

	GESTIÓN SERVICIOS BIBLIOTECARIOS					  	
	CARTA DE AUTORIZACIÓN						
CÓDIGO	AP-BIB-FO-06	VERSIÓN	1	VIGENCIA	2014	PÁGINA	1 de 1

Neiva, 21 de noviembre del 2016

Señores

CENTRO DE INFORMACIÓN Y DOCUMENTACIÓN

UNIVERSIDAD SURCOLOMBIANA

Ciudad

El suscrito:

Bryan Leal Rojas, con C.C. No. 1075252743, autor de la tesis de grado titulado Evaluación de la actividad antimicrobiana de bacterias lácticas aisladas de productos lácteos comerciales presentado y aprobado en el año 2017 como requisito para optar al título de Ingeniero Agrícola; autorizo al CENTRO DE INFORMACIÓN Y DOCUMENTACIÓN de la Universidad Surcolombiana para que con fines académicos, muestre al país y el exterior la producción intelectual de la Universidad Surcolombiana, a través de la visibilidad de su contenido de la siguiente manera:

Los usuarios puedan consultar el contenido de este trabajo de grado en los sitios web que administra la Universidad, en bases de datos, repositorio digital, catálogos y en otros sitios web, redes y sistemas de información nacionales e internacionales “open access” y en las redes de información con las cuales tenga convenio la Institución.

- Permita la consulta, la reproducción y préstamo a los usuarios interesados en el contenido de este trabajo, para todos los usos que tengan finalidad académica, ya sea en formato Cd-Rom o digital desde internet, intranet, etc., y en general para cualquier formato conocido o por conocer, dentro de los términos establecidos en la Ley 23 de 1982, Ley 44 de 1993, Decisión Andina 351 de 1993, Decreto 460 de 1995 y demás normas generales sobre la materia.
- Continúo conservando los correspondientes derechos sin modificación o restricción alguna; puesto que de acuerdo con la legislación colombiana aplicable, el presente es un acuerdo jurídico que en ningún caso conlleva la enajenación del derecho de autor y sus conexos.

De conformidad con lo establecido en el artículo 30 de la Ley 23 de 1982 y el artículo 11 de la Decisión Andina 351 de 1993, “Los derechos morales sobre el trabajo son propiedad de los autores” , los cuales son irrenunciables, imprescriptibles, inembargables e inalienables.

EL AUTOR/ESTUDIANTE:

Firma:



	GESTIÓN SERVICIOS BIBLIOTECARIOS						  
	DESCRIPCIÓN DE LA TESIS Y/O TRABAJOS DE GRADO						
CÓDIGO	AP-BIB-FO-07	VERSIÓN	1	VIGENCIA	2014	PÁGINA	1 de 5

TÍTULO COMPLETO DEL TRABAJO:

Evaluación de la actividad antimicrobiana de bacterias lácticas aisladas de productos lácteos comerciales

AUTOR O AUTORES:

Primero y Segundo Apellido	Primero y Segundo Nombre
Leal Rojas	Bryan

DIRECTOR Y CODIRECTOR TESIS:

Primero y Segundo Apellido	Primero y Segundo Nombre
Amorocho Cruz	Claudia Milena

ASESORES:

Primero y Segundo Apellido	Primero y Segundo Nombre
Cerquera Peña	Néstor Enrique
Echeverry Hernández	Sonia

PARA OPTAR AL TÍTULO DE: Ingeniero Agrícola

FACULTAD: ingeniería

PROGRAMA O POSGRADO: Agrícola

CIUDAD: Neiva

AÑO DE PRESENTACIÓN: 2017

NÚMERO DE PÁGINAS: 97

	GESTIÓN SERVICIOS BIBLIOTECARIOS					  	
	DESCRIPCIÓN DE LA TESIS Y/O TRABAJOS DE GRADO						
CÓDIGO	AP-BIB-FO-07	VERSIÓN	1	VIGENCIA	2014	PÁGINA	2 de 5

TIPO DE ILUSTRACIONES (Marcar con una X):

Diagramas___ Fotografías_X_ Grabaciones en discos___ Ilustraciones en general___
 Grabados___ Láminas___ Litografías___ Mapas___ Música impresa___ Planos___
 Retratos___ Sin ilustraciones___ Tablas o Cuadros_X_

SOFTWARE requerido y/o especializado para la lectura del documento:

MATERIAL ANEXO:

PREMIO O DISTINCIÓN (En caso de ser LAUREADAS o Meritoria):

PALABRAS CLAVES EN ESPAÑOL E INGLÉS:

<u>Español</u>	<u>Inglés</u>	<u>Español</u>	<u>Inglés</u>
1. Actividad antimicrobiana	antimicrobial activity	6. _____	_____
2. Bacteria Acido láctica	lactic acid bacteria	7. _____	_____
3. Inhibición	Inhibition	8. _____	_____
4. Patógeno	Pathogen	9. _____	_____
5. _____	_____	10. _____	_____

RESUMEN DEL CONTENIDO: (Máximo 250 palabras)

Se realizó una búsqueda, aislamiento e identificación de cepas BAL provenientes de yogurt y queso de producción artesanal y en producción semi-industrial en la región del Huila en Colombia, una vez aisladas se evaluó la actividad antimicrobiana frente a cepas de patógenos *Escherichia coli* (aislada del restaurante de la Universidad Surcolombiana y de una venta ambulante de ají) y *Klebsiella* (aislada de jugo de frutas del restaurante de la Universidad Surcolombiana y de una venta ambulante de arepa) en tres diferentes métodos: presencia de células (método de discos), ausencia de células (método de pocillos) con pH ácido y neutro.

Todas las muestras fueron transportadas el mismo día de su producción en termos refrigerados hasta los laboratorios Microbiología de alimentos y Análisis sensorial adscritos al Centro Surcolombiano

	GESTIÓN SERVICIOS BIBLIOTECARIOS						  
	DESCRIPCIÓN DE LA TESIS Y/O TRABAJOS DE GRADO						
CÓDIGO	AP-BIB-FO-07	VERSIÓN	1	VIGENCIA	2014	PÁGINA	3 de 5

de Investigación en café - CESURCAFE de la Facultad de Ingeniería de la Universidad Surcolombiana, donde se realizaron ensayos para las muestras de queso: TPA (Análisis de Perfil de Textura) para evaluar textura y compresión simple, pH, color, acidez titulable, contenido de humedad y actividad de agua (Aw); y para el Yogurt pruebas de: sólidos solubles, viscosidad, color, pH y acidez titulable.

Para la identificación de las BAL, se llevaron a cabo pruebas de movilidad, catalasa, oxidasa, utilización del citrato, tinción GRAM.

Las bacterias aisladas correspondieron según las pruebas al género *Lactobacillus spp.* con características Gram +, no presentan movilidad, no usan el citrato como única fuente de energía, catalasa y oxidasa negativa, con algunas excepciones con catalasa positiva. Los productos elaborados artesanalmente presentaron mayor inhibición que los productos comerciales. De acuerdo al análisis estadístico, el test de Kruskal-Wallis aplicado entre los tres métodos de evaluación respecto a los diámetros de inhibición, mostró que existen diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre los métodos con un nivel de 95% de confianza.

De acuerdo al análisis estadístico, el test de Kruskal-Wallis aplicado entre BAL respecto a los diámetros de inhibición, no hay diferencias estadísticamente significativas entre BAL, esto es favorable para los productores artesanales, pues al igual que los productos reconocidos industrialmente en la región, presenta un valor agregado en su producto como alimento funcional, el cual desconocen y puede mejorar su nivel de competitividad en el mercado, y a la vez contribuir en el auge de productos que ejerzan una acción benéfica en la salud de los consumidores.

Con los resultados obtenidos, el trabajo concluye que los productos lácteos (queso y yogurt) elaborados y distribuidos de manera artesanal y semi-industrial en el departamento del Huila, presentan potencial probiótico, con actividad antimicrobiana frente a *Escherichia coli* y *Klebsiella*, además, la caracterización física y bioquímica de las BAL servirán de información previa cuando se pretenda diseñar cultivos iniciadores específicos de las BAL aisladas de Queso y Yogurt del departamento del Huila.

ABSTRACT: (Máximo 250 palabras)

A search, isolation and identification of LAB (Lactic Acid Bacteria) strains from yogurt and cheese produced by artisans and in semi-industrial production in the region of Huila – Colombia. Once these strains were isolated the antimicrobial activity against strains of *Escherichia coli* pathogens (isolated from the Universidad Surcolombiana restaurant and from a spicy street vending) and *Klebsiella* pathogens (isolated from fruit juice from the Universidad Surcolombiana restaurant and from a pones street vending) was evaluated by three different methods: Presence of cells (disc



method), absence of cells (well method) with acid and neutral pH.

All the samples were transported the same day of their production in refrigerated terms until the laboratories Microbiology of food and CESURCAFE of the Engineering Faculty of the Universidad Surcolombiana, where tests were performed for the samples of cheese: (TPA) Texture Profile Analysis to evaluate texture and simple compression, pH, color, titratable acidity, moisture content and water activity (Aw); and for the yogurt: soluble solids, viscosity, color, pH and titratable acidity tests were performed.

For the identification of LAB, tests of mobility, catalase, oxidase, citrate utilization, GRAM staining were carried out.

According to the tests, the isolated bacteria corresponded to the genus *Lactobacillus spp*, with Gram + characteristics, they do not present mobility, they do not use citrate as the only energy source, catalase and negative oxidase, with some exceptions with positive catalase. Crafted products showed more inhibition than commercial products. According to the statistical analysis, the *Kruskal-Wallis* test applied between the three methods of evaluation regarding inhibition diameters, showed that there are statistically significant differences ($p < 0.05$) between the methods with a 95% confidence level.

According to the statistical analysis, the *Kruskal-Wallis* test applied between LAB and inhibition diameters, there is no statistically significant difference between LAB, this is favorable for the artisan producers because crafted products present an added value in their product as a functional food like another products recognized industrially in the region. Artisan producers do not know about this characteristic so they ignore they can improve their competitiveness level in the market, and at the same time contribute in the rise of products that exercise a beneficial action in the health of consumers.

With the obtained results, the work concludes that the dairy products (cheese and yogurt) elaborated and distributed in an artisan and semi-industrial way in the department of Huila, present a probiotic potential, with antimicrobial activity against *Escherichia coli* and *Klebsiella*. Besides, the physical and biochemical characterization of the LAB will serve as an information bank when it is desired to use such strains as probiotics and when it is intended to design starter specific cultures of LAB isolated from cheese and yogurt in the department of Huila.

	GESTIÓN SERVICIOS BIBLIOTECARIOS				  		
	DESCRIPCIÓN DE LA TESIS Y/O TRABAJOS DE GRADO						
CÓDIGO	AP-BIB-FO-07	VERSIÓN	1	VIGENCIA	2014	PÁGINA	5 de 5

APROBACION DE LA TESIS

Nombre Presidente Jurado: *Claudia Milena Amorcho Cruz*

Firma: *[Handwritten signature]*

Nombre Jurado: *Sonia Echeverry Fernández*

Firma: *[Handwritten signature]*

Nombre Jurado: *NESTOR ENRIQUE CELOVELA PEÑA*

Firma: *[Handwritten signature]*

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE BACTERIAS
LÁCTICAS AISLADAS DE PRODUCTOS LÁCTEOS COMERCIALES**

BRYAN LEAL ROJAS

**UNIVERSIDAD SURCOLOMBAINA
FACULTAD DE INGENIERIA
INGENIERIA AGRICOLA
NEIVA
2017**

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE BACTERIAS
LÁCTICAS AISLADAS DE PRODUCTOS LÁCTEOS COMERCIALES**

BRYAN LEAL ROJAS

Trabajo de Grado presentado como requisito para optar al título de:
INGENIERO AGRÍCOLA

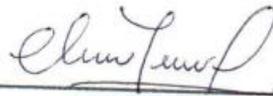
Director

Ph.D. CLAUDIA MILENA AMOROCHO CRUZ
Profesor de planta programa ingeniería agrícola.

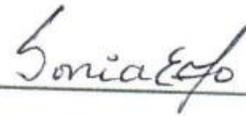
UNIVERSIDAD SURCOLOMBAINA
FACULTAD DE INGENIERIA
INGENIERIA AGRICOLA
NEIVA
2017

Nota de aceptación:

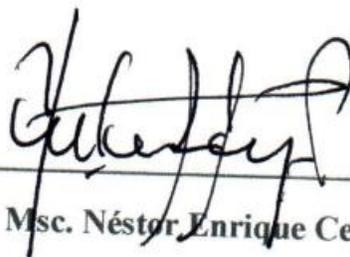
Esta tesis ha sido "APROBADA"



Ph. D. Claudia Milena Amorocho Cruz
Director



Msc. Sonia Echeverry Hernández
Jurado



Msc. Néstor Enrique Cerquera Peña
Jurado

Neiva, noviembre de 2016

A mi familia, mi tesoro más grande

AGRADECIMIENTOS

Doy gracias a Dios por permitirme tener tan buena experiencia dentro de mi Universidad Surcolombiana, pues gracias a ella me convierto en un profesional, lo que tanto me apasiona, gracias a cada maestro que hizo parte de este proceso integral de formación, que deja como producto terminado este grupo de graduados, y como recuerdo y prueba viviente en la historia; esta tesis, que perdurará dentro de los conocimientos y desarrollo de las demás generaciones que están por llegar.

