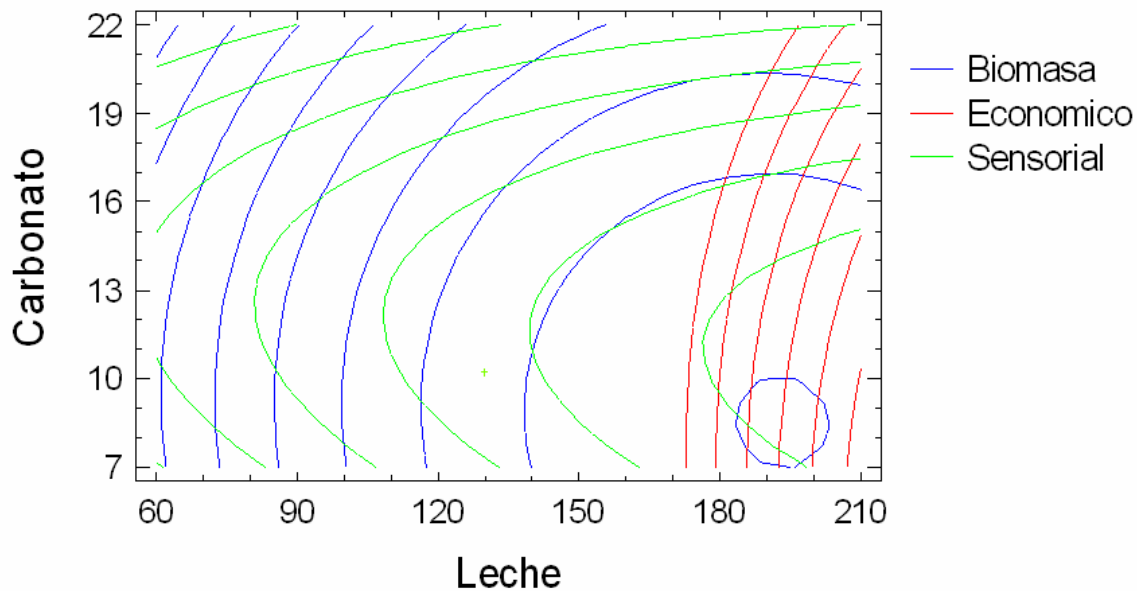
Response	Conveniencia		Goal	Peso	
	Low	High		First	Impact
Biomasa	1,58E9	1,95E9	Maximize	5,0	3,0
Económico	731,58	2171,12	Minimize	3,5	3,0
Sensorial	0,2	0,624	Maximize	1,5	3,0

La tabla 11 muestra los niveles altos y bajos de conveniencia, el objetivo para cada respuesta, además del peso asignado para cada una de ellas.

Grafica 17. Superficie de respuesta múltiple para el medio 1.



Grafica 18. Contornos estimados para superficie de respuesta múltiple para el medio 1.



En la grafica de la superficie de respuesta múltiple (grafica 17), se puede observar que la mejor respuesta se encuentra en la combinación de los niveles medios, (130 g y 10 g), para las variables leche y carbonato de calcio respectivamente, con un nivel de conveniencia 0,875803. En la grafica de contornos estimados para superficie de respuesta múltiple para

leche (grafica 18), se puede observar los contornos estimados para cada respuesta obtenidos de los análisis anteriores.

Tabla 12. Optimización de la conveniencia para el medio 1.

Factor	Optimum value = 0,875803		
	Low	High	Optimum
Leche	69,0	207,0	129,653
Carbonato	7,0	21,0	10,2138

Response		Optimum
Biomasa		9,60971E8
Económico		1555,05
Sensorial		0,544568

La tabla 12 muestra la combinación de niveles de las variables, los cuales maximizan la biomasa, el análisis sensorial y minimizan el análisis económico. Según este análisis el valor optimo para la respuesta múltiple fue, biomasa $9,609 \times 10^8$ Bact/mL, económico \$1555,05, y sensorial de 0,544, en los niveles óptimos de las variables.

7.3.2.3 Diseño experimental final-Leche soya, medio 2 (Anexo I).

Cuadro 20. Niveles y factores experimentales, medio 2.

Factor	Nivel		
	-1	0	+1
Leche de soya	69	138	207
Carbonato de Calcio	7	14	21

Tabla 21. Composición de los ensayos para la optimización del sustrato por 1 L, medio 2.

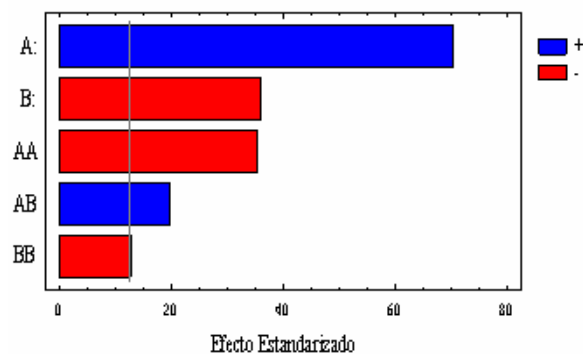
Ensayo	Leche de soya (g)	H. Soya (g)	Total (g)	Carbonato de calcio (g)
1	50,36	87,64	138	14
2	25,18	43,82	69	14
3	25,18	43,82	69	7
4	50,36	87,64	138	14
5	25,18	43,82	69	21
6	75,53	131,47	207	21
7	50,36	87,64	138	21
8	75,53	131,47	207	14
9	75,53	131,47	207	7
10	50,36	87,64	138	7

- **Análisis de varianza para la biomasa.**

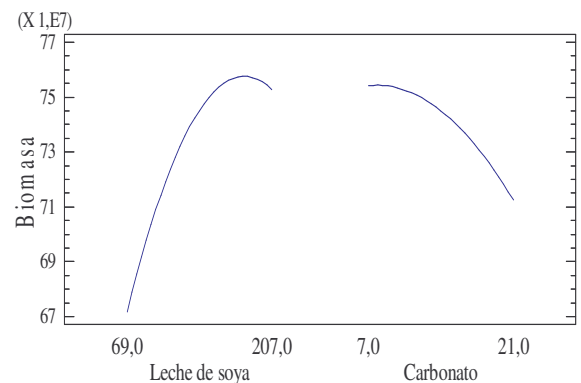
En el Análisis de varianza para la biomasa (Bact/mL), medio 2 (ver anexo L), el R - cuadrado indica que el diseño se explica en un 96,7624 % de variabilidad para la variable de respuesta, biomasa. El R – cuadrado ajustado para los grados de libertad es 92,7153 %, lo cual indica si las variables tienen efecto sobre la respuesta, lo que permite decir que el modelo fue bien ajustado. La prueba de falta de ajuste (lack of fit), determina si el diseño seleccionado es adecuado para describir los datos obtenidos o si debe emplearse otro modelo. El valor P para el lack of fit es mayor o igual a 0,05; por lo tanto el diseño planteado para este caso es el adecuado para los datos obtenidos, con un 95% de nivel de confianza. Se observó que el efecto de las variables (Leche de soya y Carbonato de Calcio) sobre la respuesta (biomasa), el efecto de la leche de soya al cuadrado, el carbonato de calcio al cuadrado y la interacción leche de soya-carbonato de calcio presentan un valor de P menor a 0,05 lo que indica el efecto significativo sobre la variable de respuesta.

Grafica 19. Análisis de diagramas para la biomasa (Bact/mL), medio 2.

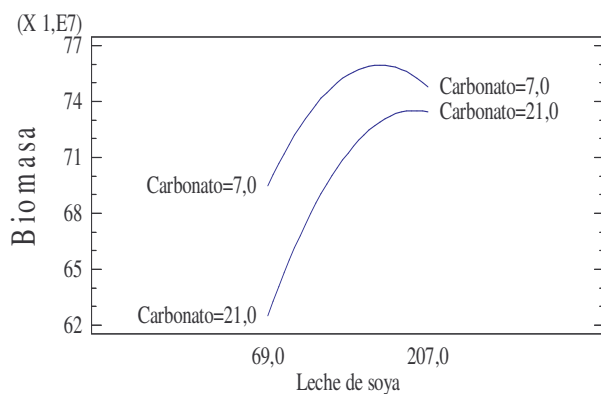
a) Diagrama de pareto.



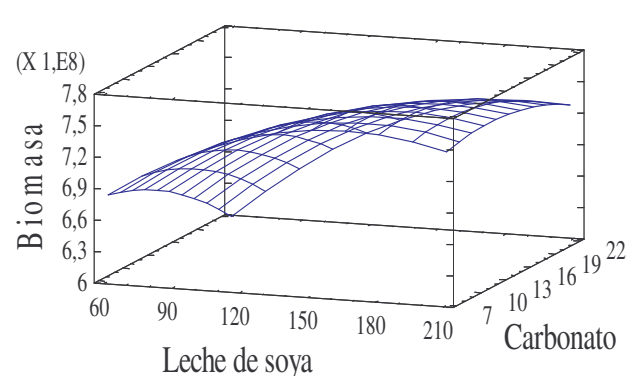
b) Diagrama de efectos principales



c) Diagrama de interacciones.



d) Superficie de respuesta



La grafica 19a (diagrama de pareto), muestra que la leche de soya, tiene un efecto positivo; y que al contrario el carbonato de calcio y la leche de soya al cuadrado tienen un efecto negativo sobre la variable de respuesta. La grafica 22b (diagrama de efectos principales),

evidencia el efecto directamente proporcional de leche de soya sobre la variable de respuesta, el carbonato de calcio, tienen un efecto inversamente proporcional. El efecto de la leche y del carbonato de calcio son cuadráticos, es decir que hay un punto máximo, que puede estar cerca de los 207 g y 7 g, respectivamente. La grafica 22c (diagrama de interacciones), el efecto de la interacción leche-carbonato de calcio, presenta su mejor comportamiento en el nivel mínimo de concentración de carbonato de calcio y con el nivel máximo de concentración de leche; además demuestra que las variables presentan aditividad, por lo cual su efecto es irrelevante en la variable de respuesta debido a su baja significancia.

La ecuación que describe el modelo matemático ajustado, representa el comportamiento del *Lactobacillus casei subsp. rhamnosus* en el sustrato Leche-carbonato de calcio.

$$\text{Biomasa} = 5,83524\text{E}8 + 2,08178\text{E}6 * \text{Leche de soya} - 241497,0 * \text{Carbonato} - 6886,31 * \text{Leche de soya}^2 + 28985,5 * \text{Leche de soya} * \text{Carbonato} - 240525,0 * \text{Carbonato}^2$$

En la grafica 22d (superficie de respuesta), se puede observar que la mejor respuesta se encuentra cerca de la combinación de los niveles alto y bajo (207 g y 7 g), respectivamente para las variables leche de soya y carbonato de calcio.

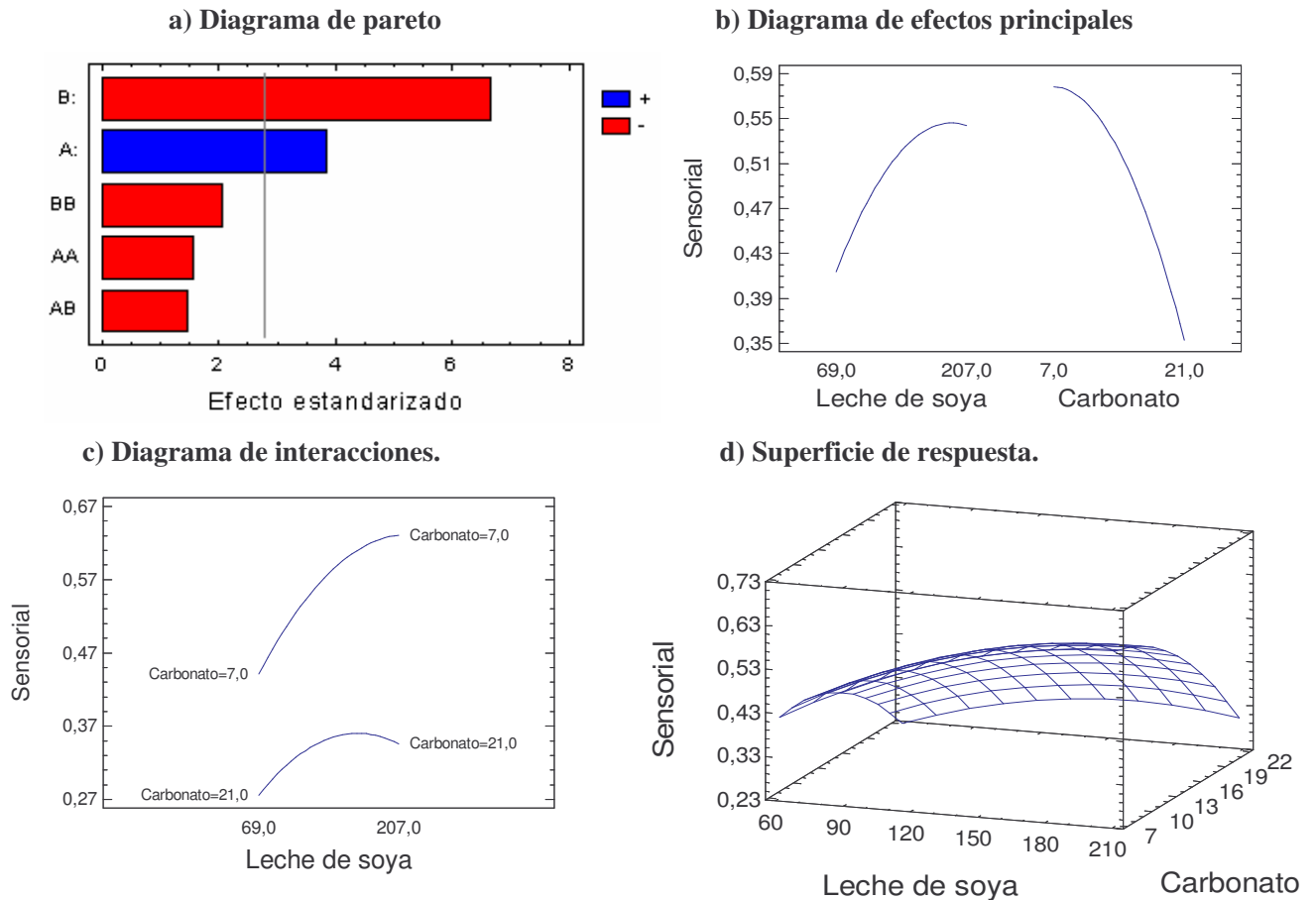
Tabla 13. Respuesta óptima para la biomasa (Bact/mL), medio 2.

Goal: maximize Biomasa			
Optimum value = 7,61258E8			
Factor	Low	High	Optimum
Leche de soya	69,0	207,0	171,91
Carbonato	7,0	21,0	9,85925

La tabla 13 muestra la combinación de niveles de las variables, los cuales maximizan la producción de biomasa. Según este análisis la producción máxima de biomasa será de $7,61 \times 10^8$ Bact/mL, en los niveles óptimos de las variables.

- **Análisis para la respuesta sensorial.**

Grafica 20. Análisis de diagramas para la respuesta sensorial, medio 2.



La grafica 20a (diagrama de pareto), muestra que la leche de soja tiene un efecto positivo; y que al contrario el carbonato de calcio tiene un efecto negativo sobre la variable de respuesta. La grafica 20b (diagrama de efectos principales), evidencia el efecto directamente proporcional de leche sobre la variable de respuesta, debido a que a medida que se aumenta su cantidad la variable de respuesta aumenta; el carbonato de calcio, evidencia una curva cuadrática negativa alcanzando el mejor valor de respuesta a su menor nivel.. El efecto de la leche de soja y del carbonato de calcio son cuadráticos, es decir que hay un punto máximo aunque en dos regiones diferentes, que puede estar cerca de los 207 g y 7 g, respectivamente. La grafica 20c (diagrama de interacciones), el efecto de la interacción leche de soja -carbonato de calcio, presenta su mejor comportamiento en el nivel mínimo de concentración de carbonato de calcio y con el nivel máximo de concentración de leche de soja; además demuestra que las variables presentan aditividad, por lo cual su efecto es irrelevante en la variable de respuesta debido a su baja significancia.

La ecuación que describe el modelo matemático ajustado, representa el comportamiento del análisis sensorial en el sustrato Leche de soya -carbonato de calcio fermentado con del *Lactobacillus casei subsp. rhamnosus*.

$$\text{Sensorial} = 0,104048 + 0,0042795 * \text{Leche de soya} + 0,0242313 * \text{Carbonato} - 0,0000089417 * \text{Leche de soya}^2 - 0,0000621118 * \text{Leche de soya} * \text{Carbonato} - 0,00113411 * \text{Carbonato}^2$$

En la grafica 20d (superficie de respuesta), se puede observar que la mejor respuesta se encuentra en la combinación de los niveles alto y bajo (207 g y 7 g), respectivamente para las variables leche y carbonato de calcio.

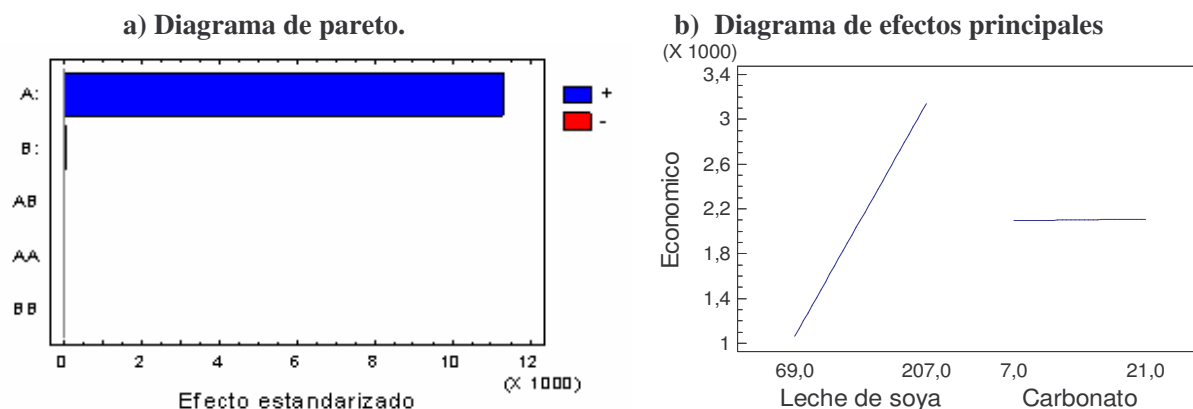
Tabla 14. Respuesta óptima para el análisis sensorial, medio 2.

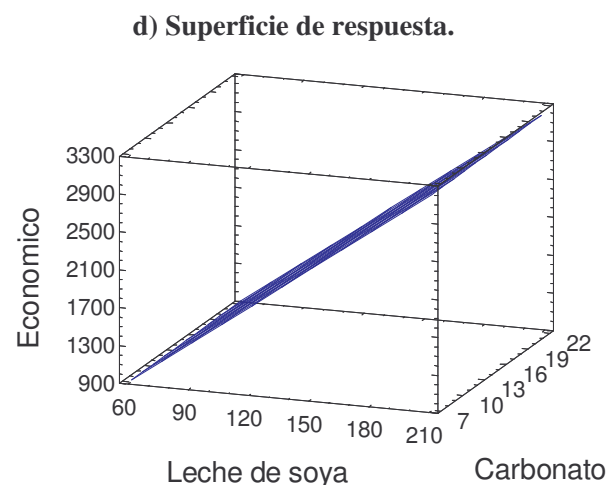
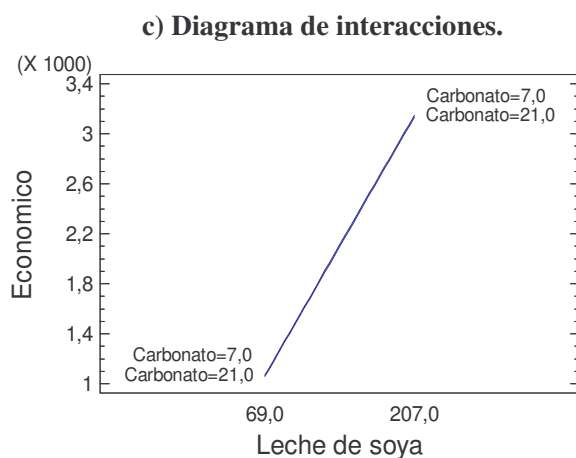
Goal: maximize Sensorial			
Optimum value = 0,63081			
Factor	Low	High	Optimum
Leche	69,0	207,0	207,0
Carbonato	7,0	21,0	7

La tabla 14 muestra la combinación de niveles de las variables, los cuales maximizan el análisis sensorial. Según este análisis el valor óptimo para el análisis sensorial será de 0,63, en los niveles óptimos de las variables.

- **Análisis para la respuesta económico.**

Grafica 21. Análisis de diagramas para la respuesta económico, medio 2.





La grafica 21a (diagrama de pareto), muestra que la leche de soya y el carbonato de calcio son las únicas variables que tienen efecto en la respuesta. La grafica 21b (diagrama de efectos principales), evidencia el efecto directamente proporcional de leche sobre la variable de respuesta, el carbonato de calcio, evidencia que este es casi independiente debido a su linealidad. El efecto de la leche y del carbonato de calcio son cuadráticos, es decir que hay un punto máximo, que puede estar cerca de los 207 g y 14 g, respectivamente. La grafica 21c (diagrama de interacciones), el efecto de la interacción leche de soya -carbonato de calcio, presenta su menor comportamiento en el nivel mínimo de concentración de carbonato de calcio y de leche de soya; además demuestra que las variables presentan aditividad, por lo cual su efecto es irrelevante en la variable de respuesta debido a su baja significancia.

La ecuación que describe el modelo matemático ajustado, representa el comportamiento del análisis económico en el sustrato Leche de soya-carbonato de calcio fermentado con del *Lactobacillus casei subsp. rhamnosus*.

$$\text{Económico} = 11,6786 + 15,0435 * \text{Leche de soya} + 1,03401 * \text{Carbonato} - 0,0000363069 * \text{Leche de soya}^2 + 0,000517598 * \text{Leche de soya} * \text{Carbonato} - 0,00291545 * \text{Carbonato}^2$$

En la grafica 24d (superficie de respuesta), se puede observar que la mejor respuesta se encuentra en la combinación de los niveles mas bajos, (69 g y 7 g), respectivamente para las variables leche de soya y carbonato de calcio.

Tabla 15. Respuesta óptima para el análisis económico (\$), medio 2.

Goal: minimize Economico			
Factor	Optimum value = 1056,86		Optimum
	Low	High	
Leche	69,0	207,0	69,0
Carbonato	7,0	21,0	7,0

La tabla 15 muestra la combinación de niveles de las variables, los cuales minimizan el análisis económico. Según este análisis el valor óptimo para el análisis económico será de \$1056,86 en los niveles óptimos de las variables. Con los resultados de los anteriores para biomasa, sensorial y económico, se determinó el sustrato óptimo en cuanto a estos análisis, mediante el análisis estadístico para la optimización de respuestas múltiples.

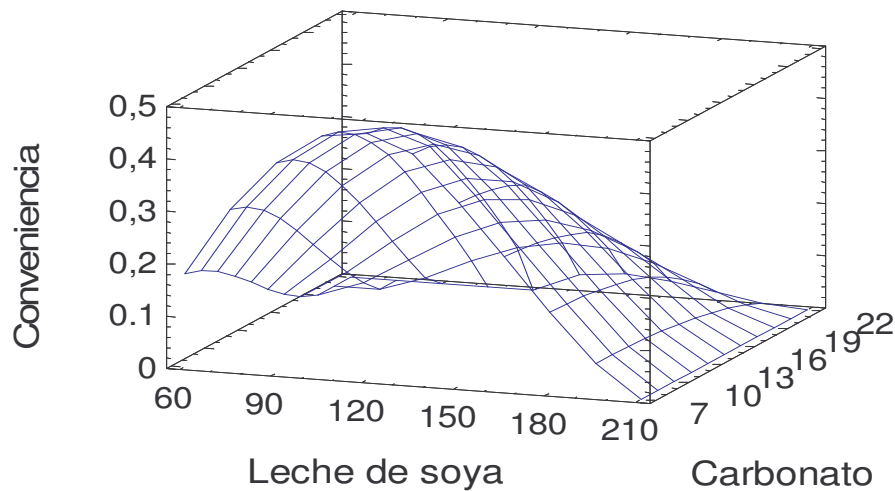
- **Optimización de respuestas múltiples para el medio 2.**

Tabla 16. Optimización de respuestas múltiples para el medio 2.

Response	Conveniencia		Goal	Peso First	Impact
	Low	High			
Biomasa	6,15E8	7,54E8	Maximize	5,0	3,0
Económico	1056,82	3146,78	Minimize	3,5	3,0
Sensorial	0,31	0,61	Maximize	1,5	3,0

La tabla 16 muestra los niveles altos y bajos de conveniencia, el objetivo para cada respuesta, además del peso asignado para cada una de ellas.

Grafica 22. Superficie de respuesta múltiple para el medio 2.



Grafica 23. Contornos estimados para superficie de respuesta múltiple para el medio 2.

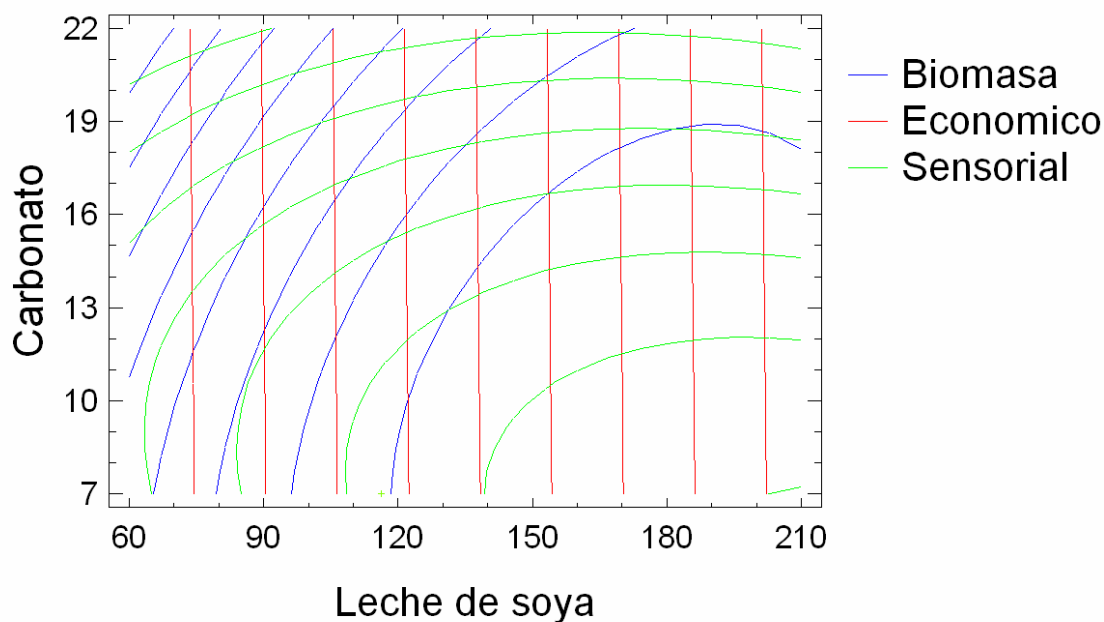


Tabla 17. Optimización de la conveniencia para el medio 2.