Gracias a mi madre, María Elena Rojas y mi padre, Miguel Ángel Leal, pues son mi principal motivación, que con mucho esfuerzo, amor, dedicación y mucha paciencia me apoyaron durante toda mi carrera. No ha sido sencillo el camino hasta ahora, pero gracias a sus aportes y su inmensa bondad, lo complicado de lograr esta meta se ha notado menos. Les agradezco, y hago presente mi gran amor hacia ustedes, mi hermosa familia.

Sinceros agradecimientos a mi directora de tesis, Claudia Milena Amorocho Cruz por sus conocimientos, orientaciones, persistencia, paciencia y motivación pues gracias a ello, he iniciado mi proceso como investigador, inculcando en mí un sentido de seriedad, responsabilidad y rigor académico sin los cuales no podría tener una formación completa para lograrlo.

Gracias al profesor Nelson Gutiérrez Guzmán por su apoyo, enseñanza, gran calidad humana, su conocimiento, experiencia y persistencia durante el desarrollo de mi tesis, sinceros agradecimientos por estar siempre en búsqueda del enriquecimiento integral, gracias a ello he logrado el desarrollar esta investigación.

Gracias a todos mis compañeros de CESURCAFE, por estar muy pendientes en cada paso que daba durante mi estancia, por ayudar cuando lo necesitaba, por su afecto, respeto y tolerancia conmigo, muchas gracias.

Finalmente agradezco a quien lee este apartado y más de mi tesis, por permitir a mis experiencias, investigaciones y conocimiento, incurrir dentro de su repertorio de información mental.

GRACIAS.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	14
1. INTRODUCCIÓN	16
1.1 Problema de investigación	16
2. ANTECEDENTES Y JUSTIFICACION	17
3. OBJETIVOS	18
3.1. Objetivo General	18
3.2. Objetivos específicos.....	18
4. MARCO TEÓRICO.....	19
4.1. Generalidades de las bacterias.	19
4.1.1. Clasificación de las bacterias.....	19
4.2. Alimentos funcionales.....	19
4.3. Probióticos.	20
4.3.1. Antecedentes de los Probióticos.....	21
4.3.2. Efectos beneficiosos de los probióticos	21
4.3.2.1. Efectos en la microbiota intestinal.....	22
4.3.2.2. Efectos sobre el estreñimiento leve.....	22
4.3.2.3. Prevención y tratamiento de la diarrea	23
4.3.2.4. Intolerancia a la lactosa.....	23
4.3.2.5. Enfermedad Inflamatoria intestinal	23
4.3.2.6. Efectos moduladores sobre el sistema inmunitario.....	24
4.3.2.7. Cáncer.....	24
4.3.2.8. Infecciones urinarias	25
4.3.2.9. Reducción del colesterol	25
4.3.2.10. Infecciones respiratorias y otitis media	25
4.3.2.11. Caries.....	26
4.4. Fermentos lácticos	26
4.5. Bacterias Ácido Lácticas (BAL).....	26
4.5.1. Aislamiento de BAL.....	27
4.5.2. Pruebas bioquímicas	27
4.5.2.1. Catalasa	27
4.5.2.2. Oxidasa	27
4.5.2.3. Tinción de Gram	28

4.5.3. Prueba de Motilidad de Bacterias	28
4.5.4. Citrato de Simmons.....	28
4.6. Bacterias patógenas asociadas a contaminación de alimentos	29
4.6.1. Escherichia coli	29
4.8.2. Klebsiella.....	30
4.8.2.1. Klebsiella pneumoniae	30
4.8.2.2. Klebsiella ozaenae	31
4.8.2.3. Klebsiella rhinoscleromatis	31
4.9. Antibiograma.....	31
4.9.1. Sulfametoxazol	31
4.9.1.1. Mecanismo de acción.....	31
4.9.1.2. Farmacocinética	32
4.9.2. Cefalexina	33
4.9.2.1. Mecanismo de acción.....	33
4.9.2.2. Farmacocinética	33
4.10. Productos Lácteos comerciales	34
4.10.1. Yogurt	34
4.10.2. Quesillo Huilense.....	35
4.10.2.1. Características fisicoquímicas del quesillo	36
4.10.2.1.1. pH del Quesillo	36
4.10.2.1.2. Acidez titulable.....	36
4.10.2.1.3. Humedad.....	37
4.10.2.2. Técnicas instrumentales de análisis en quesillo.....	37
4.10.2.2.1. Propiedades mecánicas de la textura del quesillo	37
4.10.2.2.2. Colorimetría.	39
4.10.2.2.3. Actividad de agua (Aw)	40
5. MATERIALES Y METODOS.....	41
5.1 Descripción y selección de la muestra	41
5.2. Análisis fisicoquímico de quesillo y yogurt.....	42
5.2.1. Determinación de humedad en quesillo	42
5.2.2. pH en quesillo y yogurt.....	42
5.2.3. Acidez titulable en quesillo y yogurt	43
5.2.4. Textura en quesillo	44

5.2.5. Color en quesillo y yogurt	46
5.2.6. Actividad de agua en quesillo.....	47
5.2.7. Viscosidad en yogurt	47
5.2.8 Sólidos solubles (°Brix) en yogurt.....	48
5.3. Aislamiento BAL	48
5.3.1. Aislamiento de BAL provenientes de Qc y Qa.....	48
5.3.2. Aislamiento de BAL provenientes de Yc y Ya.	49
5.4 Recuento e identificación de BAL.....	49
5.4.1 Recuento de BAL.	49
5.4.2. Tinción GRAM.....	50
5.4.3. Prueba de catalasa y oxidasa.	51
5.4.4. Movilidad de BAL.....	51
5.4.5. Prueba de Citrato de Simmons	51
5.4.6. Prueba de coagulación de la leche por las BAL.....	52
5.5. Evaluación antimicrobiana.	52
5.5.1. Selección y activación de los patógenos.	52
5.5.2. Método de discos, presencia de células BAL.	53
5.5.3. Método del sobrenadante en pocillos, Ausencia de células BAL.....	53
5.6. Antibiograma.....	54
5.7. Análisis estadístico	54
6. RESULTADOS Y DISCUSION.....	55
6.1. Análisis fisicoquímico del quesillo	55
6.1.1. pH, % acidez titulable y contenido de humedad en % del Quesillo.	55
6.1.2. Actividad de agua en quesillos (Qa y Qc)	56
6.1.3. Análisis de textura y compresión simple.....	57
6.1.4. Colorimetría en muestras de quesillo (Qa y Qc)	58
6.2. Análisis fisicoquímico del yogurt.....	58
6.2.1. pH, % Acidez titulabe y solidos solubles del yogurt.	58
6.2.2. Viscosidad.....	59
6.2.3. Colorimetría en muestras de yogurt	60
6.3. Crecimiento e identificacion bioquímica y morfológica de BAL.....	60
6.3.1. Crecimiento de las BAL.....	60
6.3.2. Catalasa y Oxidasa de BAL.....	63

6.3.3. Prueba de movilidad y de utilización del citrato de BAL	64
6.3.4. Prueba de coagulación de la leche por las BAL	66
6.4. Actividad antimicrobiana	66
6.4.1. Evidencia de los resultados de la evaluación antimicrobiana.....	70
6.4. Antibiograma.....	72
7. CONCLUSIONES	75
8. RECOMENDACIONES	76
9. BIBLIOGRAFIA	77
ANEXOS	92

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Principales microorganismos probióticos y efectos beneficiosos para la salud	21
Tabla 2. Morfología colonial en medios de aislamiento primario de cultivo	29
Tabla 3. Composición química del quesoillo huilense	36
Tabla 4. Descripción de los parámetros mecánicos obtenidos a través del TPA.	38
Tabla 5. Parámetros para determinar el TPA y para la prueba de compresión simple.....	45
Tabla 6. Origen del aislamiento de las cepas de patógeno <i>Escherichia coli</i> y <i>Klebsiella</i>	53
Tabla 7. Caracterización fisicoquímica de Quesillo (Qa y Qc).....	55
Tabla 8. Valores de Aw del quesoillo	57
Tabla 9. Análisis de textura y compresión simple de Quesillo (Qa y Qc)	57
Tabla 10. Coordenadas CIElab del color de muestras de Quesillo (Qa, Qc)	58
Tabla 11. Caracterización de las muestras de Yogurt	58
Tabla 12. Análisis de viscosidad en muestras de Yogurt (Ya y Yc)	60
Tabla 13. Coordenadas CIElab del color de muestras de Yogurt (Ya, Yc).....	60
Tabla 14. Identificación morfológica de las BAL aisladas de Qa, Qc, Ya, Yc	61
Tabla 15. Catalasa y Oxidasa de BAL aisladas de Qa, Qc, Ya, Yc.....	63
Tabla 16. Movilidad y utilización del citrato de BAL aisladas de Qa, Qc, Ya, Yc.....	65
Tabla 17. Comparación de diámetros de inhibición frente a los tres métodos de evaluación...	71
Tabla 18. Comparación del efecto de las BAL en los diámetros de inhibición	71
Tabla 19. Modo de Acción de los Antibióticos evaluados	72
Tabla 20. Prueba de susceptibilidad a antibióticos	73
Tabla 21. Requisitos microbiológicos para queso fresco.	96

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Muestras de queso artesanal (Qa) y semi-industrial (Qc).....	41
Figura 2. Muestras de Yogurt artesanal (Ya) y semi-industrial (Yc)	41
Figura 3. Determinación del contenido de humedad en muestras de queso.	42
figura 4. Calibración del potenciómetro de acuerdo a norma (AOAC-981.12-1997).....	43
Figura 5. Determinación de pH en muestras de queso.....	43
Figura 6. Determinación de pH en muestras de Yogurt	43
Figura 7. Determinación Acidez Titulable en muestras de queso.....	44
Figura 8. Determinación de Acidez Titulable en muestras de Yogurt	44
Figura 9. Análisis de perfil de textura de muestras de queso.....	45
Figura 10. Ensayos de compresión simple en muestras de queso.....	45
Figura 11. Determinación de coordenadas de color CIELab en queso.....	46
Figura 12. Determinación de coordenadas de color CIELab en Yogurt	46
Figura 13. Determinación de Actividad de Agua en muestras de queso.....	47
Figura 14. Determinación de Viscosidad en muestras de Yogurt	47
Figura 15. Determinación de °Brix en muestras de Yogurt	48
Figura 16. Siembra de BAL de Quesillo (Qc, Qa) en agar s MRS.....	48
Figura 17. BAL aisladas de Quesillo (Qc, Qa).....	49
Figura 18. Aislamiento de BAL de muestras de Yogurt (Yc, Ya)	49
Figura 19. Recuento de BAL expresado en Log UFC/g de muestras de Yogurt (Yc, Ya)	50
Figura 20. Recuento de BAL expresado en Log UFC/g de muestras de Quesillo (Qc, Qa)	50
Figura 21. Tinción Gram de BAL	50
Figura 22. Prueba de catalasa a las BAL	51
Figura 23. Prueba de Movilidad de las BAL	51
Figura 24. Prueba de Citrato como única fuente de Carbono.....	52
Figura 25. Crecimiento de <i>Echerichia coli</i> en agar XLD y de <i>Klebsiella</i> en agar ENDO.....	53
Figura 26. Evaluación antimicrobiana, Método de Discos (presencia de células).....	53
Figura 27. Evaluación antimicrobiana, Método del sobrenadante en pocillos (Ausencia de células).....	54
Figura 28. Antibiograma	54
Figura 29. Valores promedios de acidez y pH en quesillos (QA, Qc).	55
Figura 30. Medición de A_w en quesillos.....	56
Figura 31. Crecimiento de BAL medido en Log UFC/g de Qa, Qc, Ya y Yc.....	61
Figura 32. Catalasa Negativa.....	64
Figura 33. Catalasa Positiva	64
Figura 34. Prueba de Movilidad de BAL	65
Figura 35. Prueba de Citrato como fuente de Carbón-Energía de BAL.....	65
Figura 36. Actividad antimicrobiana frente a <i>Escherichia coli</i> (E.R.S) por los 3 métodos.	67
Figura 37. Actividad antimicrobiana frente a <i>Escherichia coli</i> (E.V.A.A) por los 3 métodos	68
Figura 38. Actividad antimicrobiana frente a <i>Klebsiella</i> (K.R.S.S) por los 3 métodos	69

Figura 39. Actividad antimicrobiana frente a <i>Klebsiella</i> (K.V.A.A) por los 3 métodos.....	70
Figura 40. Halos de inhibición, Método de Discos (presencia de células).....	70
Figura 41. Halos de inhibición, Método del sobrenadante en pocillo a pH ácido y neutro, (ausencia de células).....	71
Figura 42. Prueba de susceptibilidad de BAL frente a Cefalexina y Sulfometaxazol.....	74
Figura 43. Curva típica obtenida del análisis de textura (Texturometro CT3).....	97

LISTA DE ANEXOS

Anexo A. Medios de Cultivo	93
Anexo B. Determinación de acidez (% de ácido láctico).....	96
Anexo C. Requisitos microbiológicos para queso fresco.....	96
Anexo D. Curva típica obtenida en el análisis de textura realizado con el texturometro CT3	97

RESUMEN

Se realizó una búsqueda, aislamiento e identificación de cepas de bacterias ácido lácticas (BAL) provenientes de yogurt y queso de producción artesanal y en producción semi-industrial en la región del Huila en Colombia, una vez aisladas se evaluó la actividad antimicrobiana frente a cepas de patógenos *Escherichia coli* sp. (aislada del restaurante de la Universidad Surcolombiana y de una venta ambulante de ají) y *Klebsiella* sp. (aislada de jugo de frutas del restaurante de la Universidad Surcolombiana y de una venta ambulante de arepa) en tres diferentes métodos: presencia de células (método de discos), ausencia de células (método de pocillos) con pH ácido y neutro.