Optimum value = 0,471638			
Factor	Low	High	Optimum
Leche	69,0	207,0	116,204
Carbonato	7,0	21,0	7
Response		Optimum	
Biomasa		7,42548E8	
Economico		1766,83	
Sensorial		0,544125	

En la grafica de la superficie de respuesta múltiple (grafica 22), se puede observar que la mejor respuesta se encuentra en la combinación de los niveles medio y bajo, (115 g y 7 g), para las variables leche y carbonato de calcio respectivamente, con un nivel de conveniencia 0,471683. En la grafica de contornos estimados para superficie de respuesta múltiple para leche (figura 23), se puede observar los contornos estimados para cada respuesta obtenidos de los análisis anteriores.

La tabla 17 muestra la combinación de niveles de las variables, los cuales maximizan la biomasa, el análisis sensorial y minimizan el análisis económico. Según este análisis el valor óptimo para la respuesta múltiple fue, biomasa $7,42548 \times 10^8$ Bact/mL, económico \$1766,83, y sensorial de 0,544125, en los niveles óptimos de las variables.

7.3.2.4 Diseño experimental final-Suero, medio 3 (Anexo I).

Cuadro 22. Niveles y factores experimentales, medio 3.

Factor	Nivel		
	-1	0	+1
Suero	69	138	207
Carbonato de Calcio	7	14	21

Cuadro 23. Composición de los ensayos para la optimización del sustrato por 1 L, medio 3.

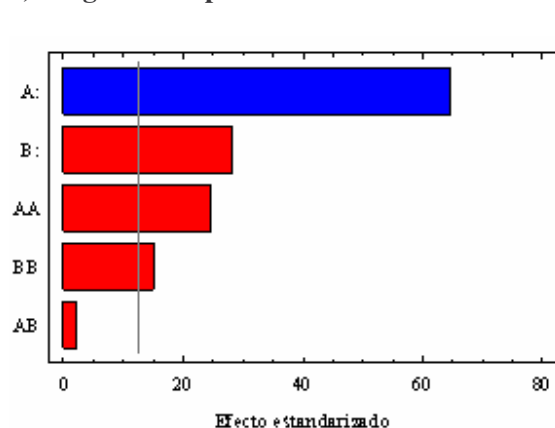
Ensayo	Suero (g)	H. Soya (g)	Total (g)	Carbonato de calcio (g)
1	32,18	105,82	138	14
2	16,09	52,91	69	14
3	16,09	52,91	69	7
4	32,18	105,82	138	14
5	16,09	52,91	69	21
6	48,27	158,73	207	21
7	32,18	105,82	138	21
8	48,27	158,73	207	14
9	48,27	158,73	207	7
10	32,18	105,82	138	7

- **Análisis de varianza para la biomasa.**

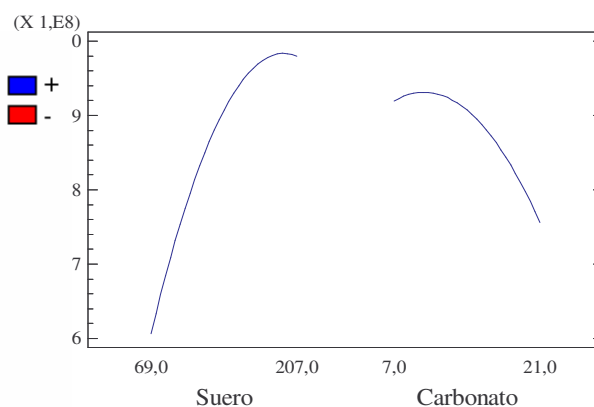
En el Análisis de varianza para la biomasa (Bact/mL), medio 3 (ver anexo L), el R - cuadrado indica que el diseño se explica en un 97,8052 % de variabilidad para la variable de respuesta, biomasa. El R – cuadrado ajustado para los grados de libertad es 95,0617 %, lo cual indica si las variables tienen efecto sobre la respuesta, lo que permite decir que el modelo fue bien ajustado. La prueba de falta de ajuste (lack of fit), determina si el diseño seleccionado es adecuado para describir los datos obtenidos o si debe emplearse otro modelo. El valor P para el lack of fit es mayor o igual a 0,05; por lo tanto el diseño planteado para este caso es el adecuado para los datos obtenidos, con un 95% de nivel de confianza. Se observó que el efecto de las variables (Suero y Carbonato de Calcio) sobre la respuesta (biomasa) y el efecto de la leche en polvo y del carbonato de calcio al cuadrado presentan un valor de P menor a 0,05 lo que indica el efecto significativo sobre la variable de respuesta; mientras que el efecto de la interacción leche en polvo-carbonato de calcio presentan valores de P mayores a 0,05, lo cual muestra un efecto poco significativo en la variable respuesta.

Grafica 24. Análisis de diagramas para la biomasa (Bact/mL), medio 3.

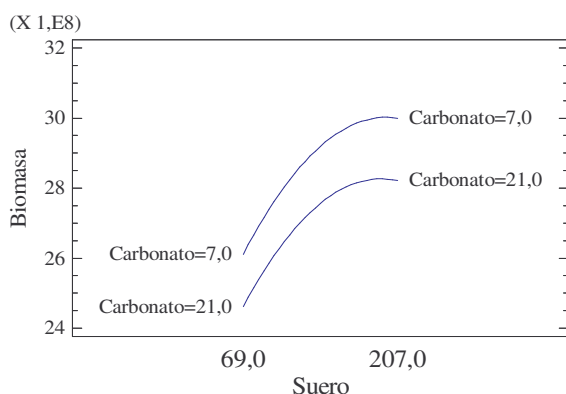
a) Diagrama de pareto.



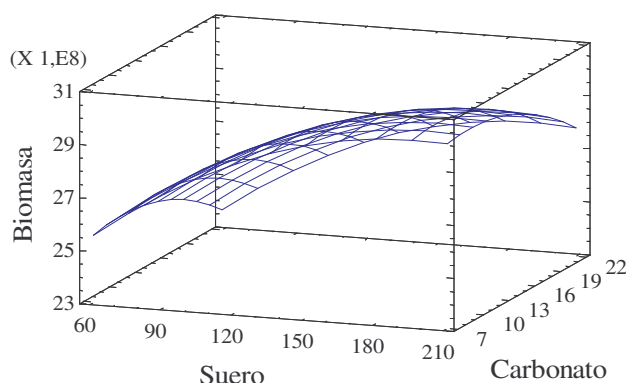
b) Diagrama de efectos principales



c) Diagrama de interacciones.



d) Superficie de respuesta



La grafica 24a (diagrama de pareto), muestra que el suero, tiene un efecto positivo; y que al contrario el carbonato de calcio y el suero y el carbonato de calcio al cuadrado tienen un efecto negativo sobre la variable de respuesta. La grafica 27b (diagrama de efectos principales), evidencia el efecto directamente proporcional de leche sobre la variable de respuesta, debido a que a medida que se aumenta su cantidad la variable de respuesta aumenta; el carbonato de calcio, tienen un efecto inversamente proporcional, ya que a medida que aumenta la cantidad de éste se disminuye la respuesta. El efecto del suero y del carbonato de calcio son cuadráticos, es decir que hay un punto máximo, que puede estar cerca de los 207 g y 7 g, respectivamente. La grafica 24c (diagrama de interacciones), el efecto de la interacción suero-carbonato de calcio, presenta su mejor comportamiento en el nivel mínimo de concentración de carbonato de calcio y con el nivel máximo de concentración de suero; además demuestra que las variables presentan aditividad, por lo cual su efecto es irrelevante en la variable de respuesta debido a su baja significancia.

La ecuación que describe el modelo matemático ajustado, representa el comportamiento del *Lactobacillus casei subsp. rhamnosus* en el sustrato suero-carbonato de calcio:

$$\text{Biomasa} = 1,93286\text{E}9 + 9,54796\text{E}6 * \text{Suero} + 3,0068\text{E}7 * \text{Carbonato} - 24004,6 * \text{Suero}^2 - 15528,0 * \text{Suero} * \text{Carbonato} - 1,41399\text{E}6 * \text{Carbonato}^2$$

En la grafica 24d (superficie de respuesta), se puede observar que la mejor respuesta se encuentra cercana a la combinación de los niveles alto y bajo (207 g y 7 g), respectivamente para las variables suero y carbonato de calcio.

Tabla 18. Respuesta optima para la biomasa (Bact/mL), medio 3.

Goal: maximize Biomasa

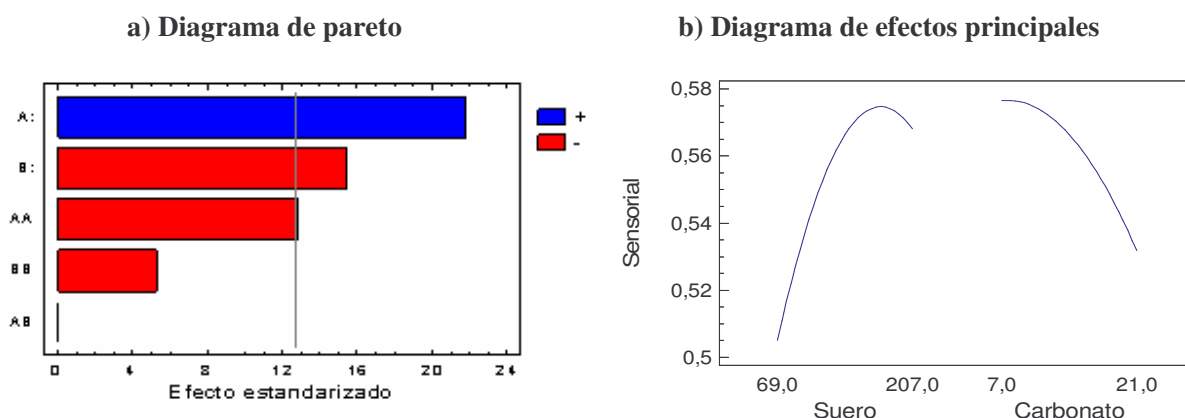
Optimum value = 3,01122E9

Factor	Low	High	Optimum
Leche	69,0	207,0	195,772
Carbonato	7,0	21,0	9,55725

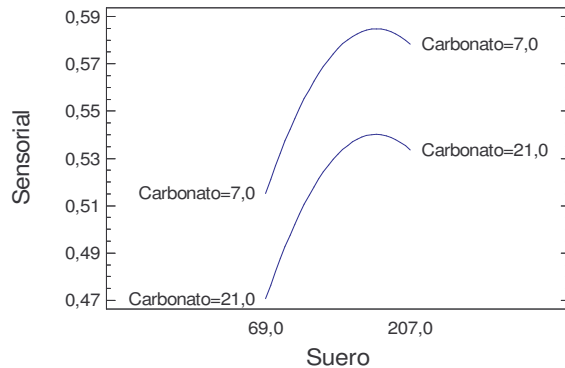
La tabla 18 muestra la combinación de niveles de las variables, los cuales maximizan la producción de biomasa. Según este análisis la producción máxima de biomasa será de $3,01122 \times 10^9$ Bact/mL, en los niveles óptimos de las variables.

- **Análisis para la respuesta sensorial.**

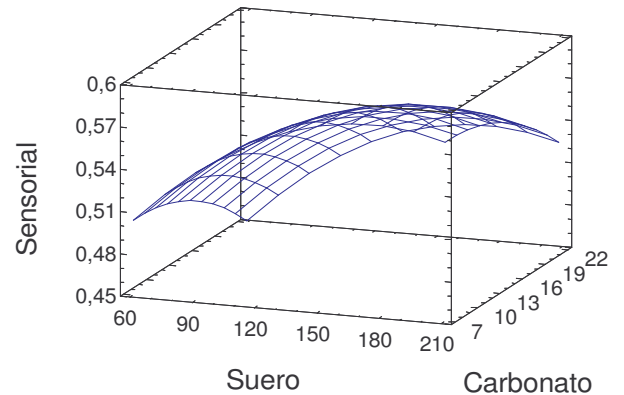
Grafica 25. Análisis de diagramas para la respuesta sensorial, medio 3.



c) Diagrama de interacciones.



d) Superficie de respuesta.



La grafica 25a (diagrama de pareto), muestra que el suero tiene un efecto positivo; y que al contrario el carbonato de calcio y el suero al cuadrado tienen un efecto negativo sobre la variable de respuesta. La grafica 25b (diagrama de efectos principales), evidencia el efecto directamente proporcional de leche sobre la variable de respuesta, debido a que a medida que se aumenta su cantidad la variable de respuesta aumenta; el carbonato de calcio, evidencia una curva cuadrática negativa alcanzando el mejor valor de respuesta a su menor nivel.. El efecto del suero y del carbonato de calcio son cuadráticos, es decir que hay un punto máximo aunque en dos regiones diferentes, que puede estar cerca de los 200 g y 7 g, respectivamente. La grafica 25c (diagrama de interacciones), el efecto de la interacción suero-carbonato de calcio, presenta su mejor comportamiento en el nivel mínimo de concentración de carbonato de calcio y con el nivel máximo de concentración de leche; además demuestra que las variables presentan aditividad, por lo cual su efecto es irrelevante en la variable de respuesta debido a su baja significancia.

La ecuación que describe el modelo matemático ajustado, representa el comportamiento del análisis sensorial en el sustrato Suero -carbonato de calcio fermentado con el *Lactobacillus casei subsp. rhamnosus*.

$$\text{Sensorial} = 0,38031 + 0,00217909*\text{Suero} + 0,00378912*\text{Carbonato} - 0,00000624119*\text{Suero}^2 + 0,0*\text{Suero}*\text{Carbonato} - 0,000249271*\text{Carbonato}^2$$

En la grafica 25d (superficie de respuesta), se puede observar que la mejor respuesta se encuentra en la combinación de los niveles alto y bajo (200 g y 7 g), respectivamente para las variables suero y carbonato de calcio.

Tabla 19. Respuesta óptima para el análisis sensorial, medio 3.