Todas las muestras fueron transportadas el mismo día de su producción en termos refrigerados hasta los laboratorios de microbiología de alimentos y Análisis sensorial adscritos al Centro Surcolombiano de Investigación en café - CESURCAFE de la Facultad de Ingeniería de la Universidad Surcolombiana, donde se realizaron ensayos para las muestras de queso: TPA(Análisis de Perfil de Textura) para evaluar textura y compresión simple, pH, color, acidez titulable, contenido de humedad y actividad de agua (Aw); y para el Yogurt pruebas de: sólidos solubles, viscosidad, color, pH y acidez titulable.

Para la identificación de las BAL, se llevaron a cabo pruebas de movilidad, catalasa, oxidasa, utilización del citrato, tinción de GRAM.

Se hizo uso de algunas de las claves taxonómicas para la identificación de las bacterias aisladas, las cuales correspondieron según las pruebas al género *Lactobacillus* spp. con características Gram +, no presentan movilidad, no usan el citrato como única fuente de energía, catalasa y oxidasa negativa, con algunas excepciones para catalasa positiva. Los productos elaborados artesanalmente presentaron mayor inhibición que los productos comerciales. De acuerdo al análisis estadístico, el test de Kruskal-Wallis aplicado entre los tres métodos de evaluación respecto a los diámetros de inhibición, mostró que existen diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre los métodos con un nivel de 95% de confianza.

De acuerdo al análisis estadístico, el test de Kruskal-Wallis aplicado entre BAL respecto a los diámetros de inhibición, no hay diferencias estadísticamente significativas entre BAL, esto es favorable para los productores artesanales, pues al igual que los productos reconocidos industrialmente en la región, presenta un valor agregado en su producto como alimento funcional, el cual desconocen y puede mejorar su nivel de competitividad en el mercado, y a la vez contribuir en el auge de productos que ejercen una acción benéfica en la salud de los consumidores.

Con los resultados obtenidos, el trabajo concluye que los productos lácteos (queso y yogurt) elaborados y distribuidos de manera artesanal y semi-industrial en el departamento del Huila, presentan potencial probiótico, con actividad antimicrobiana frente a *Escherichia coli* y *Klebsiella*, además, la caracterización física y bioquímica de las BAL servirán de información previa cuando se pretenda diseñar cultivos iniciadores específicos de las BAL aisladas de Queso y Yogurt del departamento del Huila.

Palabras Clave: Inhibición, actividad antimicrobiana, patógenos, bacteria ácido láctica.

ABSTRACT

A search, isolation and identification of LAB (Lactic Acid Bacteria) strains from yogurt and cheese produced by artisans and in semi-industrial production in the region of Huila – Colombia. Once these strains were isolated the antimicrobial activity against strains of *Escherichia coli* pathogens (isolated from the Universidad Surcolombiana restaurant and from a spicy street vending) and *Klebsiella* pathogens (isolated from fruit juice from the Universidad Surcolombiana restaurant and from a ponos street vending) was evaluated by three different methods: Presence of cells (disc method), absence of cells (well method) with acid and neutral pH.

All the samples were transported the same day of their production in refrigerated terms until the laboratories Microbiology of food and CESURCAFE of the Engineering Faculty of the Universidad Surcolombiana, where tests were performed for the samples of cheese: (TPA) Texture Profile Analysis to evaluate texture and simple compression, pH, color, titratable acidity, moisture content and water activity (Aw); and for the yogurt: soluble solids, viscosity, color, pH and titratable acidity tests were performed.

For the identification of LAB, tests of mobility, catalase, oxidase, citrate utilization, GRAM staining were carried out.

According to the tests, the isolated bacteria corresponded to the genus *Lactobacillus spp*, with Gram + characteristics, they do not present mobility, they do not use citrate as the only energy source, catalase and negative oxidase, with some exceptions with positive catalase. Crafted products showed more inhibition than commercial products. According to the statistical analysis, the *Kruskal-Wallis* test applied between the three methods of evaluation regarding inhibition diameters, showed that there are statistically significant differences ($p < 0.05$) between the methods with a 95% confidence level. According to the statistical analysis, the *Kruskal-Wallis* test applied between LAB and inhibition diameters, there is no statistically significant difference between LAB, this is favorable for the artisan producers because crafted products present an added value in their product as a functional food like another products recognized industrially in the region. Artisan producers do not know about this characteristic so they ignore they can improve their competitiveness level in the market, and at the same time contribute in the rise of products that exercise a beneficial action in the health of consumers.

With the obtained results, the work concludes that the dairy products (cheese and yogurt) elaborated and distributed in an artisan and semi-industrial way in the department of Huila, present a probiotic potential, with antimicrobial activity against *Escherichia coli* and *Klebsiella*. Besides, the physical and biochemical characterization of the LAB will serve as information when it is intended to design starter specific cultures of LAB isolated from cheese and yogurt in the department of Huila.

Key words: Inhibition, antimicrobial activity, pathogens, lactic acid bacteria.

1. INTRODUCCIÓN

Las Bacterias Acido Lácticas (BAL), han estado presentes en la alimentación desde hace siglos; se encuentran en productos fermentados como la leche y derivados, productos cárnicos y vegetales; las cuales proporcionan sabor y textura e incrementan el valor nutricional de los alimentos (Mateos, 2002). Estos microorganismos cuando fermentan carbohidratos producen una mezcla de sustancias con acción antimicrobiana como: ácido láctico, ácido acético, ácido butírico, peróxido de hidrógeno, diacetilo y péptidos de bajo peso molecular llamados bacteriocinas, que generan cambios en la microbiota intestinal como la inhibición de patógenos; lo cual repercute positivamente en el estado de salud del consumidor (Casas *et al.*, 2000).

Entre los géneros de las BAL más utilizadas para el consumo humano se encuentran los siguientes: *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, entre otros (Farnworth, 2001). El género *Lactobacillus* comprende microorganismos reconocidos por su habilidad fermentativa e iniciadores en procesos industriales de productos fermentados; su presencia en el tubo digestivo es considerada benéfica, por tener un papel protector o terapéutico (Jiang, 1996 y Mustapha *et al.*, 1996). Se ha visto un aumento en la adición de BAL en productos comerciales reconocidos, con el fin de dar un valor agregado al producto y a la vez mejorar los procesos y aumentar la estabilidad y tiempo de conservación de los productos; sin embargo para los pequeños productores artesanales, esto es una tarea difícil, ya que no cuentan con asesoría, recursos físicos y económicos para realizar estas investigaciones lo cual afecta directamente la competitividad de sus productos al enfrentarse con marcas que han monopolizado los mercados y adicionalmente presentan un alimento más duradero y con menor riesgo de contaminación.

Por esta razón, se propuso realizar una búsqueda, aislamiento e identificación de cepas BAL presentes en productos lácteos comerciales ofertados de forma artesanal y semi-industrial, en el departamento del Huila, como yogurt y quesos, adicionalmente realizar una evaluación *in vitro* para identificar las cepas que puedan presentar actividad antimicrobiana frente a cepas de patógenos como *E. coli* y *Klebsiella*. Esto con el fin de encontrar BAL que puedan ser usadas en futuros productos asegurando una mejor calidad, mayor duración, mejor resistencia a contaminación microbiana y además presenten actividades benéficas para la salud de los consumidores, lo cual podría mejorar el nivel competitivo de los productores artesanales, que en muchos casos dependen de esta labor como única fuente de ingresos.

1.1 Problema de investigación

Diversos estudios afirman que las BAL presentes en productos lácteos tienen propiedades probióticas; sin embargo, estas características no se pueden generalizar al conjunto de las BAL. Es necesario, de acuerdo (FAO, 2007) realizar una serie de pruebas para verificar el potencial probiótico, entre ellas está la evaluación de la actividad antimicrobiana de las BAL frente a patógenos. En el departamento del Huila, es posible encontrar en el mercado productos lácteos procedentes de empresas grandes con trayectoria y aquellos elaborados artesanalmente. En este sentido, surge la siguiente pregunta de investigación, ¿Las BAL presentes en los productos lácteos comerciales como yogurt y quesos ofertados en el Huila poseen actividad antimicrobiana frente a *Escherichia coli* y *Klebsiella*?

2. ANTECEDENTES Y JUSTIFICACION

Es interesante considerar el papel que las BAL pueden desempeñar en el campo de las infecciones. El aumento en el uso de antibióticos, el incremento de las resistencias bacterianas, el aumento de los pacientes con problemas gastrointestinales y de las infecciones oportunistas en estos pacientes, y la aparición de nuevos patógenos, son factores que determinan la necesidad de desarrollar nuevas estrategias en el tratamiento y prevención de las infecciones. En el pasado se han llevado a cabo una serie de estudios siguiendo diferentes metodologías lo que no permite una comparación real de los resultados. Dentro de estos estudios merecen mencionarse el de Consignado, *et al* (1993), quienes encontraron actividad antibacteriana en *Lactobacillus casei* frente a *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis* y *Shigella dysenteriae*. Utilizaron el método de placa vertida a partir de un inóculo de 10^3 UFC/mL, sin embargo, no indican la concentración de las BAL ni el tipo de inhibición encontrado.

Por su parte Reque *et al.*, (2000) encontraron que *Lactobacillus fermentum* presentaba actividad antimicrobiana frente a *Escherichia coli* y *Salmonella typhi*, utilizando la técnica de difusión en pocillos que solo obtiene resultados cualitativos. Asahara *et al.*, (2001), hallaron actividad antimicrobiana en *Lactobacillus casei* frente a *Escherichia coli* e indicaron que *Lactobacillus fermentum* y *Lactobacillus plantarum* no presentaron actividad significativa. Chuayana *et al.*, (2003), utilizando una metodología no estandarizada, llegaron a la conclusión que *Lactobacillus casei* tendría una acción bacteriostática frente a *Escherichia coli* y *Salmonella typhi*. Sin embargo, no mencionan ningún valor referencial de esta afirmación.

Otros estudios que se han basado en la determinación de los diámetros de inhibición incluyen el de Oyetayo *et al.*, (2003), quienes verifican la actividad antimicrobiana de *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus acidophilus* frente a *Escherichia coli*. Nowroozi *et al.*, (2004) quienes estudiaron la actividad de *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus acidophilus* frente a *Salmonella typhi*, y finalmente Erdogrul *et al.*, (2006), quienes han comprobado la actividad antimicrobiana de *Lactobacillus bulgaricus* y *Lactobacillus casei* frente a *Escherichia coli*.

El presente estudio confirma la utilidad de las BAL en el control de patógenos que afectan con cotidianidad y sirve de base para continuar con otros estudios a fin de evaluar su acción frente a otros microorganismos de importancia médica, en particular bacterias Gram positivas y levaduras, esto dando como ventaja un incremento en la competitividad de los productos elaborados tradicionalmente ofreciendo al mercado un producto inocuo no contaminante para el consumidor. Con lo mencionado en párrafos anteriores se demuestra que hay suficiente soporte metodológico para caracterizar y evaluar la actividad antimicrobiana de BAL aisladas de los productos lácteos como Yogurt y Quesillo elaborados y empacados artesanal y semi-industrialmente.

La posibilidad de ofrecer a la industria de lácteos local y a los consumidores, información que les ayude a mejorar las condiciones de empaque, manejo y forma de conservación del queso huilense, de manera que se pueda contar con un producto con atributos de calidad, alimento funcional, que presente actividad antimicrobiana frente a cepas de patógenos que causan diferentes síntomas en el organismo del consumidor, justifica la realización de este trabajo de investigación; además porque se utilizan los conocimientos adquiridos durante el proceso de formación de los ingenieros agrícolas, fortaleciendo esta línea de trabajo.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo General

Evaluar la actividad antimicrobiana de BAL aisladas de Quesillos y Yogurt elaborados, empacados y distribuidos de manera artesanal y semi-industrial en el Departamento del Huila.