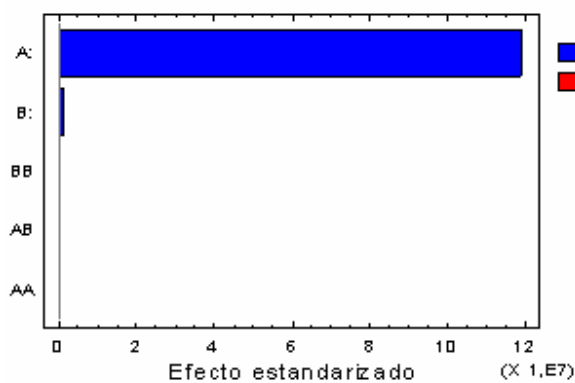
Goal: maximize Sensorial Optimum value = 0,584914			
Factor	Low	High	Optimum
Leche	69,0	207,0	174,562
Carbonato	7,0	21,0	7,59798

La tabla 19 muestra la combinación de niveles de las variables, los cuales maximizan el análisis sensorial. Según este análisis el valor óptimo para el análisis sensorial será de 0,5849, en los niveles óptimos de las variables.

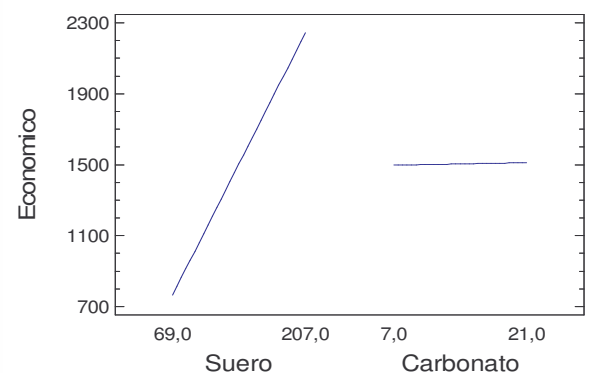
- **Análisis para la respuesta económico.**

Grafica 26. Análisis de diagramas para la respuesta económico, medio 3.

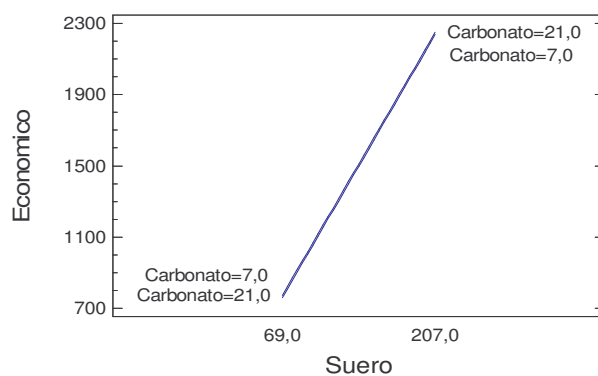
a) Diagrama de pareto.



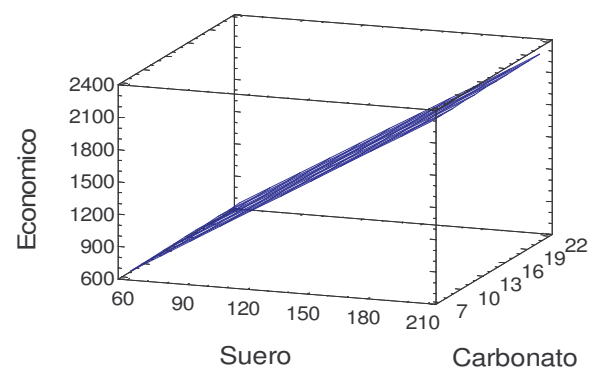
b) Diagrama de efectos principales



c) Diagrama de interacciones.



d) Superficie de respuesta.



La grafica 26a (diagrama de pareto), muestra que el suero y el carbonato de calcio son las únicas variables que tienen efecto en la respuesta. La grafica 26b (diagrama de efectos principales), evidencia el efecto directamente proporcional de leche sobre la variable de respuesta, el carbonato de calcio, evidencia que este es casi independiente debido a su linealidad. El efecto del suero y del carbonato de calcio es lineal, es decir que no hay un punto máximo, el punto donde se minimiza la respuesta es 69 g., 7 g. respectivamente. La grafica 26c (diagrama de interacciones), el efecto de la interacción suero-carbonato de calcio, presenta su menor comportamiento en el nivel mínimo de concentración de carbonato de calcio y de leche; además demuestra que las variables presentan aditividad, por lo cual su efecto es irrelevante en la variable de respuesta debido a su baja significancia.

La ecuación que describe el modelo matemático ajustado, representa el comportamiento del análisis económico en el sustrato Suero-carbonato de calcio fermentado con del *Lactobacillus casei subsp. rhamnosus*.

$$\text{Económico} = 11,81 + 10,7148 * \text{Suero} + 1,0 * \text{Carbonato}$$

En la grafica 26d (superficie de respuesta), se puede observar que la mejor respuesta se encuentra en la combinación de los niveles mas bajos, (69 g y 7 g), respectivamente para las variables suero y carbonato de calcio.

Tabla 20. Respuesta optima para el análisis económico (\$), medio 3.

Goal: minimize Economico			
Optimum value = 758,13			
Factor	Low	High	Optimum
Leche	69,0	207,0	69,0
Carbonato	7,0	21,0	7,0

La tabla 20 muestra la combinación de niveles de las variables, los cuales minimizan el análisis económico. Según este análisis el valor optimo para el análisis económico será de \$ 758,13, en los niveles óptimos de las variables. Con los resultados de los anteriores para biomasa, sensorial y económico, se determino el sustrato optimo en cuanto a estos análisis, mediante el análisis estadístico para la optimización de respuestas múltiples.

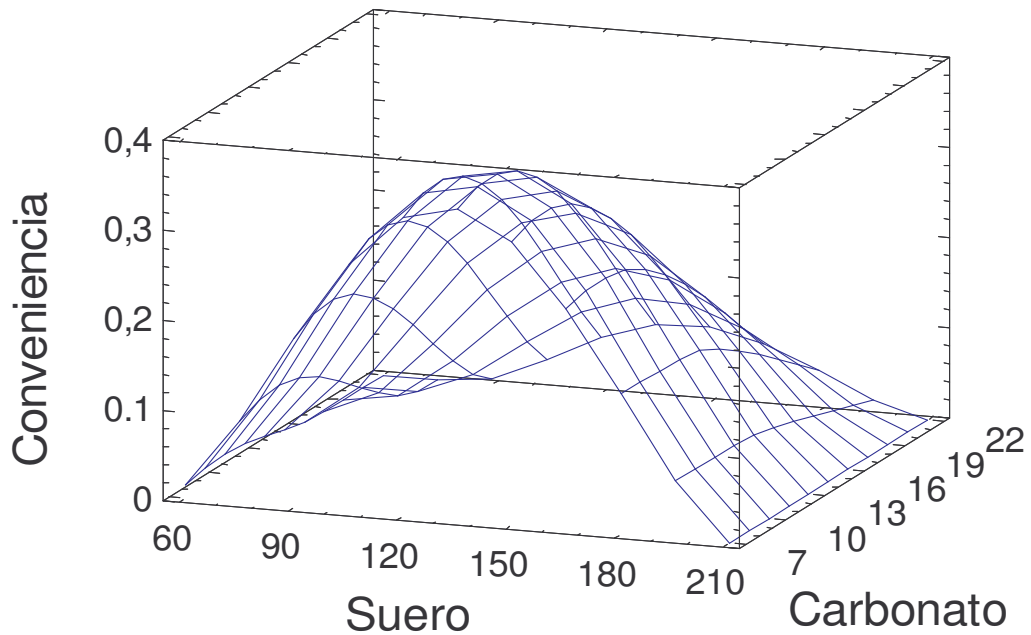
- Optimización de respuestas múltiples para el medio 3.

Tabla 21. Optimización de respuestas múltiples para el medio 3.

Response	Conveniencia		Goal	Peso	
	Low	High		First	Impact
Biomasa	2,49E9	2,99E9	Maximize	5,0	3,0
Económico	758,13	2250,77	Minimize	3,5	3,0
Sensorial	0,48	0,58	Maximize	1,5	3,0

La tabla 21 muestra los niveles altos y bajos de conveniencia, el objetivo para cada respuesta, además del peso asignado para cada una de ellas.

Grafica 27. Superficie de respuesta múltiple para el medio 3.



Grafica 28. Contornos estimados para superficie de respuesta múltiple para el medio 3.

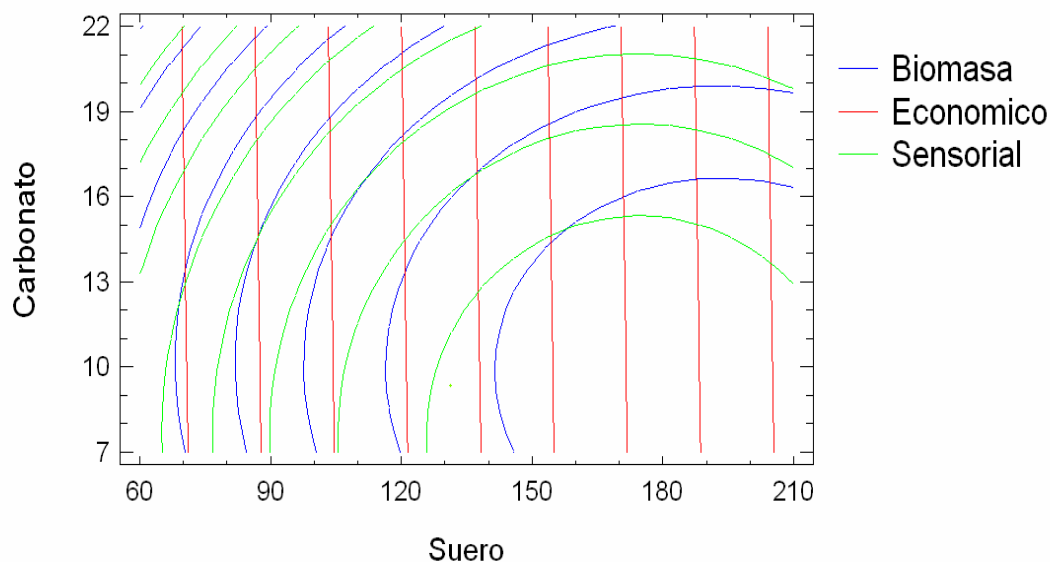


Tabla 22. Optimización de la conveniencia para el medio 3.

Optimum value = 0,360527			
Factor	Low	High	Optimum
Leche	69,0	207,0	131,284
Carbonato	7,0	21,0	9,36091
		Response	Optimum
		Biomasa	2,9111E9
		Economico	1427,85
		Sensorial	0,572446

En la grafica de la superficie de respuesta múltiple (grafica 27), se puede observar que la mejor respuesta se encuentra en la combinación de los niveles medios, (130 g y 10 g), para las variables leche y carbonato de calcio respectivamente, con un nivel de conveniencia 0,360527. En la grafica de contornos estimados para superficie de respuesta múltiple para leche (grafica 28), se puede observar los contornos estimados para cada respuesta obtenidos de los análisis anteriores.

La tabla 22 muestra la combinación de niveles de las variables, los cuales maximizan la biomasa, el análisis sensorial y minimizan el análisis económico. Según este análisis el valor óptimo para la respuesta múltiple fue, biomasa $2,91 \times 10^9$ Bact/mL, económico \$1427,85 por litro, y sensorial de 0,572, en los niveles óptimos de las variables.

Cuadro 24. Composiciones y respuestas finales de los 4 sustratos evaluados.

Sustrato	Leche en polvo – Leche – Soya – Suero (g)	Carbonato	Biomasa (Bact/mL)	Sensorial	Económico (\$/L)
Control	133,628	7	1,8803E9	0,548402	1399,18
2	129,653	10,2138	9,60971E8	0,544568	1555,05
3	116,204	7	7,42548E8	0,544125	1766,83
4	131,284	9,36	2,9111E9	0,572446	1427,85

Después de realizar los análisis de optimización múltiple para los cuatro sustratos se obtuvo cuatro composiciones óptimas, con sus respectivas respuestas, como se observa en el cuadro 24.

Cuadro 25. Determinación del mejor sustrato fermentado.

	Biomasa	Económico	Sensorial	Resultado total
	0,5	0,15	0,35	
L. Polvo	9,40E+08	209,79	0,19	9,40E+08
Leche	4,81E+08	231,03	0,19	4,81E+08
Leche de Soya	3,71E+08	265,02	0,19	3,71E+08
Suero	1,46E+09	214,18	0,20	1,46E+09

Para poder determinar cual es el mejor sustrato se asignó porcentajes a cada una de las respuestas, obteniéndose un resultado total, escogiéndose el sustrato suero debido a que obtuvo el mayor resultado total respecto a los otros sustratos, que podría deberse a que el suero es rico en proteínas lactoséricas como las albúminas y globulinas, rico en lisina y triptófano, bien equilibrado en aminoácidos sulfurados, gracias al contenido elevado de cistina y posee una gran variedad de sales minerales y vitaminas¹⁰¹. Además la adición de suero al sustrato confiere una mejor viscosidad, mejora la producción de ácidos y no produce cambios significativos en la textura y el sabor¹⁰².

El medio leche de soya, tuvo el menor resultado en la determinación del mejor sustrato fermentado, esto podría verse influenciado por que la leche de soya tiene una mínima cantidad de lactosa en comparación con los otros medios, que como afirma Kandler¹⁰³, además la lactosa es la principal fuente de carbono que degrada el *Lactobacillus casei subsp. rhamnosus* ya que su hábitat natural son los productos lácteos.

¹⁰¹ SPREER, E., Op. cit., p. 42.

¹⁰² AMIOT, Jean. Ciencia y tecnología de la leche: principios y aplicaciones. Ed. ACRIBIA, Zaragoza. España. 1991. p. 85.

¹⁰³ KANDLER, U. et al., Op. cit., p. 32.

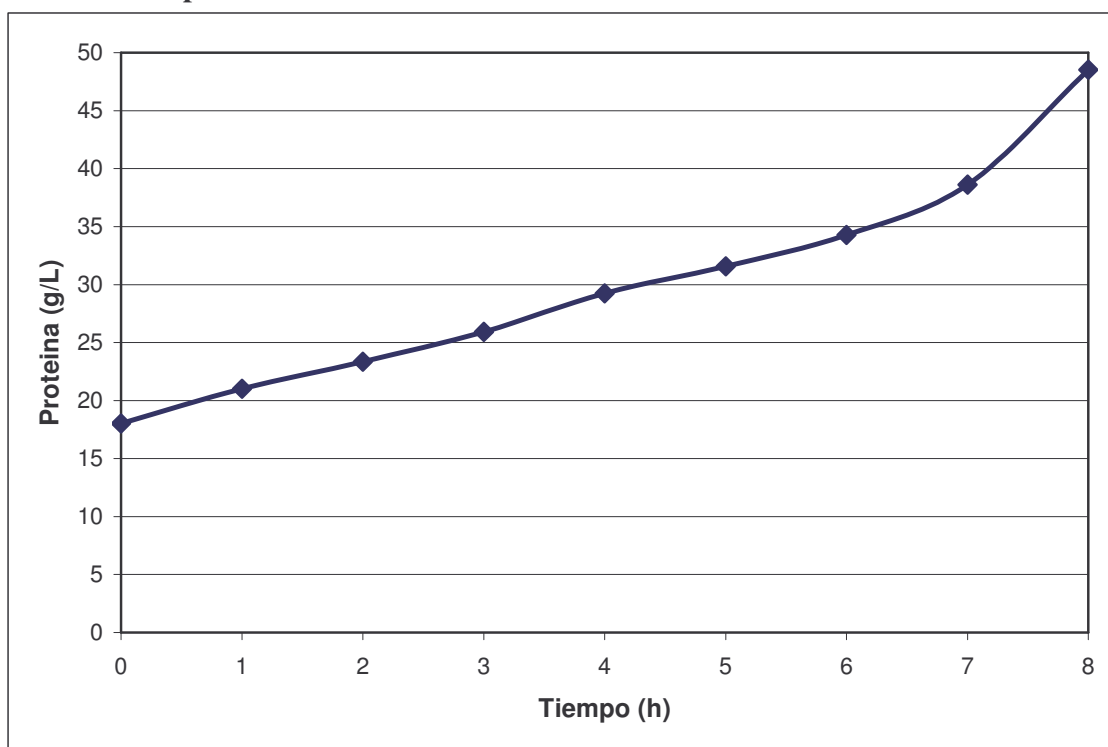
Como se observa en el cuadro 25, el mejor medio en la respuesta económica fue el medio control (leche en polvo) debido principalmente a la no utilización de harina de soya en su formulación como en los otros medios, que igualmente hubiera incrementado sus costos si en su formulación se utilizará las dos fuentes de proteína.

El costo de producción por litro de medio óptimo fue \$ 1427,85, este es un costo relativamente bajo teniendo en cuenta el precio de venta de productos similares que se encuentran en el mercado, donde los 100 g de producto cuestan \$ 1000.

7.4 FASE IV

7.4.1 Parámetros de fermentación sustrato óptimo.

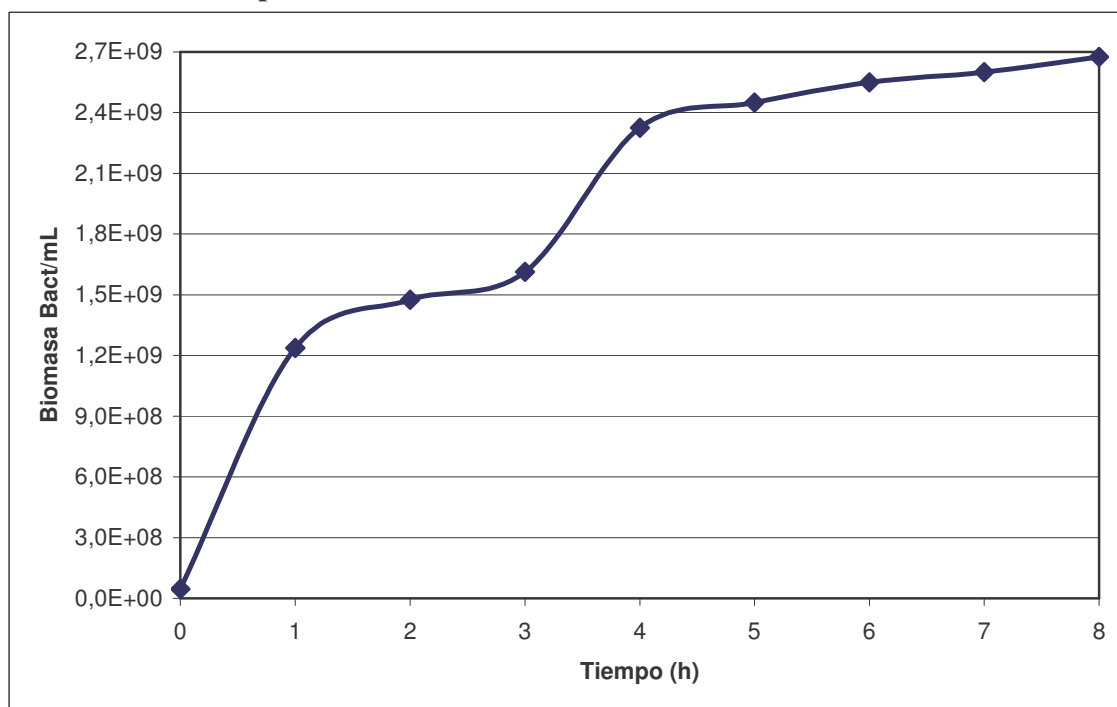
Grafica 29. Producción de proteínas de *Lactobacillus casei subsp. rhamnosus* en el medio miel de panela-suero.



Al evaluar la producción de proteínas de *Lactobacillus casei subsp. rhamnosus* en el medio miel de panela – suero, se observó que la producción se incremento desde el tiempo 0 hasta el tiempo 7 (grafica 29), luego de este tiempo se presento un leve incremento en la producción con un concentración final de proteínas de 30,51 g/L, siendo este valor superior en 5g al que se obtuvo en el medio miel de panela-leche en polvo al cabo de las 8 horas, lo

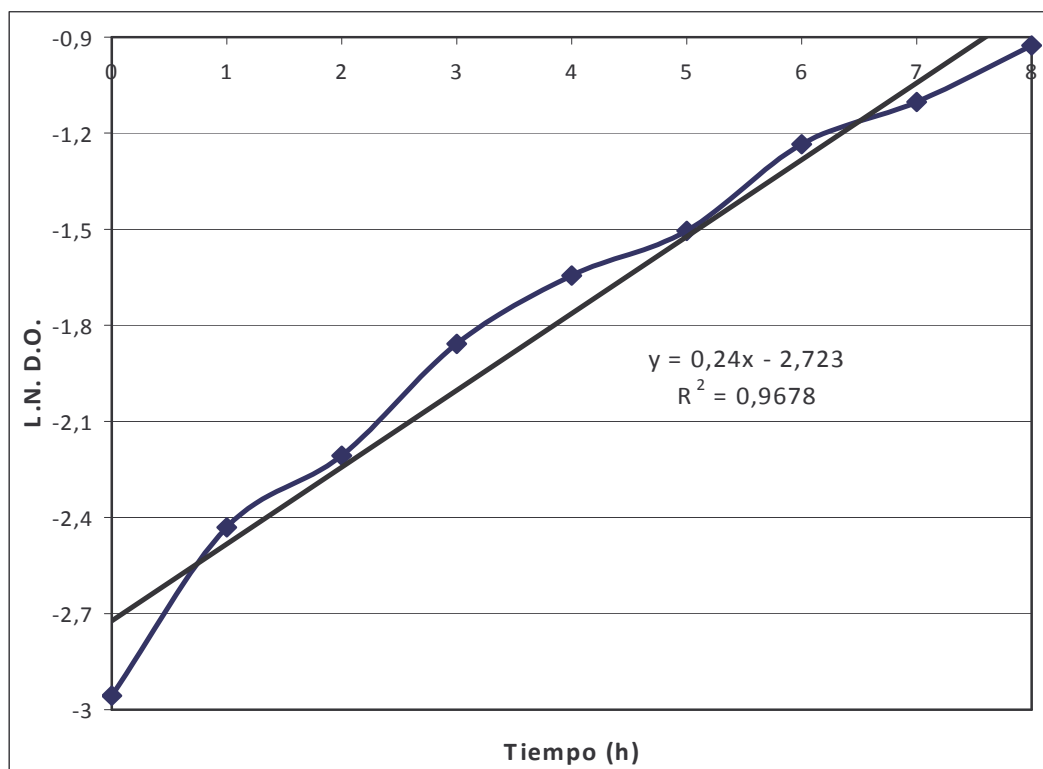
cual podría deberse a la mejor asimilación del sustrato optimo por *Lactobacillus casei subsp. rhamnosus* por sus propiedades ya mencionadas.

Grafica 30. Formación de biomasa (Bact/mL) de *Lactobacillus casei subsp. rhamnosus* en el medio miel de panela-suero.



En la grafica 30 se puede observar que la producción de biomasa se comienza a estabilizar a partir de las 4 horas hasta el tiempo de cosecha en donde alcanza una concentración de $2,68 \times 10^9$ Bact/mL, este valor es muy similar al predicho por el diseño estadístico el cual fue de $2,91 \times 10^9$ Bact/mL, acertando este diseño en aproximadamente 92 %, respecto al valor predicho. También cabe destacar que en comparación con el medio control, el medio optimizado presenta una mayor producción de biomasa, debido esto a su gran contenido de proteínas y aminoácidos esenciales.

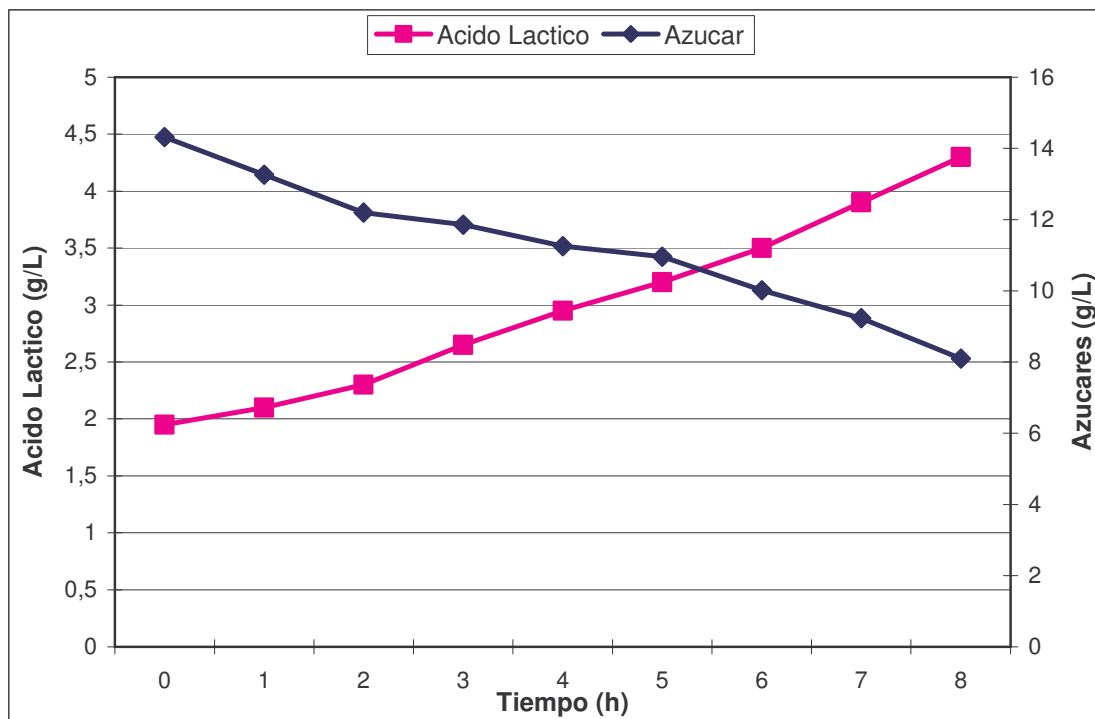
Grafica 31. Cinetica de crecimiento para el *Lactobacillus casei subsp. rhamnosus* en el medio miel de panela-suero.



En la grafica 31 se puede observar que la velocidad de crecimiento es $0,24 \text{ h}^{-1}$, siendo este valor mayor al alcanzado con el medio miel de panela-leche en polvo y al valor reportado por Montes, A *et al.* 2003, debido a que la combinación miel de panela-suero proporciona unas características optimas para el mejor crecimiento de esta bacteria, ya que la miel de panela proporciona una gran cantidad de azucares asimilables como lo afirma Tseng¹⁰⁴, y el suero, además de ser una excelente fuente de nitrógeno aporta una gran cantidad de lactosa la cual influye positivamente en el crecimiento.

¹⁰⁴ TSENG, C.P., Op. Cit., p. 64.

Grafica 32. Consumo de azúcares totales y producción de ácido láctico por *Lactobacillus casei subsp. rhamnosus* en el medio miel de panela-suero.



Al inicio de la fermentación se registro una concentración de 14,32 g/L de azúcares y 1,95 g/L de ácido láctico, y transcurridas las 8 horas se consumieron 6,22g/L y se produjo 2,35 g/L de azúcares y ácido láctico respectivamente.