3.2. Objetivos específicos

- Caracterizar física y químicamente los productos lácteos semi-industriales y artesanales, Quesillo y Yogurt, del Departamento del Huila.
- Aislar BAL de los productos lácteos comerciales con características probióticas.
- Caracterizar química y microscópicamente las BAL aisladas de los productos lácteos, Quesillo y Yogurt del Departamento del Huila.
- Evaluar la capacidad antimicrobiana de las BAL aisladas frente a cepas de *Escherichia coli* y *Klebsiella*

4. MARCO TEÓRICO

4.1. Generalidades de las bacterias.

Son microorganismos generalmente unicelulares que pertenecen al grupo de los protistas inferiores. Las bacterias tienen una estructura menos compleja que la de las células de los organismos superiores: son células procariotas (su núcleo está formado por un único cromosoma y carecen de membrana nuclear (Madigan *et al.*, 2000).

Las bacterias juegan un papel fundamental en la industria y permiten desarrollar importantes progresos en fisiología celular y en genética. Las bacterias tienen diferentes tipos de morfología como: cocos (esféricos), bacilos (bastón), espirilos (espiras) (Madigan *et al.*, 2000). Estos distintos tipos de morfologías celulares deben de haberse originado por mecanismos evolutivos, a saber, por selección y estabilización adaptativa frente a las distintas presiones ambientales presentes en diferentes nichos ecológicos (Iñez, 1998).

4.1.1. Clasificación de las bacterias.

Según Kimball (1986), la clasificación de las bacterias se basa en gran medida en características tales como forma, capacidad de formar esporas, métodos de producción de energía (glucólisis en las anaerobias, respiración celular en las aerobias) y reacción a la tinción de Gram.

4.2. Alimentos funcionales.

Los alimentos funcionales son definidos por la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) citado por Amorocho (2011) como aquellos que contienen componentes biológicos adicionales, con potencial de reducir el riesgo de enfermedad y favorecer la salud (FAO, 2007). Poseen efectos beneficiosos sobre una o más funciones en el organismo y se incluye alimentos que contienen minerales, vitaminas, ácidos grasos, fibra, alimentos con antioxidantes y probióticos (Sarmiento, 2008). Frutas y vegetales representan la forma más simple de un alimento funcional (Mulabagal *et al.*, 2010; Aiba *et al.*, 1998; Rokka *et al.*, 2006).

Un alimento funcional puede ser un alimento natural, al que se le ha añadido, eliminado o modificado un componente por medios biotecnológicos, un alimento en el que se ha modificado la biodisponibilidad de uno o más de sus componentes o una combinación de cualquiera de estas posibilidades (Diplock *et al.*, 1999; Isolauri *et al.*, 2000). El ejemplo más claro de un alimento funcional es la leche humana, que contiene gran número de elementos bioactivos (enzimas, factores de crecimiento, aminoácidos libres, inmunoglobulinas, oligosacáridos, etc.) cuyo efecto va mucho más allá del puramente nutricional. Existen muchos componentes de alimentos de los que se ha demostrado su efecto beneficioso sobre determinadas funciones del organismo. La adición de estos componentes a un alimento, lo transforma en un alimento funcional, por ejemplo, el yogurt con bacterias probióticas, el ácido

fólico en los cereales o los ácidos grasos en las margarinas y productos lácteos. De todos ellos cabe destacar el grupo de los probióticos, prebióticos y simbióticos, (Metchnikoff *et al.*, 1908).

El auge de los alimentos funcionales ha aumentado en la última década debido a que los consumidores prestan especial atención a la dieta, la nutrición y el cuidado de la salud (Gamel *et al.*, 2008; Walker, 2008; Rosendale *et al.*, 2008; Markosyan *et al.*, 2009) citado por Amorocho (2011), el cual representa un beneficio para el consumidor y oportunidad para la industria de alimentos, brindando mayor valor añadido a sus productos (Burdock *et al.*, 2006). Según Markosyan *et al.*, (2009), para que esto se logre se debe controlar los procesos y asumir estándares de seguridad.

4.3. Probióticos.

Fuller (1999), define los probióticos como aquellos microorganismos vivos que, al ser agregados como suplemento en la dieta, afectan en forma beneficiosa al desarrollo de la flora microbiana en el intestino.

Penna (1998) define también los probióticos como bioterapéuticos, bioprotectores o bioprofilácticos, los cuales son usados para prevenir las infecciones entéricas y gastrointestinales, estimulando las funciones protectoras del sistema digestivo.

Pardio *et al.*, (1994) afirma que para que un microorganismo pueda realizar ésta función de protección protección tiene que cumplir los postulados de Huchetson: ser habitante normal del intestino, tener un tiempo corto de reproducción, ser capaz de producir compuestos antimicrobianos y ser estable durante el proceso de producción, comercialización y distribución para que pueda llegar vivo al intestino, teniendo claro que es importante que estos microorganismos puedan ser capaces de atravesar la barrera gástrica para poder multiplicarse y colonizar el intestino.

El efecto protector de estos microorganismos se realiza mediante 2 mecanismos: el antagonismo que impide la multiplicación de los patógenos y la producción de metabolitos que imposibilitan su acción patogénica. Este antagonismo está dado por la competencia por los nutrientes o los sitios de adhesión. Mediante la inmuno-modulación protegen al huésped de las infecciones, induciendo a un aumento de la producción de inmunoglobulinas, aumento de la activación de las células mononucleares y de los linfocitos (Penna, 1998).

Algunas otras de las acciones benéficas que tienen los probióticos han sido comprobadas por Mombelli *et al.*, (2000), quienes evaluaron *in vitro* e *in vivo* el efecto de los probióticos en estados patológicos como diarreas, infecciones del sistema urinario, desórdenes inmunológicos, intolerancia a la lactosa, hipercolesterolemia, algunos tipos de cáncer y las alergias alimentarias.

Se ha comprobado que algunos probióticos mejoran los síntomas de intolerancia a la lactosa. En un estudio en niños suplementados con *Lactobacillus casei* se observó un aumento de la inmunoglobulina (IgA) con una menor duración de la diarrea inducida por rotavirus (Kaila *et al.*, 1992). Roberfroid *et al.*, (2000) comprobaron que con el consumo de *Lactobacillus*

acidophilus y *Bifidobacterium bifidum* se obtiene un aumento de la actividad fagocítica de los granulocitos circulantes. Por su parte la ingesta de yogurt incrementa la producción de citoquinas (Schiffin *et al.*, 1995). Otra función de los probióticos es la de disminuir la producción de enzimas como la b-glucuronidasa, la b-glucosidasa, la nitroreductasa y la ureasa. Estas enzimas participan en la activación metabólica de los mutágenos y carcinógenos (Torres *et al.*, 1999).

4.3.1. Antecedentes de los Probióticos.

Según Guarner *et al.*, (2011) la historia de los probióticos se desarrolla desde hace aproximadamente un siglo cuando Elie Metchnikoff (un científico ruso galardonado con el premio Nobel, y profesor del Instituto Pasteur de París) postuló que las bacterias ácido lácticas (BAL) conferían beneficios a la salud capaces de promover la longevidad además sugería que la “autointoxicación intestinal” y el envejecimiento resultante podrían suprimirse modificando la flora intestinal y reemplazando los microbios proteolíticos tales como *Clostridium* que producen sustancias tóxicas, entre las que se encuentran los fenoles, índoles y amoníaco a partir de la digestión de proteínas por microbios útiles. Desarrolló una dieta con leche fermentada con la bacteria que denominó “Bacilo búlgaro”. En 1917, antes de que Alexander Fleming descubriera la penicilina, el profesor alemán Alfred Nissle aisló una cepa no patógena de *Escherichia coli* a partir de heces de un soldado de la Primera Guerra Mundial que no había desarrollado enterocolitis durante un brote severo de *Shigellosis*. Los trastornos del tracto intestinal frecuentemente eran tratados con bacterias no patógenas viables, con el fin de modificar o reemplazar la flora intestinal. La cepa Nissle 1917 de *Escherichia coli* es uno de los pocos ejemplos de un probiótico no BAL. El primero en aislar una bífidobacteria fue Henry Tissier (del Instituto Pasteur), quien la obtuvo de un lactante alimentado a pecho, y le dio el nombre de bacteria *Bacillus bifidus communis*. Tissier postulaba que las bífidobacterias desplazarían a las bacterias proteolíticas que provocan diarrea y recomendaba la administración de bífidobacterias a los lactantes que sufrían de estos síntomas. El término “probióticos” fue introducido por primera vez en 1965 por Lilly y Stillwell; a diferencia de los antibióticos, los prebióticos fueron definidos como factores de origen microbiano que estimulan la proliferación de otros organismos. En 1999, Roy Fuller destacó el hecho que para considerarse probiótico, el microorganismo en cuestión debía estar presente en estado viable, e introdujo la idea de su efecto beneficioso sobre el huésped.

4.3.2. Efectos beneficiosos de los probióticos

Según Chandan (1999) y Saarela *et al.*, (2000), al uso de probióticos se le atribuyen numerosos efectos saludables (Tabla 1), y son muchos los trabajos que demuestran los beneficios de éstos para la salud humana.

Tabla 1. Principales microorganismos probióticos y efectos beneficiosos para la salud

Microorganismo	Efecto Beneficioso
<i>L. acidophilus</i> LC1	Equilibrio flora intestinal, efecto en sistema inmunitario
<i>L. acidophilus</i>	Reducción actividad enzimas pro cancerígenas, diarrea y

<i>NRCO1748</i>	constipación
<i>L. acidophilus NCFM</i>	Reducción actividad enzimas pro cancerígenas
<i>L. jonsonii LA1</i>	Inmunoestimulador, tratamiento de gastritis y úlceras
<i>L. rhamnosus GG</i>	Inmunoestimulador, diarrea, inflamación del intestino.
<i>L. bulgaricus</i>	Inmunoestimulador, absorción de lactosa
<i>L. casei</i>	Promotor del crecimiento y de la viabilidad de probióticos
<i>B. bifidum</i>	Diarrea por rotavirus, equilibrio de la micro biota
<i>S. themophilus</i>	Inmunoestimulador, absorción de lactosa
<i>S. boulardii</i>	Prevención de diarrea y tratamiento de colitis

4.3.2.1. Efectos en la microbiota intestinal

Gracias a la determinación del contenido de la microbiota mediante el recuento de los microorganismos presentes en las heces se ha podido ver cómo *Lactobacillus casei* puede modificar la microbiota intestinal y su actividad. Se han realizado estudios que demuestran beneficio por parte de los probióticos en la microbiota intestinal, por ejemplo, Goldin *et al.*, (1992) en sus estudios, demostró que la leche fermentada con *L. casei*, además de aumentar la población de lactobacilos en las heces, disminuye la actividad de las enzimas β -glucuronidasa del colon, acidorreductasa glicólica nitrorreductasa en adultos sanos; en estudios de Guérin *et al.*, (1997), ésta disminución en las actividades de la β -glucuronidasa y la β -glucosidasa en niños fue mayor tras la ingestión de una leche fermentada con cultivos de yogurt y *L. casei*. La ingestión de leche fermentada con bifidobacterias conduce a su aumento en las heces, tanto en niños como en adultos, y además lleva a una disminución de la actividad de la β -glucuronidasa, pero no de las otras enzimas que se asocian con el cáncer de colon (Langhendries *et al.*, 1995; Bouhnik *et al.*, 1996). Por su parte, Hebuterne (2003), sugiere que la edad afecta a la microbiota intestinal, con una disminución en la población anaerobia y de bifidobacterias y un incremento de enterobacterias. Estos cambios y la reducida inmunidad intestinal pueden favorecer la aparición de infecciones gastrointestinales, frecuentes en las personas mayores, por lo que los probióticos pueden ser interesantes por su efecto positivo sobre la función intestinal.

4.3.2.2. Efectos sobre el estreñimiento leve

El tránsito intestinal lento es un problema común de las personas mayores. Diversos estudios sugieren que los probióticos mejoran parcialmente la motilidad intestinal y reducen la actividad enzimática fecal. En un estudio paralelo abierto, los sujetos fueron divididos en tres grupos: uno control, otro que recibió zumo suplementado con *Lactobacillus reuteri*, y un tercero que tomó zumo suplementado con *Lactobacillus rhamnosus* y *Propionibacterium freudenreichii*. Los sujetos que recibieron *L. rhamnosus* y *P. freudenreichii* mostraron un incremento del 24% en la frecuencia de defecación y una reducción significativa de la actividad azorreductasa. Sin embargo, no se notó una reducción en el uso de laxantes (Ouwehand *et al.*, 2002).

4.3.2.3. Prevención y tratamiento de la diarrea

Majamaa *et al.*, (1995) y Meier *et al.*, (2003) confirmaron en sus estudios que el consumo de *L. rhamnosus* GG reduce la duración de la diarrea, en particular de la gastroenteritis por rotavirus. En la prevención de la infección nosocomial por rotavirus, un estudio doble ciego realizado en niños demostró que una fórmula suplementada con *B. bifidum* y *S. thermophilus* redujo la incidencia de la diarrea adquirida en los hospitales, en comparación con una formulación estándar (Saavedra *et al.*, 1994).

Guandalini *et al.*, (2000) realizaron un estudio multicéntrico en Europa, en el cual se observó que la administración simultánea de una solución hipotónica de rehidratación oral y *Lactobacillus* GG, en niños con diarrea aguda, redujo la duración de la diarrea y la estancia en el hospital.

A largo plazo, *H. pylori* es la causa principal de úlcera péptica y un factor de riesgo para el cáncer gástrico en humanos, llevando a afectar aproximadamente al 50% de la población general. La erradicación de este patógeno se basa en una terapia con dos o tres antibióticos más un inhibidor de la bomba de protones; con ello se han llevado a cabo diversos estudios clínicos y modelos *in vitro* los cuales han demostrado que la asociación de *Lactobacillus* junto con antibióticos para el tratamiento de *H. pylori* ejerce un efecto antagonista frente a este microorganismo (Hamilton-Miller *et al.*, 2003).

Sakamoto *et al.*, (2001) realizaron dos estudios doble ciego donde se observó el efecto favorable sobre la gastritis asociada a *H. pylori* con la única administración de leche fermentada que contenía *Lactobacillus johnsonii*. *Lactobacillus gasseri*; con este último se redujo la inflamación gástrica, pero en ninguno de los estudios se pudo confirmar la erradicación de *H. pylori*. Por otro lado, *Saccharomyces boulardii*, hongo que normalmente no está presente en el intestino humano, antagoniza el efecto de la toxina A de *C. difficile*, además Siitonen *et al.*, (1990) y D'Souza *et al.*, (2002) demostraron la gran utilidad de ésta cepa (*Lactobacillus gasseri*) en la prevención y el tratamiento de las recaídas de la diarrea post antibióticos especialmente en las causadas por *Clostridium* (Surawiez *et al.*, 2003).

4.3.2.4. Intolerancia a la lactosa

Una especie perteneciente al grupo de *Streptococcus salivarius* es *S. thermophilus*, la cual se ha usado mayormente como probiótico por su capacidad de fermentar la lactosa; en base a lo anterior Sanders *et al.*, (2000) y D'Vrese *et al.*, (2001) afirmó que la aportación de lactasa a partir de cultivos bacterianos se basa en intentar mejorar la digestión de la lactosa en los pacientes con intolerancia a ésta.

4.3.2.5. Enfermedad Inflamatoria intestinal

Rembecken *et al.*, (1999) y Rurgeerts (2003) evaluaron los beneficios de los probióticos en pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal mediante estudios a doble ciego donde *E. coli* no patógena, *S. bolardii* y una fórmula constituida por especies de *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* y *S. thermophilus*, resultaron ser tan efectivos como el tratamiento estándar en la

prevención de las recaídas en la colitis ulcerosa, la bursitis crónica o incluso la enfermedad de Crohn.

Por su parte, Guandalini (2002) en un estudio piloto investigó el posible efecto de *Lactobacillus* GG en niños con enfermedad de Crohn activa, mostrando en sus resultados clínicos, que los pacientes mostraron una mejora significativa, con lo que *Lactobacillus* GG parece ser efectivo para mejorar el estado clínico de los niños con esta enfermedad.

4.3.2.6. Efectos moduladores sobre el sistema inmunitario

Se ha observado que ciertas cepas de bacterias ácido-lácticas intervienen sobre las reacciones de hipersensibilidad retardada, la producción de anticuerpos y la activación funcional de los macrófagos, lo cual ha aumentado la influencia de los probióticos sobre la respuesta inmunitaria (Pendigon *et al.*, 1995).

Schiffrin *et al.*, (1995) describieron las propiedades inmunomoduladoras de las bacterias ácido-lácticas en humanos, en un trabajo donde probó en un grupo de voluntarios sanos una leche fermentada suplementada con *L. acidophilus* La1 o *B. bifidum* Bb12, y midió la actividad fagocítica de los leucocitos en sangre, la cual se vio aumentada en ambos grupos, ocurriendo paralelamente con la colonización fecal por BAL que permanecieron en el intestino durante seis semanas tras la ingestión del producto. Cinco años después Haller, (2000) y Fang *et al.*, (2000), aseguraron que el mecanismo de fagocitosis se activa e incrementa en los tratamientos con bebidas lácteas enriquecidas con *Lactobacillus*, y que va acompañado de la producción de varias citocinas, como el interferón gamma, la interleucina 12 y la interleucina 10.

Diversas combinaciones de probióticos permiten una mejor modulación de otro tipo de respuesta inmunitaria, como ocurre en el desarrollo de eccemas atípicos en los neonatos. Se ha observado que el número de afectados por eccemas se reduce más del 50% frente a los tratados con placebo (Murch, 2001).

4.3.2.7. Cáncer

El cáncer colorrectal es una de las principales causas de mortalidad prematura de los europeos adultos. Aunque no existe una demostración experimental directa para la supresión del cáncer en seres humanos como consecuencia del consumo de bacterias ácido-lácticas, hay ciertas pruebas indirectas en determinados estudios que se encuentran en la literatura (Horie *et al.*, 2003 y Femia *et al.*, 2002).

Existe un estudio llevado a cabo por Reddy (1998), quien demostró que la administración dietética de cultivos liofilizados de *Bifidobacterium longum* inhibía el desarrollo de tumor mamario y de colon. Esto se asoció con una disminución de la proliferación de las células de la mucosa del colon. Al estudiar el efecto de ciertas leches fermentadas con diferentes cepas de BAL, se ha observado una inhibición sobre el crecimiento de una línea celular de cáncer. Este efecto antiproliferativo puede ser útil en la prevención y el tratamiento de tumores graves.

4.3.2.8. Infecciones urinarias

Reid (2001) y Bruce *et al.*, (2003) han usado varias especies de *Lactobacillus* en la prevención y el tratamiento de las infecciones del tracto urinario, encontrando que la presencia de *Lactobacillus* en la vagina está asociada con un reducido riesgo de vaginosis bacteriana e infecciones del tracto urinario, y que los mecanismos de acción parecen involucrar factores de adhesión, productos como el peróxido de hidrógeno y bacteriocinas letales para los patógenos, y quizás por efectos de modulación inmunitaria. Un año más tarde, Reid *et al.*, (2002), en sus estudios comprobó que la administración vaginal de cepas de *Lactobacillus* GR-1 y B-54 o RC-14 reduce el riesgo de infecciones del tracto urinario y mejora el mantenimiento de una flora normal. Así mismo, la administración por vía digestiva de estos *Lactobacillus* ha mostrado efectos similares sobre la flora vaginal.

4.3.2.9. Reducción del colesterol

Taranto *et al.*, (1998) realizó estudios para evaluar la acción benéfica de los probióticos en la reducción del colesterol, administrando cepas de *Lactobacillus reuteri* CRL1098 (10^4 UFC/día) en ratones con hipercolesterolemia durante siete días, encontrando una disminución del colesterol total en un 38%, originando concentraciones séricas de colesterol similares a las del grupo control; esta dosis de *L. reuteri* causó una reducción de un 40% en los triglicéridos y un aumento del 20% en el cociente LDL/HDL, sin modificar la flora normal del bazo y el hígado.

Después de cuatro años, Kiessling *et al.*, (2002) en sus estudios observaron que el consumo diario a largo plazo de 300 mg de yogurt suplementado con *L. acidophilus* y *B. longum* incrementaba la concentración sérica de HDL y conducía a la mejora de la proporción LDL/HDL.

4.3.2.10. Infecciones respiratorias y otitis media

La mayoría de los estudios clínicos sobre probióticos han estado dirigidos hacia la prevención o el tratamiento de los trastornos de la microbiota gastrointestinal. Sin embargo, aumenta la curiosidad por los beneficios de los probióticos en nuevas áreas, tales como la prevención de recaídas en la otitis media aguda y la faringotonsilitis estreptocócica de los niños; por ello Hatakka *et al.*, (2001), en sus estudios realizados, encontraron una disminución en el porcentaje de infecciones respiratorias en los niños que recibieron *Lactobacillus* GG con la leche, en comparación con los que recibieron placebo.

Otro estudio elaborado por Rooss *et al.*, (2001), utilizó un innovador spray constituido por cepas de *Streptococcus* alfa hemolíticos, previamente seleccionadas por su actividad inhibitoria frente a los patógenos implicados; la aplicación del spray junto con el tratamiento antimicrobiano resultó en una reducción de la incidencia de recaídas y, por tanto, redujo la necesidad de tratamiento antimicrobiano.

4.3.2.11. Caries

Los probióticos se han considerado atractivos para la prevención de la caries. Algunos microorganismos probióticos se han investigado *in vitro* por su capacidad de formar parte del *biofilm supragingival* y de competir con microorganismos cariogénicos, obteniendo resultados prometedores. Además, la leche fermentada con *Lactobacillus* GG reduce la adherencia de *Streptococcus mutans*. Sin embargo, en un estudio clínico realizado por Sullivan *et al.*, (2002) con aproximadamente 600 niños durante siete meses, no se encontraron diferencias significativas sobre el efecto preventivo de *Lactobacillus* GG frente al grupo control.

4.4. Fermentos lácticos

Según Hassan *et al.*, (2001), los estudios de microbiología láctica iniciaron con la investigación del proceso de acidificación que ocurre naturalmente en la leche, suero de quesería o suero de manteca. Estos productos acidificados ya se habían utilizado mucho tiempo antes como inóculo para producir queso, mantequilla y cultivos lácticos, pero las fermentaciones resultantes eran imprevisibles y de calidad desigual. La producción comercial de cultivos iniciadores y su uso crecieron rápidamente en la industria láctea debido a sus numerosas ventajas.

Actualmente, muchos productos lácteos se elaboran con cultivos lácticos iniciadores comerciales, que han sido aislados y seleccionados en función de la variedad, de las propiedades deseadas y de la velocidad de producción de ácido láctico. Entre las propiedades deseadas pueden incluirse la producción de sabores, aromas, resistencia a los bacteriófagos, tolerancia a la sal, entre otros.

4.5. Bacterias Ácido Lácticas (BAL)

Las BAL utilizan varios azúcares como la glucosa y la lactosa para la producción de ácido acético mediante la fermentación. Según Torres (1999), algunas bacterias conocidas como anaerobias facultativas y otras como anaeróbicas obligadas pueden colonizar transitoriamente el intestino y sobrevivir durante el tránsito intestinal; además por su adhesión al epitelio, modifican la respuesta inmune local del hospedero (Schiffin *et al.*, 1997). Está demostrada la eficacia de las bacterias vivas que se utilizan como fermentos lácticos en el tratamiento de los signos y síntomas que acompañan la intolerancia a la lactosa.

Aunque las BAL tienen características genéticas diversas, en general son microorganismos gram-positivos, no pigmentados, no forman esporas, y no reducen los nitratos, ni producen catalasa. Las BAL son anaerobias, pero aerotolerantes, y se caracterizan también por una producción de cantidades importantes de ácido láctico como resultado del metabolismo de los hidratos de carbono (Eck, 1990; Stanley, 1998; Fox *et al.*, 2000 y Hassan *et al.*, 2001). Según Stanley (1998) y Hassan *et al.*, (2001) las BAL requieren aminoácidos específicos, vitaminas B y otros factores de crecimiento, y son incapaces de utilizar hidratos de carbono complejos.

Según el criterio taxonómico genético hay 12 géneros de bacterias lácticas que comprende *Lactobacillus spp*, *Streptococcus spp*, *Lactococcus spp*, *Leuconostoc spp*, *Enterococcus spp*, *Pediococcus spp*, *Vagococcus spp*, *Aerococcus spp*, *Alloicoccus spp*, *Tetragenococcus spp*, *Carnobacterián spp* y *Weissella spp* (Fox *et al.*, 2000). De todas ellas normalmente cuatro se encuentran en los cultivos lácteos iniciadores; *Lactobacillus spp*, *Streptococcus spp*, *Lactococcus spp* y *Leuconostoc spp*. Un quinto género, *Enterococcus spp*, se encuentra en algunos fermentos o cultivos iniciadores mixtos debido a su efecto beneficioso en el desarrollo del aroma, sabor y textura de los productos lácteos (Tzanetakis *et al.*, 1989; Fox *et al.*, 2000; Hassan y Frank, 2001).

Las BAL pueden clasificarse por un criterio taxonómico fenotípico que incluye la apariencia morfológica (bacilos o cocos), fermentación de los hidratos de carbono (homofermentativas o heterofermentativas), intervalo de temperatura de crecimiento (mesófilas o termófilas) y la tolerancia a la sal (halotolerantes y no halotolerantes) (Eck, 1990; Axelsson, 1993; Mayra-Makmen *et al.*, 1993; Fox *et al.*, 2000).