De acuerdo a los datos de la grafica 31, se calculo $Y_{p/s}$.

$$Y_{p/s} = \frac{P_f - P_i}{S_i - S_f}$$

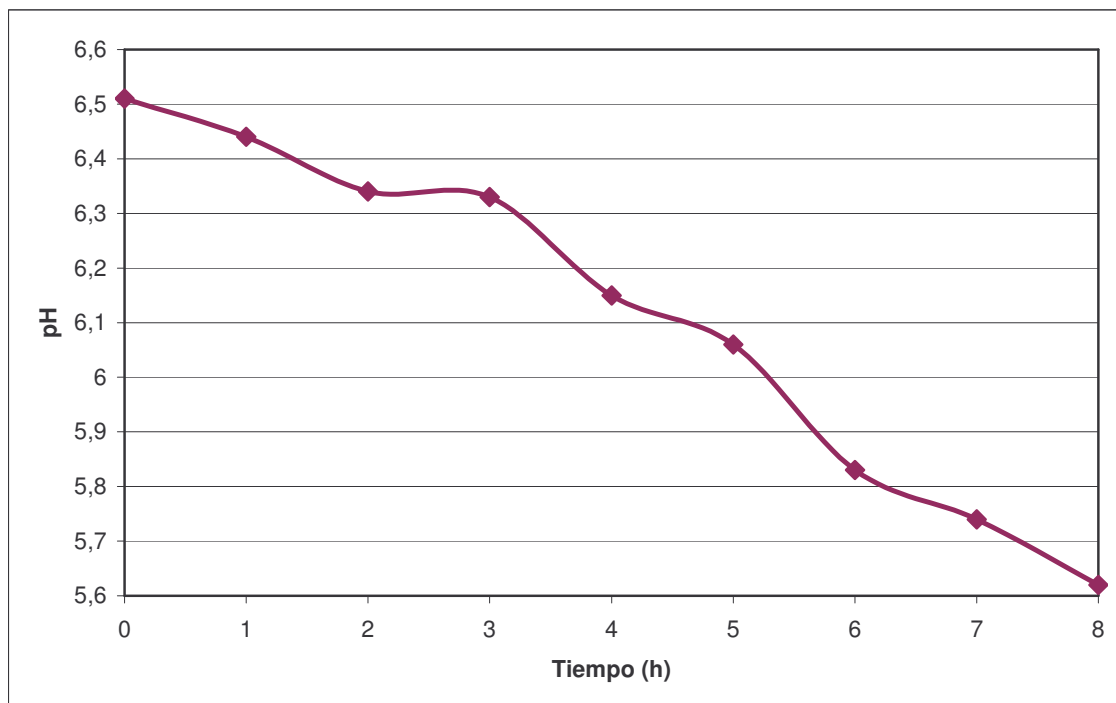
$$Y_{p/s} = \frac{4,30 - 1,95}{14,32 - 8,10} = 0,38 = 38 \%$$

Siendo este valor mayor al obtenido con el medio control y similar al obtenido por Pazos, M.¹⁰⁵, debido a la menor utilización de miel de panela como lo plantea Tseng¹⁰⁶. Observándose que con la utilización de 7,485 g/L miel de panela utilizada en esta investigación y 14,97 g/L melaza utilizada en investigaciones anteriores se obtuvo similar rendimiento de ácido láctico.

¹⁰⁵ PAZOS, M. Álvaro Jairo. Op. Cit., p. 22.

¹⁰⁶ TSENG, C.P. Op. Cit., p. 64.

Grafica 33. Cambios de pH en el medio miel de panela-suero fermentado con *Lactobacillus casei subsp. rhamnosus*.



El pH inicial en el medio miel de panela- suero fue de 6,51 alcanzando a las 8 horas de fermentación un valor de 5,62. Se observó un descenso rápido del pH, el cual puede ser atribuido a la menor cantidad de carbonato de calcio en el medio respecto al medio control, ya que este actúa como sustancia buffer.

7.4.2 Seguimiento del producto en vida de anaquel.

El producto se mantuvo en condiciones de refrigeración (2-8°C), el análisis se realizó cada 5 días por espacio de 15 días.

Cuadro 26. Seguimiento del producto en vida de anaquel (ANEXO M).

Día	% Ácido láctico	Análisis Organoléptico	Biomasa (Bact/mL)	Análisis Microbiológico		
				NMP Coliformes <i>totales</i> /g	NMP Coliformes <i>fécales</i> /g	Hongos y levaduras/g
0	0,86	Me gusta un poco	$2,68 \times 10^9$	<20	<3	<500
5	0,98	Me gusta un poco	$6,5 \times 10^9$	3	<3	180
10	1,10	Ni me gusta ni, me disgusta	$7,25 \times 10^9$	3	<3	200
15	1,32	Ni me gusta ni, me disgusta	$8,18 \times 10^9$	<20	<3	<500

En el cuadro 26 se puede observar que hasta los 15 días que se realizó el seguimiento de vida de anaquel el producto se encontró dentro los parámetros analizados, aunque debe tenerse en cuenta que en el análisis organoléptico va disminuyendo la aceptación a través del tiempo, lo que hace necesario que al producto se le realice un estudio para mejorar las características organolépticas y así seguramente poder aumentar la vida útil del producto, ya que el análisis microbiológico y el % de ácido láctico se encuentran dentro los rangos exigidos por el INVIMA¹⁰⁷, y la biomasa se encuentra por encima de la cantidad planteada por Montes, M. *et al.*¹⁰⁸, para ejercer un antagonismo contra el *Helicobacter pylori*, también en el estudio para la viabilidad del *Bifidobacterium infantis* y el *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* en un cultivo iniciador de leche realizado por Maldonado L. *et al.*¹⁰⁹, se concluye que la viabilidad de la cepa probiótica *L. casei* subsp. *rhamnosus* al momento de ser consumida, sea este el momento en que fue preparada o después de ser almacenada en refrigeración (8°C) por una hora, es beneficiosa para otorgar efectos positivos en la salud, debido a que la bacteria probiótica sobrevive en los productos para ser consumida en concentraciones al menos de 10^6 UFC/mL, además como lo plantea Pazos, M.¹¹⁰ el número de viables permanece alto al cabo de 6 meses de almacenamiento del producto a -23 °C con una concentración de 10×10^9 UFC/mL.

¹⁰⁷ Resolución 02310 del 24 de Febrero de 1986. (Visitada viernes 23 de febrero de 2007); disponible en Internet: www.invima.org

¹⁰⁸ MONTES, A. *et al.* Op. cit., p. 22.

¹⁰⁹ MALDONADO L. *et al.* Viability of *Bifidobacterium infantis* and *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* in Starter Milk. In: Pakistan Journal of Nutrition 2. 2003. Vol 3. p. 208-209.

¹¹⁰ PAZOS, M. Álvaro Jairo. Op. Cit., p. 22.

8. CONCLUSIONES

- El sustrato suero-miel de panela fue el que mayor producción de biomasa presento con $2,91 \times 10^9$ Bact/mL y aceptación sensorial con 0,57, lo cual puede atribuirse a que el *Lactobacillus casei subsp. rhamnosus* tiene una afinidad a degradar la lactosa y asimilar las proteínas del suero como las albúminas y globulinas.
- Al comparar los resultados obtenidos por Montes, A *et al.* 2003, utilizando como sustrato leche en polvo-melaza, con los de esta investigación se observa que al cambiar la fuente de carbono por miel de panela se presenta un aumento en la producción de biomasa y una disminución en el tiempo de duplicación, debido a que la melaza es el coproducto de la producción de azúcar y por lo tanto ha perdido varios nutrientes termolabiles.
- De acuerdo a los resultados de los análisis sensoriales de cada ensayo, se observa que tienen el mismo comportamiento, teniendo una aceptación baja lo cual se atribuye principalmente a que al producto no se le adicionaron saborizantes ni colorantes que mejoren la presentación del mismo.
- Teniendo en cuenta que la mayor formación de biomasa y producción de proteínas del *Lactobacillus casei subsp. rhamnosus* fue a las 8 horas, se determino a esta hora como el tiempo de cosecha.
- En cuanto al análisis económico el sustrato de leche en polvo presenta el costo mas bajo con \$1399,18 por litro de sustrato, esto debido a que se utilizo solamente una fuente de nitrógeno, la cual tiene un costo relativamente bajo respecto a las otras fuentes utilizadas.
- En el análisis sensorial el factor que mas influyo fue la proteína utilizada, ya que a esta se debe principalmente la textura y sabor del producto final, por tal razón a mayor cantidad de proteína mayor es la aceptación.
- La cantidad optima de inculo para iniciar la fermentación con *Lactobacillus casei subsp. rhamnosus* fue de $4,65 \times 10^7$, es menor a la propuesta por Montes, A *et al.* 2003, lo cual puede deberse al cambio de la fuente de carbono del sustrato.
- El rendimiento en acido láctico obtenido de la fermentación con el medio control al cabo de 8 horas fue de 23,86 % y para el medio miel de panela-suero fue de 38 % lo que indica que en el medio optimizado se presento mayor conversión de sustrato a acido láctico.

- El medio miel de panela-suero además de ser un buen sustrato para la producción de biomasa, se lo puede utilizar directamente como un producto para el consumo humano, ya que cumple con los requisitos exigidos por el INVIMA para una leche fermentada.
- El *Lactobacillus casei subsp. rhamnosus* sobrevive en refrigeración debido a que en el análisis de anaquel el número de bacterias se incrementa en el tiempo, además Maldonado L. *et al.* 2003, plantea la supervivencia de la bacteria probiótica en refrigeración sin perder sus características benéficas sobre la salud.
- La cantidad de bacterias lácticas del producto evaluado durante los 15 días, supera la cantidad mínima necesaria para presentar un efecto antagónico sobre el *Helicobacter pylori*, la cual es de acuerdo Montes, A *et al.* 2003 de $9,8 \times 10^6$ Bact/mL,
- El análisis organoléptico en la vida de anaquel del producto mostró tuvo una evolución negativa a través del tiempo, debido principalmente a la producción de ácido láctico.
- Durante los 15 días de evaluación de la vida de anaquel se obtuvieron resultados óptimos para cumplir con los requisitos del INVIMA, con la cantidad mínima de bacterias para ser considerado como probiótico y con el análisis organoléptico, por lo tanto se determina a este tiempo como el tiempo de vida útil del producto.

9. RECOMENDACIONES

- Se recomienda complementar la investigación con un estudio de mercado detallado, un estudio financiero, económico, ambiental, social, con el fin de determinar la viabilidad y factibilidad del proyecto de producción de biomasa de *Lactobacillus casei subsp. rhamnosus* a nivel industrial.
- Para obtener un producto con mayor aceptación sensorial se recomienda realizar un estudio para la utilización de colorantes y saborizantes en la producción de biomasa de *Lactobacillus casei subsp. rhamnosus*, utilizando el sustrato óptimo.
- El sustrato suero-miel de panela fermentado con *Lactobacillus casei subsp. rhamnosus*, podría ser considerado como un producto probiótico por su alto contenido de bacterias benéficas las cuales tienen un efecto específico sobre el *Helicobacter pylori*.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- ALAIIS, Ch. Ciencia de la Leche; Principios de Técnica Lechera. Editorial REVERTE. Barcelona, España. p. 873
- AMIOT, Jean. Ciencia y tecnología de la leche: principios y aplicaciones. Ed. ACRIBIA, Zaragoza. España. 1991. p. 85.
- ANZALDUA-MORALES. La evaluación sensorial de los alimentos en la teoría y la práctica. Editorial ACRIBIA, S.A. , España. 1994.
- ARTAVIA, Walter. Elaboración de Queso Ricotta a partir de suero lácteo. Guacimo, Costa Rica. Diciembre de 1999. Trabajo de Grado (Ingeniería Agronómica con el grado de Licenciatura)
- BARNEY, Carmen. E. Bacterias lácticas bacteriocinogenicas efecto sobre bacterias patógenas asociadas a alimentos. Santiago de Cali, 1996. Tesis (Magíster en Microbiología). Universidad del Valle. Departamento de Microbiología.
- BAYONA, Martin, *et al.* Microorganismos de interés industrial Manual de laboratorio. Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias, Departamento de Microbiología. Santa fe de Bogota, 2001.
- CDRF, DAIRY & FOOD CULTURE TECHNOLOGIES. Probiotics Basics, 2004, (visitada 12 de noviembre de 2005). Available from Internet: www.usprobiotics.org
- CORREA, Pelayo. Is gastric carcinoma an infections disease. In: Journal Medical. Vol. 325 (1991); p. 1170-1171
- CRUEGER, W., Crueger, A. Biotecnología: Manual de Microbiologic Industrial. Ed. Acribia, 3ed. Zaragoza. España. 1993.
- DAESCHEL, M. A. Antimicrobial substances from lactic acid bacteria for use as food preservatives. In: Food Technology. 1989. p. 164-167
- DAIRY MANAGEMENT INC. Journal of Dairy & foods. Issue 2, Volume 2, Fall. 2004.
- De Man J.C., Rogosa, M., Sharpe, M.E. A medium for the cultivation of Lactobacilli. In: Journal Appl. Bacteriology. 1960. Vol. 23, p. 130-135. 0
- DORAN, Pauline. Principios de ingeniería de los bioprocesos. Editorial ACRIBIA, S.A., España. 1995

ERTOLA, Rodolfo, *et al.* Monografía Microbiología Industrial. s.l.

FEDEPANELA. Proceso de elaboración de la panela. (Visitada viernes 23 de febrero de 2007); disponible en Internet: www.fedepanela.org.co.

FUJISAWA, T., Y. BENNO, T. YAESHIMA, and T. Mitsuoka.. Taxonomic study of the *Lactobacillus acidophilus* group, with recognition of *Lactobacillus gallinarum* sp. nov. and *Lactobacillus johnsonii* sp. nov., and synonymy of *Lactobacillus acidophilus* group A3 (Johnson et al. 1980) with the type strain of *Lactobacillus amylovorus* (Nakamura 1981). In: Int. J. Syst. Bacteriol. 1992, vol 42, p. 487–491.

FULLER, R. Probiotics in human medicine. 1991. In: Gut 32:439–442.

----- Probiotics in man and animals. In: J. Appl. Bacteriol. 1989. 66:365–378.