4.5.1. Aislamiento de BAL

Para realizar el aislamiento de las BASL, Stanley (1998) y Hassan *et al.*, (2001) afirman que se dispone actualmente de muchos medios de cultivo para el aislamiento y diferenciación de las BAL, aunque sólo algunos de ellos se los considera efectivamente selectivos, según Hassan *et al.*, (2001) la capacidad diferenciadora se basa en las características bioquímicas (catalasa, oxidasa y coloración de Gram) y bioproductos (ácido acético, diacetilo, acetoína, gas carbónico) de las especies a aislar.

Normalmente, los medios de cultivo más utilizados para aislar bacterias lácticas son: el M17 para *Lactococcus spp*. (Terzaghi *et al.*,1975); MRS para *Lactobocillus spp*. (Demam *et al.*, 1960); y el MSE para *Leuconostoc spp*. (Mayeux *et al.*, 1962). El agar APT resultó inadecuado debido a la presencia de colonias que no presentaban estas características bioquímicas (Zamora, 2003).

4.5.2. Pruebas bioquímicas

Dentro de las pruebas bioquímicas a realizar a este tipo de especies se encuentran:

4.5.2.1. Catalasa

La prueba de catalasa en las bacterias se basa en la capacidad que tienen los microorganismos catalasa positivos de desdoblar el agua oxigenada, en agua y oxígeno. Según Fung (1997), entre estas bacterias se encuentran una parte considerable de las alterantes de los alimentos frescos almacenados en aerobiosis bajo refrigeración.

4.5.2.2. Oxidasa

La prueba de oxidasa es una prueba usada en microbiología para determinar si una bacteria produce alguna de las citocromo c oxidasas. La prueba hace uso de discos impregnados con el reactivo N,n,n,n-tetrametil-p-fenilendiamina (o TMFD) o N,N-Dimetil-p-fenilendiamina (o DMFD), el cual también es un indicador redox. El reactivo pasa de azul oscuro a granate al ser oxidado, y se vuelve transparente al ser reducido. Las bacterias oxidasa positiva poseen citocromo oxidasa o indofenol oxidasa (una hemoproteína) (Isenberg, 2004). Ambas catalizan el transporte de electrones de compuestos donantes (NADH) a receptores de electrones (por lo general el oxígeno). En la prueba, el reactivo TMFD actúa como donante artificial de electrones para la enzima oxidasa. El reactivo oxidado forma el compuesto coloreado de indofenol azul. El sistema citocromo esta normalmente presente solo en los organismos aerobios capaces de usar el oxígeno como aceptor final de hidrógeno donde según MacFaddin (2000) el producto final de este metabolismo puede ser agua o peróxido de hidrógeno.

4.5.2.3. Tinción de Gram

Merck (2005) afirma que esta coloración permite la clasificación de las bacterias en Gram positivas y Gram negativas según la composición de su pared celular. Por esto el complejo de color formado con la pared de las bacterias Gram positivas no puede ser removido con el agente decolorante que es el alcohol acetona; la célula permanece de color azul violeta, en cambio las bacterias Gram negativas, al decolorarse con el alcohol acetona, se dejan colorear con la fuscina o safranina, quedando de color rosado.

4.5.3. Prueba de Motilidad de Bacterias

Llamada también de la gota suspendida. Algunas bacterias son móviles por presentar flagelo, los flagelos son encontrados principalmente en las formas bacilares y pueden presentarse en número y posición variados (monotricos, peritricos, etc.). La base de esta prueba es determinar si la bacteria es móvil o inmóvil. Con un asa de inoculación se le coloca a un cubreobjetos un poco de muestra y se le agrega una gota de agua destilada. Se coloca sobre un portaobjetos y se observa al microscopio. Así se puede observar si las bacterias tienen movimientos rectilíneos o curvos y en todas direcciones.

4.5.4. Citrato de Simmons.

Esta prueba permite diferenciar un grupo de bacterias que son capaces de crecer con citrato como única fuente de carbono y sales amónicas inorgánicas como única fuente de nitrógeno, provocando la alcalinización del medio.

El medio a utilizar es agar Citrato de Simmons, que contiene citrato de sodio, fosfato de amonio y azul de bromotimol como indicador de pH. Sólo las bacterias capaces de metabolizar el citrato podrán multiplicarse en este medio y liberarán iones amonio lo que, junto con el metabolismo del citrato, generará una fuerte basificación del medio que será aparente por un cambio de color del mismo de verde a azul.

4.6. Bacterias patógenas asociadas a contaminación de alimentos

4.6.1. *Escherichia coli*

Bacilos cortos, Gram negativos. Pertenece a las Enterobacterias lactosa positivas, se encuentra en el tracto intestinal del hombre y de los animales de sangre caliente, produce gas a una temperatura de 44 a 44,5°C ± 0,2 (Rugama *et al.*, 2010). Los criterios microbiológicos que incluyen *E. coli* son de utilidad en casos en que se desea determinar contaminación fecal, ya que la contaminación de un alimento con esta bacteria implica el riesgo de que puedan encontrarse en el mismo, patógenos entéricos que constituyan un riesgo para la salud. Sin embargo, la ausencia de *E. coli* no asegura la ausencia de patógenos entéricos (Rugama *et al.*, 2010) citado por Pérez *et al.*, (2015).

De acuerdo a Madigan *et al.*, (2003), se debe tener en cuenta que, en muchos productos crudos de origen animal, bajos recuentos de *E. coli* pueden ser esperados dada la asociación cercana de estos alimentos con el ambiente animal y por la probabilidad de la contaminación con materia fecal animal durante la faena.

Se considera indicador de contaminación fecal reciente, humana o animal en productos como agua embotellada, leche y jugos, alimentos infantiles, y alimentos procesados, en general. Su presencia en el alimento que ha sido sometido a temperaturas elevadas significa un proceso deficiente o, lo que es más común, una contaminación posterior al proceso atribuible al equipo, manipuladores o contaminación cruzada. Sin embargo, si el objetivo del análisis es controlar la contaminación post tratamiento térmico, los organismos seleccionados deberían ser las bacterias coliformes en lugar de *E. coli*.

Según Madigan *et al.*, (2003) citado por Pérez *et al.*, (2015) la identificación de *E. coli* se realiza con el uso de medios de cultivos y se basa en la aparición de colonias con determinada coloración.

En la tabla 2 se puede evidenciar algunos medios y la coloración que presentan las colonias en esos medios de aislamiento.

Tabla 2. Morfología colonial en medios de aislamiento primario de cultivo

Medio de cultivo	Coloración de colonias
Agar bismuto-sulfito	verde-café sin brillo metálico
Agar Hektoen	rosado-salmón
Agar <i>Salmonella-Shigella</i>	rosadas
Agar Tergitol 7	amarillas
Agar MacConkey	rosadas
Agar Eosina-Azul de Metileno (EMB) de Levine	púrpura a verde metálico

Fuente adaptada Pérez *et al.*, (2015).

En los estudios realizados por Verweyen et al., (2005) citado por Pérez *et al.*, (2015), la epidemiología de la *E. coli* O157:H7 indica que los mecanismos de transmisión están relacionados con el consumo de carne vacuna o productos lácteos contaminados y ha sido identificada como una cepa causante de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) a nivel mundial. Anualmente se reportan infecciones por esta bacteria en diferentes partes del mundo, sobre todo en países industrializados como Estados Unidos y Canadá (Nataro *et al.*, 2008).

En América del Sur, los países que reportan aislamientos de *Escherichia coli* enterohemorrágica (ECEH) son principalmente Chile y Argentina (Padola *et al.*, 2012) citado por Pérez *et al.*, (2015). Sin embargo, mientras que algunos serotipos se correlacionan completamente con algunos síndromes clínicos, la diferenciación de cepas patógenas de la microbiota normal depende de la identificación de las características de virulencia. Desde 1977, se ha reconocido que algunas cepas diarreicas de *E. coli* producen toxinas que tienen un efecto citopático irreversible sobre las células Verocultivadas (Konowalchuk *et al.*, 1977). Strockbine *et al.*, (2008) afirma que se ha demostrado que *E. coli* verocitotoxigénica pertenece a más de 100 serotipos diferentes. (Strockbine *et al.*, 2008).

También se la ha descrito a *E. coli* como productora de la toxina Shiga (STEC) debido a la similitud demostrada entre las verocitotoxinas (VT) y las toxinas Shiga (stx) de *Shigella dysenteriae* (O'brien *et al.*, 2003). En las dos últimas décadas, ha aumentado la importancia a escala mundial de la VTEC O₁₅₇:H₇ como problema de salud pública. *Escherichia coli* O₁₅₇:H₇ es el serotipo predominante y más virulento en un subtipo patógeno de la VTEC, designado como *E. coli* enterohemorrágico (EHEC). Esta designación se basa en su capacidad para producir colitis hemorrágica y el síndrome de uremia hemolítica en humanos, su habilidad para producir VT, para causar uniones y lesiones de eliminación de células epiteliales y la presencia de un plásmido grande característico (Nataro *et al.*, 2008).

Clarke (2001) citado por Pérez *et al.*, (2015). afirma que es de vital importancia reconocer la presencia de *Escherichia coli* (ECEH) como agente etiológico relacionado a diarrea hemorrágica y ocasionalmente a una falla renal (Síndrome urémico hemolítico), especialmente en infantes y ancianos, recomendándose en muchos laboratorios de referencia, la vigilancia epidemiológica de este patógeno.

4.8.2. *Klebsiella*

Es un género de bacterias inmóviles, Gram-negativas, anaerobias facultativas y con una prominente cápsula de polisacáridos. La *Klebsiella* es un frecuente patógeno humano. Las especies del género *Klebsiella* son fijadoras de nitrógeno y son ubicuas en la naturaleza.

Recibe ese nombre en honor al microbiólogo alemán Edwin Klebs (1834-1913). Los organismos bacteriales del género *Klebsiella* pueden encabezar un amplio rango de estados infecciosos, sobre todo neumonía. Entre ellos, cabe destacar los siguientes:

4.8.2.1. *Klebsiella pneumoniae*

Ocasiona infecciones del tracto urinario, septicemia, e infecciones de tejidos blandos.

4.8.2.2. *Klebsiella ozaenae*

Causante de rinitis atrófica.

4.8.2.3. *Klebsiella rhinoscleromatis*

Genera infecciones en vías respiratorias, causando rhinoscleroma o escleroma.

4.9. Antibiograma

El primer objetivo del antibiograma es el de medir la sensibilidad de una cepa bacteriana que se sospecha es la responsable de una infección a uno o varios antibióticos. En efecto, la sensibilidad *in vitro* es uno de los requisitos previos para la eficacia *in vivo* de un tratamiento antibiótico. El segundo objetivo del antibiograma es el de seguir la evolución de las resistencias bacterianas. Se debe realizar un antibiograma siempre que una toma bacteriológica de finalidad diagnóstica haya permitido el aislamiento de una bacteria considerada responsable de la infección.

La determinación de la Concentración Inhibidora Mínima (CIM) es la base de la medida de la sensibilidad de una bacteria a un determinado antibiótico. La CIM se define como la menor concentración de una gama de diluciones de antibiótico que provoca una inhibición de cualquier crecimiento bacteriano visible. Es el valor fundamental de referencia que permite establecer una escala de actividad del antibiótico frente a diferentes especies bacterianas.

4.9.1. Sulfametoxazol

El trimetoprim/sulfametoxazol (también conocido con el nombre de cotrimoxazol o TMP-SMX) es la asociación del trimetoprim y del sulfametoxazol en una proporción fija de 1:5. Esta proporción ocasiona unas concentraciones plasmáticas en la proporción 1:20 que es la que produce una óptima actividad antibacteriana. Tanto el trimetoprim como el sulfametoxazol son, individualmente, fármacos antibacterianos eficaces de la familia de los antagonistas del folato. Inicialmente desarrollada para el tratamiento de las infecciones urinarias, la asociación trimetoprim-sulfametoxazol es muy versátil y se emplea en la prevención y tratamiento de numerosas infecciones en particular la neumonía debida al *Pneumocystis carinii*.

4.9.1.1. Mecanismo de acción

Según William *et al.*, (1995) el trimetoprim/sulfametoxazol es generalmente bactericida actuando al inhibir enzimas secuenciales que intervienen en la síntesis del ácido fólico bacteriano. El sulfametoxazol es estructuralmente parecido al ácido p-aminobutírico (PABA) inhibiendo de forma competitiva la formación del ácido fólico a partir del PABA. Por su parte, el trimetoprim se une a la enzima dihidrofolato reductasa, lo que impide la formación del ácido tetrahidrofólico a partir del dihidrofolato.