GAON, D. *et al.* Lactose digestion by milk fermented with *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* of human origin. In: Medicine. Vol. 55 (1995); p. 237-242

GIBSON, GR., *et al.* Dietary modulation of the human colonic microbiota. Introducing the concept of prebiotics. The Journal of Nutrition. 1995, p 125:1401–12.

GUERIN-DANAN, C. *et al.* Leche fermentada con cultivos de yogurt y *Lactobacillus casei* comparada con yogurt y leche gelatinizada: su influencia sobre la flora intestinal en niños sanos. En: Journal Clinico Americano de Nutricion. Vol. 67 (1998); p. 111 – 117

GUERRERO F, Milena; GUZMAN, Sofía; YANDAR, Nubia. Capacidad inhibitoria de un sustrato fermentado con *Lactobacillus acidophilus* aislado del tracto gastrointestinal humano sobre *Vibrio Cholerae* 01 Ogawa in Vitro. San Juan de Pasto, 2002. Trabajo de grado (Biólogo con énfasis en Microbiología). Universidad de Nariño. Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas. Departamento de Biología.

ISOLAURI, E., *et al.* Oral bacteriotherapy for viral gastroenteritis. In: Digestive diseases and sciences. 1994, vol. 39, No. 12, pp. 2595-2600

JUDKINS, H; La leche; Su producción y procesos industriales. CECSA. Mexico D.F. 1984. p. 495

KAILA, M., E. ISOLAURI, E. SOPPI, E. VIRTANEN, S. LAINE, and H. Arvilommi. Enhancement of the circulating antibody secreting cell response in human diarrhea by a human *Lactobacillus* strain. . In: Pediatr Res. 1992, vol 32, p. 141–144.

KANDLER, U. *et al.* Gram positive rods. In: Bergey S. Manual of Systematic Bacteriology. Vol. 2 (1990); Batimore, Estados Unidos: Williams and Wilkins. p. 1209-1234.

KATO, Y. *et al.* Activación de macrofagos por *Lactobacillus casei* en ratas. En: Microbiología inmunológica. Vol. 27 (1983); p. 611-613.

KLAENHAMMER, T. R. Bacteriocins of lactic acid bacteria. In: Biochimic. Vol. 70 (1988); p. 337-349.

KWON, S. *et al.* Production of lactic acid by *Lactobacillus rhamnosus* with vitamin-supplemented soybean hydrolysate. In: Enzyme and Microbial Technology. 2000. Vol. 26. p. 209–215

LEAL-SÁNCHEZ, M. *et al.* Optimization of Bacteriocin Production by Batch Fermentation of *Lactobacillus plantarum* LPCO10. In: Applied And Environmental Microbiology, Sept. 2002, Vol. 68, No. 9 p. 4465–4471.

LEOVIZ DISTRIBUCIONES, SL. Beneficios de los Probióticos, (visitada viernes 27 de enero de 2006); disponible en Internet: www.probioticos.net.

LEMUS, C. B. *et al.* Inhibition of food-borne bacterial pathogens by bacteriocins from lactic acid bacteria isolated from meat. In: Applied and Environmental Microbiology. Vol. 57, No 6 (1991); p. 1683 – 1688

LINDSEY, J. y SMITH, P. Cuadernillos agropecuarios para extensionistas. Chile: Fao, 1990

LIONG, M.T. *et al.* Optimization of Growth of *Lactobacillus casei* ASCC 292 and Production of Organic Acids in the Presence of Fructooligosaccharide and Maltodextrin. In: Journal of food science. 2005, Vol. 70, Nr. 2.

MADIGAN, M. *et al.* Biología de los microorganismos. Madrid, España, Pretince Hall Iberia. Bed., 1999. p. 718 – 722

MADRID, A. Curso de industrias Lácteas. Mundi-Prensa Libros S.A. Madrid, España. 1996. p. 604

MALDONADO, L. *et al.* Viability of *Bifidobacterium infantis* and *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* in Starter Milk. In: Pakistan Journal of Nutrition 2. 2003. Vol 3. p. 208-209.

MATEUS, G. Pedro. F. Producción intestinal de productos lácteos. *s.l.*

MONTES, Andrea. SANTRACRUZ, Ayda. SAÑUDO Jessie. Efecto *in vitro* de *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* sobre el crecimiento de un aislado de *Helicobacter pylori*. San Juan de Pasto, 2003. Trabajo de grado (Biólogo con énfasis en Microbiología).

Universidad de Nariño. Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas. Departamento de Biología.

PARADA, J. L. Bacterias lácticas usos en fermentaciones y como probióticos. Congreso Internacional de Microbiología Industrial. Universidad Javeriana. Santa Fé de Bogota 1999.

PAZOS, M. Álvaro Jairo. Protección intestinal contra patógenos específicos a través de sustratos fermentados con *Lactobacillus casei subsp. rhamnosus*. Santiago de Cali 2000.

PERDIGÓN, G. *et al.* El efecto de *Lactobacillus* administrados oralmente sobre la activación de macrófagos en ratas. In: Infetion Immunology. Vol. 53 (1986); p. 404 - 410

----- *et al.* Immunomodulaing effects of lactic acid bacteria on mucosa and tumoral immunity. In: International Journal Immunother. Vol. 9 (1993); p. 29 – 52

PÉREZ, M, G. *et al.* Factores que regulan la glucólisis en *Lactobacillus casei*. En: Manual de ciencia y tecnología. (2001)

RAMÍREZ, C. Manual de metodologías para el seguimiento del proceso de fermentación láctica. Universidad del Valle. Departamento de ciencia y tecnología de alimentos. 2000

REID, G. The Scientific Basis for Probiotic Strains of *Lactobacillus*. In: Journal of applied and environmental microbiology, Sept. 1999, p. 3763–3766

REQUENA, T. y PELAEZ, C. Actividad antimicrobiana de bacterias lácticas producción de bacteriocinas. En: Revista Española de Ciencia y Tecnología de Alimentos. Vol. 35, No. 1 (1995); p. 535 - 549

RESOLUCIÓN 02310 del 24 de Febrero de 1986. (Visitada viernes 23 de febrero de 2007); disponible en Internet: www.invima.org

RESOLUCIÓN 4126 del 5 de Abril de 1991. (Visitada viernes 23 de febrero de 2007); disponible en Internet: www.invima.org

REVILLA, A. Tecnología de la leche; procesamiento Manufactura y Análisis. IICA. San José, Costa Rica, 1985. p. 399

ROJAS, Ana. Modulo de Evaluación Sensorial. Editorial UNISUR. Bogota.1986.

SAAVEDRA, José. Los probióticos y la salud infantil, (visitada, viernes 27 de enero de 2006). Disponible en el Internet: <http://www.probiotics-amsterdam.org/>

SALMINÉN, S. *et al.* Lactic Acid Bacteria in health and disease/ Salminen Von Wright. In: Lactic Acid Bacteria. (1993); p. 199-219

SAXELIN, M. *et al.* The use of a human *Lactobacillus casei* strain GG in the prevention and treatment of diarrhoea. In: Les Bacteries Lactiques. Recherche at Applications Industrielles en Agroalimentarie / Actes du colque LACTC. Vol. 91 (1992)

SCHLEIFER, K. H. *et al.* Phylogenetic relation chips of lactic Acid Bacteria. Research and industrial application in the Agrofood Industries. (1991); p. 23 - 32

SCHREZENMEIR, Jürgen, *et al.* Probiotics, prebiotics, and synbiotics - approaching a definition. In: The American Journal of Clinical Nutrition, 2001; 73 (suppl): 361S–4S.

SPREER, E. Lactologia Industrial. Editorial Acribia, Zaragoza, España. 1991.

STANIER, R. *et al.* The acid lactic bacteria. In: The microbial World. Prentice Hall. 1986. New Jersey. p. 496 – 500

THOREUX, K. *et al.* Modulación de la proliferación, Segundo nivel de mensaje y expresión morfológica de la línea epitelial del intestino de las ratas IEC-6 por la acción de la leche fermentada. En: Ciencia láctea. Vol. 79 (1996); p. 33-43

TOMMIE, G. Tecnología para la fabricación de alimentos balanceados. Colombia: AFIA, 1994, p. 78

TSENG, C.P., Montville. Metabolic regulation of end product distribution in lactobacilli: causes and consequences. In: Biotechnol. Program. 1993. Vol. 9. p. 113 – 121.

WILLETT, H.P. Microbiología: Metabolismo energético. 18ed. Buenos Aires, Argentina. 1989. p. 54-84

WILLIAMS, E.S. Roles of *Lactobacillus* in the intestinal tract. In: Journal of food Protection. Vol 42, N° 3 (1979); p. 259-262.

ANEXO A. Determinación de azúcares totales.

Método de Antrona

Fundamento: La reacción de Antrona constituye la base de un método conveniente para la determinación de hexosas, aldopentosas y ácidos hexouricos, bien sea que estén libres o formando parte de los polisacáridos. La solución azul-verdosa muestra una absorción máxima a 625 nm.

Reactivos.

- Antrona.
- Acido sulfúrico 10 y 96 %.
- Glucosa grado reactivo.

La vidriería para las dosificaciones, como para las diluciones deben estar previamente lavadas con acido sulfúrico al 10 %, se dejan en remojo con el mismo acido por 24 horas, luego se desocupan los tubos y se dejan invertidos para su secado por lo menos tres horas.

Curva estándar

Preparación del reactivo de Antrona: disolver 200 mg de Antrona en 100 mL de acido sulfúrico al 96 %. Conservar el erlenmeyer cubierto con papel aluminio. Antes de agregar la Antrona se coloca un magneto y se lleva a agitación por 5 minutos.

Solución madre: disolver 0,1 g de glucosa en un balón volumétrico de 200 mL, hasta completar su volumen con agua destilada y estéril (0,5 g/L). De esta solución se toma 10 mL y se completa hasta 100 mL en un balón volumétrico de 100 mL (50 mg/L).

Dilución patrón: establecer una curva estándar de 0 a 50 mg/L. Después de efectuar una dilución 1/10 de la solución madre (50 mg/L), depositar en una serie de tubos 0- 0,25-0,50-0,75-1,0-1,25-1,50-1,75-2-2,5 mL de la solución madre y completar a 2,5 ml con agua destilada.

Procedimiento.

Tanto la curva estándar como las muestras a dosificar sufren el mismo tratamiento, mas la dosificación de azúcares totales es realizada sobre 2,5 mL de muestra, haciendo diluciones y conservadas en baño de hielo. Para las muestras de azúcar se hacen diluciones decimales, en agua destilada, filtrada y estéril para correr la densidad óptica. El blanco se prepara con 2,5 mL de agua destilada más 5 mL de reactivo de Antrona.

Al agregar la Antrona no debe haber mucha variación de tiempo.

- Con un agitador mezclar hasta homogeneizar la solución.
- Llevar a ebullición durante 10 minutos.
- Enfriar dentro de un banco de hielo, esperar 5 minutos
- Agitar, aflojar las tapas de los tubos y esperar el tiempo necesario hasta que se eliminen las burbujas de aire.
- Leer la absorbancia a 625 nm contra el blanco.

ANEXO B. Determinación de proteínas.

Método de Lowry modificado.

Fundamento: las proteínas reaccionan con el reactivo de Folin-Ciocalteu para dar un complejo color azul, (debido a la reacción del cobre alcalino con la proteína). La intensidad del color depende del número de aminoácidos presentes y enlaces peptídicos y cambiará según la clase de proteína; la solución azul muestra una absorbancia máxima a 750nm. Rango de linealidad entre 0-300 mg/L.

Reactivos

Solución A: diluir 0,5 g de tartrato de sodio y potasio, 25 g de carbonato de sodio, 125 mL de hidróxido de sodio 1N en 125 mL de agua destilada.

Solución B: diluir 2 g de tartrato de sodio y potasio, 1 g de sulfato de cobre en 10 mL de hidróxido de sodio 1 N y 90 mL de agua destilada.

Solución C: preparar una solución de reactivo de Folin Ciocalteu y agua destilada en proporción 1:14 (preparar al momento de usar).

Solución estándar de Seroalbumina bovina: disolver 15 mg en 50 mL de agua destilada, con una concentración final de 300 mg/L.

Curva estándar.

Establecer una curva estándar de 0 a 300 mg/L. Dentro de una serie de tubos de ensayo de 0-1-2-3-4-5-6-7-7,5-8-9-10 mL de solución de seroalbumina bovina y aforar a 10 mL con agua destilada.

Procedimiento.

- Adicionar 0,5 mL de NaOH 2N a todos los tubos.
- Colocar en baño maría a temperatura de ebullición durante 10 minutos.
- Enfriamiento en banco de hielo por 5 minutos.
- Adicionar 0,5 mL de H₂SO₄ 2,6N.
- Adicionar 0,9 mL de solución A.
- Llevar por 10 minutos a baño maria a 50 °C.
- Enfriar por 3 minutos.
- Adicionar 0,1 mL de solución B.
- Colocar por 10 minutos en la oscuridad.
- Preparar la solución C y adicionar 3 mL.
- Llevar 10 minutos a baño maria a 50 °C.
- Enfriar por 3 minutos.
- Leer absorbancia a 750 nm, comparando con el blanco.

El blanco corresponde a 1 mL de agua destilada con todas las soluciones del proceso anterior.

ANEXO C. Determinación de ácido láctico por titulación.

Preparar una solución de 100 cm³ de NaOH 0.1N de la siguiente manera: se diluye 0.4g de NaOH sólido hasta 100 cm³ con agua destilada y desionizada.

Realizar la prueba de acidez titulable de la siguiente manera: se coloca 30 ml de la solución de NaOH 0,1 N (preparada la solución como se indica en el punto 1) en la bureta y se toma una muestra de 9 mL y se le agrega 3 gotas de fenolftaleína y se procede a titular con la solución de NaOH 0,1 N, adicionando gota a gota y agitando continuamente el beaker, la prueba termina cuando hay cambio de color, es decir cuando cambia a color rosado.

La cantidad en porcentaje de ácido láctico producida puede ser calculada con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Ácido láctico: } \frac{\text{mL gastados} * \text{molaridad de NaOH} * \text{masa molar Ácido láctico}}{\text{Cantidad de muestra mL} * 10}$$

$$\text{Ácido láctico (g/L)} = ((V_1 * N) / V_2) * K * 1000.$$

V_1 = mL gastados

V_2 = Cantidad de muestra mL

K = peso equivalente del ácido láctico (0,045g/meq)

N = normalidad del NaOH (0,1 meq/mL)

ANEXO D. Determinación de biomasa por recuento en placa.

Suministra información del número de UFC/mL de fermento láctico, se diluyo 1 mL de muestra en 9 mL de agua peptona al 0,1 % y se continuó con una serie de diluciones decimales, empezando de la dilución 10^{-1} a 10^{-4} en las horas 2 y 6; de la dilución 10^{-1} , 10^{-12} en las horas 8 y 12 hasta las 24 horas.

Se siembran las tres ultimas diluciones de cada tiempo en cajas de petri con agar MRS (OXOID) comercial, se sembraron por duplicado y en superficie 0,1 mL de las diferentes diluciones, para lograr una mejor homogeneización se hizo un extendido con perlas de vidrio en forma radial y circular paralelamente, teniendo en cuenta retirar todas las perlas cada que siembre el inculo de cada dilución, se llevo a incubación por 24 horas de 35 a 37°C.

Se tomaron en cuenta las cajas petri con diluciones que presentaron entre 30 y 300 UFC, se hizo un promedio, se multiplico por la dilución y por 10 para reportar como mL de fermento láctico.

ANEXO E. Fichas de datos de seguridad.

ANEXO F. Balance de materia para el sustrato suero.



A: Suero (g)

B: Harina de soya (g)

Balance global

$$A + B = 72 \text{ g}$$

Balance de proteína

$$0,12 A + 0,433 B = 25,92$$

Resolviendo para B, se tiene:

$$B = 55,21 \text{ g}$$

Reemplazando en el balance global:

$$A = 16,79 \text{ g}$$

De la misma forma se realizaron los balances para los demás sustratos.

ANEXO G. Análisis sensorial.

UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE INGENIERIA AGROINDUSTRIAL
INGENIERIA AGROINDUSTRIAL

Nombre: _____ Fecha: _____ Prueba: 1

Producto: **PROBIÓTICO**

Pruebe las muestras que se le presentan e indique, según la escala, su opinión sobre ellas.

ESCALA



Marque con un X el renglón que corresponda a la clasificación para cada muestra.

MUESTRA

YC	_____	_____	_____	_____	_____
MX	_____	_____	_____	_____	_____
DK	_____	_____	_____	_____	_____
LS	_____	_____	_____	_____	_____
FB	_____	_____	_____	_____	_____
JG	_____	_____	_____	_____	_____
QV	_____	_____	_____	_____	_____
HR	_____	_____	_____	_____	_____
NW	_____	_____	_____	_____	_____
TP	_____	_____	_____	_____	_____

ANEXO H. Análisis económico.

Materia prima o insumo	\$
Suero (25 Kg)	80000
Harina de soya (250g)	3250
Leche soya (250g)	4650
L Polvo (450 g)	4650
Leche (750 ml)	1100
Carbonato (g)	1
Melaza (5L)	6000
Fosfato (g)	0,5
Citrato (g)	0,5
Agua (1m ³)	832

Con los datos mostrados en la anterior tabla se calculo el costo de cada sustrato teniendo en cuenta los gramos utilizados para cada ensayo.

ANEXO I. Descripción del diseño experimental final para los cuatro medios evaluados.

Design Summary

Design class: Response Surface
 Design name: 3-level factorial design: 3²

Base Design

Number of experimental factors: 2 Number of blocks: 1
 Number of responses: 3
 Number of runs: 10 Error degrees of freedom: 4
 Randomized: Yes

Factors	Units	Continuous
Fuente de Nitrogeno	g	Yes
Carbonato de Calcio	g	Yes

Responses	Units
Biomasa	Bact/mL
Sensorial	
Económico	\$

ANEXO J. Resultados de producción de biomasa de *Lactobacillus casei subsp. rhamnosus* en el medio control.

Producción de biomasa (UFC/mL) en los 8 ensayos, a 8 horas.

Ensayo	Inicial	Final	Producción
1	9,80E+08	2,93E+13	2,93E+13
2	7,40E+08	2,9E+12	2,90E+12
3	5,90E+09	2,1E+13	2,10E+13
4	1,41E+10	1,96E+11	1,82E+11
5	6,80E+10	2,99E+13	2,99E+13
6	2,70E+10	2,99E+13	2,99E+13
7	1,22E+10	2,99E+13	2,99E+13
8	8,70E+10	2,13E+13	2,13E+13

Producción de biomasa (Bact/mL) en los 8 ensayos, a 8 horas.

Ensayo	Inicial	Final	Producción
1	4,65E+07	2,23E+09	2,18E+09
2	4,65E+07	1,63E+09	1,58E+09
3	4,65E+07	7,00E+08	6,54E+08
4	4,65E+07	2,39E+09	2,34E+09
5	4,65E+07	1,14E+09	1,09E+09
6	4,65E+07	1,05E+09	1,00E+09
7	4,65E+07	1,40E+09	1,35E+09
8	4,65E+07	8,70E+08	8,24E+08

ANEXO K. Muestra de Cálculos de para la estandarización del inocular.

Estandarización de Inocular (D.O.)					
Hora	Inocular 1	Inocular 2	Inocular 3	Inocular 4	Inocular 5
0	0,141	0,133	0,118	0,115	0,110
1	0,159	0,145	0,130	0,133	0,135
3	0,167	0,157	0,167	0,148	0,156
5	0,175	0,181	0,201	0,164	0,161
7	0,193	0,197	0,307	0,182	0,175
9	0,218	0,220	0,365	0,210	0,219
11	0,278	0,305	0,389	0,318	0,331
Estandarización de Inocular (Logaritmo Natural D.O.)					
Hora	Inocular 1	Inocular 2	Inocular 3	Inocular 4	Inocular 5
0	-1,959	-2,015	-2,137	-2,163	-2,207
1	-1,839	-1,931	-2,040	-2,017	-2,002
3	-1,790	-1,852	-1,790	-1,911	-1,858
5	-1,743	-1,709	-1,604	-1,808	-1,826
7	-1,645	-1,625	-1,181	-1,704	-1,743
9	-1,523	-1,514	-1,008	-1,561	-1,519
11	-1,280	-1,187	-0,944	-1,146	-1,106

ANEXO L. Análisis de varianza (ANOVA)

Análisis de varianza para la biomasa (UFC/mL), medio control preliminar.

Fuente	Suma cuadrados	Grados Libertad	Cuadrados medios	Valor F	Valor P
A:Miel de Panela	5,5243	1	5,5243	0,68	0,5599
B:Leche en Polvo	0,911545	1	0,911545	0,11	0,7935
C:Carbonato de Calci	0,930798	1	0,930798	0,12	0,7915
AB	0,903346	1	0,903346	0,11	0,7944
AC	0,884381	1	0,884381	0,11	0,7964
BC	5,59189	1	5,59189	0,69	0,5580
Total error	8,06586	1	8,06586		
Total (corr.)	22,8121	7			

R-cuadrado = 64,6422 %

R-cuadrado (ajustado para los grados de libertad) = 0,0 %

Error estándar = 2,84005

Error cuadrados medios = 1,00411

Durbin-Watson st = 2,5

Análisis de varianza para la biomasa (Bact/mL), medio control preliminar.

Fuente	Suma cuadrados	Grados Libertad	Cuadrados medios	Valor F	Valor P
A:Miel de Panela	1,25501E17	1	1,25501E17	20,37	0,1388
B:Leche en Polvo	4,27813E17	1	4,27813E17	69,44	0,0760
C:Carbonato de Calci	2,21113E17	1	2,21113E17	35,89	0,1053
AB	2,8125E15	1	2,8125E15	0,46	0,6217
AC	1,25E13	1	1,25E13	0,00	0,9713
BC	1,88374E18	1	1,88374E18	305,78	0,0364
Total error	6,1605E15	1	6,1605E15		
Total (corr.)	2,66715E18	7			

R-cuadrado = 99,769 %

R-cuadrado (ajustado para los grados de libertad) = 98,3832 %

Error estándar = 7,84889E7

Error cuadrados medios = 2,775E7

Durbin-Watson st = 1,5

Análisis de varianza para la biomasa (Bact/mL), diseño final medio control.

Fuente	Suma cuadrados	Grados Libertad	Cuadrados medios	Valor F	Valor P
A:Leche	9,12667E16	1	9,12667E16	1825,33	0,0149
B:Carbonato	2,66667E16	1	2,66667E16	533,33	0,0275
AA	1,28762E16	1	1,28762E16	257,52	0,0396
AB	1,225E15	1	1,225E15	24,50	0,1269
BB	4,57619E15	1	4,57619E15	91,52	0,0663
Lack-of-fit	4,4881E14	3	1,49603E14	2,99	0,3906
Pure error	5,E13	1	5,E13		
Total (corr.)	1,4024E17	9			

R-cuadrado = 99,6443 %

R-cuadrado (ajustado para los grados de libertad) = 99,1997 %

Error estándar = 7,07107E6

Error cuadrados medios = 6,09524E6

Durbin-Watson st = 2,1832

Análisis de varianza para la biomasa (Bact/mL), medio 1.

Fuente	Suma cuadrados	Grados Libertad	Cuadrados medios	Valor F	Valor P
A:Leche	2,5215E15	1	2,5215E15	5043,00	0,0090
B:Carbonato	4,16667E14	1	4,16667E14	833,33	0,0220
AA	4,0744E14	1	4,0744E14	814,88	0,0223
AB	2,25E12	1	2,25E12	4,50	0,2804
BB	7,61905E13	1	7,61905E13	152,38	0,0515
Lack-of-fit	1,07726E14	3	3,59087E13	71,82	0,0853
Pure error	5,E11	1	5,E11		
Total (corr.)	3,6065E15	9			

R-cuadrado = 96,9991 %

R-cuadrado (ajustado para los grados de libertad) = 93,2481 %

Error estándar = 707107,0

Error cuadrados medios = 2,72381E6

Durbin-Watson st = 1,41739

Análisis de varianza para la biomasa (Bact/mL), medio 2.

Fuente	Suma cuadrados	Grados Libertad	Cuadrados medios	Valor F	Valor P
A:Leche de soya	9,8415E15	1	9,8415E15	4920,75	0,0091
B:Carbonato	2,60417E15	1	2,60417E15	1302,08	0,0176
AA	2,50811E15	1	2,50811E15	1254,05	0,0180
AB	7,84E14	1	7,84E14	392,00	0,0321
BB	3,24107E14	1	3,24107E14	162,05	0,0499
Lack-of-fit	5,48476E14	3	1,82825E14	91,41	0,0757
Pure error	2,E12	1	2,E12		
Total (corr.)	1,70024E16	9			

R-cuadrado = 96,7624 %

R-cuadrado (ajustado para los grados de libertad) = 92,7153 %

Error estándar = 1,41421E6

Error cuadrados medios = 6,1619E6

Durbin-Watson st = 2,09902

Análisis de varianza para la biomasa (Bact/mL), medio 3.

Fuente	Suma cuadrados	Grados Libertad	Cuadrados medios	Valor F	Valor P
A:Suero	2,09067E17	1	2,09067E17	4181,33	0,0098
B:Carbonato	4,00167E16	1	4,00167E16	800,33	0,0225
AA	3,04762E16	1	3,04762E16	609,52	0,0258
AB	2,25E14	1	2,25E14	4,50	0,2804
BB	1,12012E16	1	1,12012E16	224,02	0,0425
Lack-of-fit	6,64881E15	3	2,21627E15	44,33	0,1084
Pure error	5,E13	1	5,E13		
Total (corr.)	3,0521E17	9			

R-cuadrado = 97,8052 %

R-cuadrado (ajustado para los grados de libertad) = 95,0617 %

Error estándar = 7,07107E6

Error cuadrados medios = 2,24762E7

Durbin-Watson st = 1,79333

ANEXO M. Análisis microbiológico vida de anaquel.

**UNIVERSIDAD DE NARIÑO
SECCION DE LABORATORIOS Y EQUIPOS
LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA Y PARASITOLOGIA**

Procedencia:	Pasto
Nombre propietario:	Viviana Ruales y Vladimir Vallejo.
Análisis solicitado:	Microbiológico
Tipo de producto:	Bebida fermentada.
Entrega de resultados:	Mayo 22 de 2007

RESULTADOS

Coliformes totales. Método tubos múltiples.

Muestra 1	3
Muestra 2	3

Coliformes fecales. Método tubos múltiples.

Muestra 1	Menor de 3
Muestra 2	Menor de 3

Recuento de Estafilococo coagulasa positiva.

Muestra 1	Ausente
Muestra 2	Ausente

UNIVERSIDAD DE NARIÑO
SECCION DE LABORATORIOS Y EQUIPOS
LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA Y PARASITOLOGIA

Procedencia:	Pasto
Nombre propietario:	Viviana Ruales y Vladimir Vallejo.
Análisis solicitado:	Microbiológico
Tipo de producto:	Bebida fermentada.
Entrega de resultados:	Mayo 22 de 2007

RESULTADOS

Recuento de Mohos y Levaduras.

Muestra 1	180 ufc
Muestra 2	200 ufc

Recuento de Salmonella sp. En 25 gramos.

Muestra 1	Ausente
Muestra 2	Ausente

Recuento de Listeria. En 25 gramos.

Muestra 1	Ausente
Muestra 2	Ausente

NOTA:

Los resultados son validos exclusivamente para las muestras procesadas.


Jairo España Castillo
Lab. Microbiología y Parasitología.