El ácido tetrahidrofólico (THF) es la forma activa del ácido fólico sin el cual la bacteria no puede sintetizar timidina, lo que conduce a una interferencia en la síntesis de los ácidos nucleicos y de las proteínas. En estudios comprobados por Singh *et al.*, (1995) concluyen que al actuar mediante estos dos mecanismos diferentes, la combinación trimetoprim-sulfametoxazol es sinérgica frente a un gran número de bacterias.

La combinación trimetoprim-sulfametoxazol es usualmente activa frente a los siguientes microorganismos: *Staphylococcus epidermidis* y *S. aureus*; *Streptococcus pneumoniae* y *S. viridans*; numerosas *Enterobacteriaceas*; *Salmonella*, *Shigella*, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, y *Stenotrophomonas maltophilia*. Los enterococos, *Neisseria gonorrhoeae*, *Pseudomonas aeruginosa*, y anaerobios suelen ser resistentes o son menos susceptibles. El TMP-SMX es también efectivo frente a *Pneumocystis carinii*, *Listeria monocytogenes*, muchas especies de *Nocardia*, *Yersinia enterocolitica* y *Legionella pneumophila* (Smego *et al.*, 1983).

4.9.1.2. Farmacocinética

La combinación trimetoprim-sulfametoxazol es rápida y extensamente absorbida por el tracto gastrointestinal. Después de una dosis única de 160 mg TMP + 800 mg SMX, se alcanzan las concentraciones plasmáticas máximas de 1—2 µg/ml y 40—60 µg/ml, respectivamente al cabo de 1 a 4 horas. Dagan *et al.*, (1992) afirma que después de dosis múltiples se alcanzan unas concentraciones plasmáticas de equilibrio (steady-state) que son un 50% más elevadas que las obtenidas después de dosis únicas. Las concentraciones de ambos fármacos en el plasma se encuentran en la proporción de 1:20. La infusión intravenosa de dosis de 160 mg TMP + 800 mg SMX ocasiona unas concentraciones plasmáticas de 6 a 9 µg/ml y de 70 a 105 µg/ml, respectivamente.

El sulfametoxazol se distribuye ampliamente en todos los tejidos y fluidos del organismo incluyendo los fluidos sinovial, pleural, peritoneal y ocular. También se excreta en la leche materna y atraviesa la barrera placentaria.

Igualmente, el trimetoprim es rápidamente distribuido en los tejidos y fluidos: se encuentran concentraciones elevadas de TMP en la bilis, humor acuoso, médula ósea, fluido prostático y vaginal. En el líquido cefalorraquídeo, las concentraciones suelen ser de un 30 a 50% las de la sangre. Afirma Stein *et al.*, (1991) que análogamente al SMX, el trimetoprim se excreta en la leche materna y cruza la barrera placentaria. La unión a las proteínas del plasma es del 44% para el trimetoprim y del 70% para el sulfametoxazol.

Ambos fármacos se eliminan preferentemente por vía renal después de haber experimentado un cierto metabolismo en el hígado. Hasta el 80% del trimetoprim y el 20% del sulfametoxazol son eliminados en la orina sin alterar. Ambos productos se excretan por filtración glomerular con alguna secreción tubular. Parte del sulfametoxazol se reabsorbe (William *et al.*, 1995).

La semi-vida de eliminación del sulfametoxazol oscila entre las 6 y 12 horas en los pacientes con la función renal normal y entre las 20 y 50 horas en los pacientes con insuficiencia renal. Por su parte, la semi-vida de eliminación del trimetoprim es de unas 8-10 horas en los sujetos normales y de 20-50 horas en los pacientes con insuficiencia renal. Ambos fármacos son eliminados de forma significativa durante la diálisis (DuPont *et al.*, 1994).

4.9.2. Cefalexina

Rusell *et al.*, 1971 define la cefalexina como un antibiótico oral de la primera generación de cefalosporinas con excelente actividad contra la mayoría de bacterias Gram-positivas que se utiliza principalmente en el tratamiento de la otitis media y las infecciones de las vías respiratorias causadas por estafilococos susceptibles, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus* del grupo A y beta-hemolíticos.

4.9.2.1. Mecanismo de acción

La Cefalexina, un antibiótico beta-lactámico como las penicilinas, es principalmente bactericida. Inhibe la tercera y última etapa de la síntesis de la pared celular bacteriana uniéndose preferentemente a las proteínas de unión a penicilina (penicillin-binding proteins) que se encuentran dentro de la pared celular bacteriana. Estas proteínas de unión a penicilinas son responsables de varios pasos en la síntesis de la pared celular y se encuentran en cantidades de varios cientos a varios miles de moléculas por célula bacteriana. Estas proteínas de unión a penicilinas varían entre diferentes especies bacterianas, y, por lo tanto, la actividad intrínseca de la cefalexina, así como la de las otras cefalosporinas y penicilinas contra un organismo particular depende de su capacidad para acceder a y fijarse a la PBPs. Como todos los antibióticos beta-lactámicos, la capacidad de cefalexina para interferir con la síntesis de la pared celular mediada por las PBPs, en última instancia según (Gower *et al.*, 1976) conduce a la lisis celular. Esta lisis está producida por enzimas autolíticos bacterianos presentes en la pared celular (es decir, autolisinas).

Por regla general, las cefalosporinas de primera generación son más activos contra los organismos gram-positivos que las cefalosporinas de segunda y tercera generación, pero tienen relativamente poca actividad contra especies gram-negativas. Entre los gérmenes gram-positivos se incluyen estafilococos productores o no de penicilinas (por ejemplo, *S. aureus*) y estreptococos (excepto los enterococos). Su espectro frente a bacterias gram-negativas se limita a *E. coli*, *Klebsiella* y *Proteus mirabilis* (Chen *et al.*, 2011).

La cefalexina no se recomienda para las infecciones de los tejidos blandos causadas por bacterias gram-negativas debido a las mínimas concentraciones inhibitorias relativamente altas necesarias para estos organismos y a los niveles séricos relativamente bajos obtenidos con cefalexina (Pedler *et al.*, 1985).

4.9.2.2. Farmacocinética

Gaya *et al.*, (1970) afirma que la cefalexina se administra por vía oral ya sea como cefalexina o cefalexina clorhidrato, ambas en forma de monohidratos. Ambas sales son estables frente a los ácidos, se absorben rápidamente en el tracto gastrointestinal, y presentan unos parámetros farmacocinéticos similares. A pesar de cefalexina monohidrato debe ser convertida al clorhidrato en el estómago antes de la absorción en el intestino delgado, el grado de absorción para la base de cefalexina (monohidrato) y el clorhidrato son similares.

Después de una dosis oral de 250 mg o 500 de la cefalexina, las concentraciones séricas máximas de 9 o 15-18 ug / ml, respectivamente, se logran en la primera hora, disminuyendo a 1,6 o 3,4 ug/ml, respectivamente a las 3 horas después de la dosis. Los niveles séricos máximos son ligeramente inferiores y se conseguirán más lentamente si el medicamento se toma con alimentos, pero la dosis total absorbida no se ve afectada. Aproximadamente el 15% del fármaco circulante está unida a proteínas. La cefalexina se distribuye en la mayoría de los tejidos y fluidos corporales, pero no alcanza niveles terapéuticos en el líquido cefalorraquídeo (LCR). Atraviesa la placenta (Lyons *et al.*, 1971).

El fármaco se excreta ampliamente y sin cambios en la orina a través de filtración glomerular y secreción tubular, lo que conduce a altas concentraciones urinarias. Un pequeño porcentaje se excreta en la leche. La semi-vida de eliminación es de aproximadamente 1 hora en pacientes con función renal normal. Esta semi-vida de eliminación aumenta hasta 7,5 a 14 horas en pacientes con enfermedad renal en etapa terminal (Eickhoff *et al.*, 1976).

4.10. Productos Lácteos comerciales

4.10.1. Yogurt

El yogurt es la más popular de las leches fermentadas. Se fabrica con composiciones muy distintas (contenido en grasa y extracto seco), y puede ser natural o con sustancias añadidas, como frutas, azúcar, agentes gelificantes, etc. El yogurt es un alimento obtenido de la fermentación controlada de la leche, por las acciones combinadas de cultivos de BAL, las cuales provocan un sabor láctico y aroma típico. En la actualidad se han realizado muchos estudios al yogurt y sus ingredientes, así como sus propiedades, han sido motivo de muchos estudios, tanto bromatológicos, clínicos, microbiológicos y nutricionales (Vélez *et al.*, 2001 y Tamine *et al.*, 1991).

Existen distintos tipos de yogurt, pero los más importantes son los yogures firmes o consistentes y los yogures batidos. Estos productos también pueden sufrir tratamientos después de la fermentación como el calentamiento, la concentración, desecación y liofilización. Las vitaminas más importantes contenidas en el yogurt son la vitamina A, B1, B2, B6, B12, C, D, I. Los principales minerales son el calcio, el fósforo, el potasio y el sodio.

Según Savaiano *et al.*, (1984) el yogurt preparado con leche de vaca parcialmente descremada contiene 88,50% de agua, 3,50% de proteínas, 1,80% de lípidos, 5,00% de glúcidos y un aporte energético de 49 Kcal cada 100 gramos.

La composición química del yogurt cambia según el tipo de leche utilizada (leche entera de vaca, de cabra, de oveja, o de otros animales) y según la adición de sustancias aromatizantes o de fruta. Los ingredientes y el modo de elaboración determinan los tipos de yogurt: líquidos, cremosos, desnatados, con frutas, entre otros. Los principales minerales son calcio, fósforo, potasio y sodio. El yogurt preparado con leche de vaca parcialmente descremada (o desnatada) contiene 88.50% de agua, 3.50% de proteínas, 1.80% de lípidos, 5.00% de glúcidos y un aporte energético de 49 Kcal cada 100 gramos.

Afirma Marcos (2000) que el yogurt tiene las condiciones necesarias para ser considerado como un alimento probiótico. Contiene microorganismos vivos, una parte de ellos permanece en el sistema intestinal e interactúan con la flora bacteriana.

Las bacterias presentes en el yogur y otras leches fermentadas se caracterizan por transformar mediante la fermentación algunos azúcares, principalmente la lactosa transformándose en ácidos orgánicos como el láctico y el acético (Condony *et al.*, 1998). La ingesta regular de leches fermentadas puede resultar beneficiosa para prevenir enfermedades infecciosas comunes por ingestión de patógenos.

4.10.2. Quesillo Huilense

Urrea *et al.*, (1996) define el quesillo Huilense como un queso fresco, no madurado, elaborado con leche de vaca, tiene un sabor moderadamente ácido, de consistencia semiblanda, que se constituye en un alimento, nutritivo y económico en comparación con otros quesos.

Según Jaramillo *et al.*, (2014) citado por Cortes *et al.*, (2015), el quesillo Huilense está comprendido bajo la denominación de quesos de pasta hilada, ya que tienen en común una fase particular de la tecnología del hilado, basado en la propiedad de la caseína de estirarse bajo determinadas condiciones de temperatura y acidez.

El queso representa una buena posibilidad de aprovechar las leches acidificadas en las ganaderías de alta y pequeña producción en el país; el cual según Londoño (2006) se empezó a fabricar en el Alto Magdalena, regiones del Huila y Tolima, en los últimos años se extendió por el Medio y Bajo Magdalena, Caldas, Cundinamarca, Boyacá, Antioquia, Santander y Cesar.

Es así como la importancia económica de la producción de lácteos en el país y en el departamento del Huila, junto con la complejidad de la tecnología para su producción, procesamiento y aceptación, requieren un mayor conocimiento de sus propiedades texturales, fisicoquímicas, y microbiológicas con el fin de ofrecer alimentos con aceptables niveles de calidad (Zúñiga *et al.*, 2007) citado por Cortes, *et al.*, 2016.

En la producción artesanal según Urango (2012) el queso es una masa circular con la apariencia de las arepas o puede tener una forma semicuadrada, su empaque artesanal es la hoja de plátano, y que a nivel industrial, su forma es rectangular debido al molde utilizado, obteniéndose unos bloques hasta de 5 libras. Presenta una superficie blanca y brillante y su consistencia interna es semiblanda, pero no se desbarata al frote de los dedos, su textura es cerrada sin ojos, y se observa en capas, cuando está muy fresco.

4.10.2.1. Características fisicoquímicas del queso

En la tabla 3 se presenta la composición proximal del queso huilense, de manera general corresponde a un producto de humedad intermedia, con alto contenido de materia grasa y un importante aporte proteico, su contenido de ácido láctico le imprime condiciones de alimentos ácidos, de muy buena aceptación por los consumidores.

Tabla 3. Composición química del queso huilense

Características	Valores de referencia
Humedad (%)	49-51
Materia grasa (%)	24-26
Proteína (%)	19-21
Sal (%)	1.1-1.4
Materia grasa en materia seca (%)	51
Humedad del queso desgrasado (%)	67
pH	5.2 – 5.5
Acidez (% ácido láctico)	0.7 –0.8

Fuente: Cortes *et al.*, (2015) establecido por Novoa y Rodríguez (1994)

4.10.2.1.1. pH del Quesillo

Bruschi (2000) afirma que el pH en quesos frescos determina los tipos de microorganismos que son capaces de multiplicar y regular la actividad de varias enzimas, siendo uno de los parámetros que afecta sobre todo las propiedades texturales del queso, debido a su efecto o sobre la red de proteínas (Watkinson *et al.*, 2001; Lu *et al.*, 2008). La determinación de pH es sencilla ya que sólo se requiere de un potenciómetro para tomar la medida sobre una masa homogénea de queso por dilución de la muestra en agua destilada (Gonzales, 2010) citado por E. Cortes *et al.*, 2016.

4.10.2.1.2. Acidez titulable

La acidez titulable según Londoño (2006) citado por Cortes *et al.*, (2015) se expresa como el porcentaje de ácido láctico. La acidez de los productos lácteos es debida a la fermentación de la lactosa en ácido láctico, en la que intervienen bacterias acidificadoras. Revilla (1996) citado por Moncada (2005) en sus estudios afirman que durante la fermentación de la lactosa ocurren otras fermentaciones que dan origen a olores o aromas característicos.

Para Pinho *et al.*, (2004) y Ramírez *et al.*, (2012) citado por Cortes *et al.*, 2016, la acidez, en el queso es otro factor que no sólo tiene incidencia sobre el sabor, sino también directamente en los cambios que experimenta la red de proteína del queso, teniendo ésta una correlación directa en los fenómenos de sinéresis (es decir; a mayor acidez, mayor sinéresis) y textura final.

4.10.2.1.3. Humedad

La humedad es un parámetro importante para identificar si el producto ha conservado la frescura y calidad; según la NTC 750 los quesos se clasifican según el contenido de humedad sin materia grasa en extraduro, duro, firme/semiduro y blando; además de favorecer el desarrollo microbiano, si se hablara de quesos madurados esta participa en el proceso de maduración del queso, con alto contenido de humedad maduran rápidamente, mientras que con bajo contenido la maduración se prolonga considerablemente (Rodríguez, 2007) citado por Cortes *et al.*, 2016.

4.10.2.2. Técnicas instrumentales de análisis en quesillo

4.10.2.2.1. Propiedades mecánicas de la textura del quesillo

Las propiedades mecánicas del quesillo se pueden medir a través de sus propiedades reológicas, por medio de varios métodos: técnicas de compresión uniaxial, de relajación y de compresión dinámica. La compresión uniaxial, utilizado frecuentemente en la obtención de parámetros reológicos de quesos, consiste en comprimir una muestra cilíndrica mediante un plato descendente a velocidad constante, hasta un nivel de deformación superior al del punto de fractura. La resistencia mecánica desarrollada por la muestra, en respuesta a la deformación impuesta, se registra a través de un perfil de análisis de textura (TPA).

Londoño (2006) citado por Cortes *et al.*, (2016) afirma que la medición depende de la velocidad de desplazamiento de la superficie de compresión y de la temperatura. Los parámetros texturales se evalúan con la realización de una prueba de TPA produce una curva de fuerza/tiempo característico del comportamiento de la muestra durante su doble compresión, mediante esta se obtienen siete parámetros, como se muestra en la Tabla 4.

En sus estudios Londoño (2006) concluye que según la textura se puede evaluar mediante un TPA, diseñado para permitir la evaluación instrumental de los parámetros de textura, el cual se basa en imitar la acción de las mandíbulas por medio de un texturómetro.

En la tabla 4 se muestra la descripción de los parámetros obtenidos a través del TPA

Tabla 4. Descripción de los parámetros mecánicos obtenidos a través del TPA.

Parámetro mecánico	Descripción	Forma de obtención
Dureza	Se refiere a la fuerza requerida para comprimir un producto entre los molares o entre la lengua y el paladar.	Fuerza máxima obtenida durante el primer ciclo de compresión. Unidad: gramos
Cohesión	Firmeza de las uniones internas del alimento.	Proporción positiva entre el área del segundo pick y el área del primer pick. Corresponde a $A2/A1(D)$ Unidad: adimensional
Adhesividad	Trabajo necesario para vencer la fuerza de atracción entre el alimento y una superficie.	Área de la fuerza del pick negativo, si lo hubiera, que sigue al primer pick. Corresponde a $A3$ (Anexo D) Unidad: gramos x segundo
Elasticidad	Velocidad a la cual el alimento deformado retorna a su condición original luego de remover la fuerza aplicada.	Recuperación de la muestra entre el fin del primer ciclo de compresión y el inicio del segundo ciclo de compresión. Corresponde a la longitud de d . (Anexo D) Unidad: adimensional
Masticabilidad	Representa el trabajo necesario para masticar un alimento hasta que esté listo para ser deglutido.	Producto de la dureza por la cohesión y la elasticidad. Unidad: mj

		Área de la fuerza del pick negativo, si lo hubiera, que sigue al primer pick.
Firmeza	Fuerza necesaria para provocar una deformación dada.	Corresponde a A3 (Anexo D).
		Unidad: gramos x segundo

Fuente: Adaptado de Figueroa (2006) citado por Cortes *et al.*, (2015)

4.10.2.2.2. Colorimetría.

Se ha establecido que el color es un parámetro fundamental al momento de determinar la madurez o evolución de un alimento en el tiempo, una tecnología avanzada para medir el color es el colorímetro triestímulo, el cual usa sensores que simulan el modo en que el ojo humano ve el color. Según Angón *et al.*, (2006) citado por Cortes *et al.*, (2016) el colorímetro expresa el color en forma numérica y cuantifica la diferencia de color entre un estándar y una muestra de producción.

Un colorímetro está compuesto por: una fuente de luz, tres filtros (correspondientes al rojo, verde y azul) y un detector, por lo que puede ser considerado como una imitación directa del mecanismo de percepción del sistema visual humano. Su funcionamiento se basa en que al incidir la fuente de luz sobre la muestra en un ángulo de 45°, existe una reflexión difusa que atraviesa los tres filtros X, Y, Z y luego, es medida por la fotocélula o detector.

El procedimiento para medir color en los alimentos con el colorímetro Konika Minolta, serie CR-410, consiste en colocar el equipo en contacto directo sobre la muestra, como se observa en la figura 11. Definida el área de interés, se procede a accionar el botón de medición, el equipo emite una luz de xenón pulsante y las longitudes de onda emitidas por la muestra, son transcritas por el colorímetro a valores del espacio de color seleccionado, como L^* a^* b^* , la coordenada L^* describe luminosidad, y las coordenadas a^* y b^* describen tonos entre rojo-verde y amarillo-azul respectivamente. Según MacDougall (2002) citado por Wenceslao *et al.*, (2012) las mejoras en CIELab se deben a la transformación no lineal de la raíz cúbica de los valores triestímulo, los cuales se aproximan más al espacio visual de las muestras de color del sistema (Munsell, 2002).

Las variaciones de color de Quesillo son debidas principalmente al suero de leche inicial, composición, ácido usado en la producción de queso, la microflora indígena, la tecnología de fabricación, el tiempo de estiramiento, el tiempo y la temperatura de almacenamiento y embalaje.

En Colombia, Ramírez y Rodríguez (2012) citado por Cortes *et al.*, (2016), estudiaron el color en quesillo y los parámetros de color fueron obtenidos usando el espacio CIELab, donde L^*

corresponde a ligereza / oscuridad (cambio gamas de color del oscuro 0% a 100% de luz), a^* verde/rojo cromaticidad (de verde a rojo 60 -60), y b^* de cromaticidad azul/amarillo (de azul a amarillo 60 -60). Se promedió cada parámetro para cada uno de los quesillos y se calcularon C^* H^* , ΔE^* y los índices WI (Índice de blancura) y YI (Índice de amarillamiento); además, se calcularon los valores promedio de L^* , a^* , b^* .

Los atributos de color croma métrico o saturación (C^*), matiz, tonalidad o tono (H^*), se calcularon a partir de las ecuaciones 1 y 2; y los índices de color WI y YI fueron determinados según (Boun *et al.*, 1991) citado por Cortes *et al.*, 2016, en la ecuación 3 y (Ramírez, 2010) citado por Cortes *et al.*, (2016) en la ecuación 4.

$$C^* = \sqrt{(a^*)^2 + (b^*)^2} \quad \text{Ecuación 1.}$$

$$H^* = \arctg \left[\frac{b^*}{a^*} \right] \quad \text{Ecuación 2.}$$

$$WI = 100 - \sqrt{(100 - L^*)^2 + a^{*2} + b^{*2}} \quad \text{Ecuación 3.}$$

$$YI = 142.86 \left[\frac{b^*}{L^*} \right] \quad \text{Ecuación 4.}$$

4.10.2.2.3. Actividad de agua (A_w)

La actividad de agua se define como la relación entre la presión de vapor de agua de un producto y la presión de vapor del agua pura, a la misma temperatura, por tanto, la actividad de agua se usa para caracterizar el estado de equilibrio del agua en una matriz alimenticia que iguala la presión de vapor relativa de equilibrio (PVR) del agua en la atmosfera circundante. Para alcanzar el equilibrio, habrá una transferencia de masa de agua del alimento al entorno o viceversa hasta llegar a dicho equilibrio, donde los valores de A_w deben ser iguales en ambas fases a temperatura y presión constante (Ross, 1975) citado por Ramirez *et al.*, (2016).

Mientras más alta sea la A_w y más se acerque a 1.0, que es la del agua pura, mayor será su inestabilidad. Por el contrario, los alimentos estables a temperatura ambiente (excepto los tratados térmicamente y comercialmente estériles, como los enlatados), tienen A_w baja. Se ha demostrado que la A_w es un factor clave para el crecimiento microbiano, producción de toxinas y resistencia al calor de los microorganismos. En general, el límite inferior de la actividad de agua para el crecimiento microbiano es 0.90 de la mayoría de las bacterias, 0,87 para la mayoría de las levaduras y 0.80 para la mayoría de los hongos. Es posible que un alimento tenga dos componentes, uno con 15% y otro con 25% de humedad y la transferencia se haga del menor al mayor debido a sus distintas A_w y no con base en sus humedades (Badui, 2006) citado por Ramirez *et al.*, (2016).

5. MATERIALES Y METODOS

5.1 Descripción y selección de la muestra

Se trabajó con dos muestras de productos derivados de la industria de lácteos del Departamento del Huila en Colombia, que corresponden a muestras de queso y yogurt elaborados y distribuidos de forma artesanal y semi-industrial. Artesanalmente las muestras corresponden a muestras de yogurt elaborado en el Municipio del Caguán (Ya), y quesillos de 250 g fabricados en el Municipio de Hobo (Qa) (Figura 1 y 2). Semi-Industrialmente las muestras corresponden a yogurt fabricado por una empresa regional (Yc), y quesillos de 250 g fabricados por una reconocida empresa Huilense (Qc) (Figura 1 y 2). Todas las muestras se obtuvieron por triplicado y fueron transportadas el mismo día de su elaboración, en termos refrigerados hasta el laboratorio de microbiología de alimentos de la Facultad de Ingeniería de la Universidad Surcolombiana, siendo allí donde se realizaron las pruebas físicas, químicas y microbiológicas correspondientes.



Figura 1. Muestras de queso artesanal (Qa) y semi-industrial (Qc)



Figura 2. Muestras de Yogurt artesanal (Ya) y semi-industrial (Yc)

5.2. Analisis fisicoquimico de quesillo y yogurt

5.2.1. Determinación de humedad en quesillo

Se determinó el contenido de humedad de las muestras de quesillo mediante el método gravimétrico indirecto (García *et al.*, 2012) citado por Cortes *et al.*, (2016). Donde tres recipientes con arena de mar y varilla de vidrio, se secaron en estufa (HUMBOLDT MFG. CO) a 100 ± 2 °C durante 24 horas, las cuales fueron atemperadas en un desecador para luego ser pesadas en una balanza analítica, valor establecido como m_0 en g. Posteriormente, se añadieron 10 g de quesillo homogenizando la muestra con la ayuda de la varilla y la arena, luego se pesó nuevamente el recipiente con la arena, la varilla y la muestra, tomando este valor como m_1 (Figura 3). Las muestras, se mantuvieron en estufa a 103 ± 2 °C durante 24 h, pasado este tiempo, los recipientes se colocaron en desecador y se tomó su peso (m_2). El porcentaje de humedad expresado en g de agua por 100 g de muestra, se calculó mediante la ecuación 5:

$$\%H = \frac{m_1 - m_2}{m_1 - m_0} * 100$$

Ecuación N°5



Figura 3. Determinación del contenido de humedad en muestras de quesillo.

5.2.2. pH en quesillo y yogurt

La determinación de pH en quesillo se realizó de acuerdo a Gonzales (2010) citado por Cortes *et al.*, (2016). Tomando una muestra de 1 g realizando un corte desde la corteza hasta el centro de la pieza, diluyéndose en 10 ml de agua destilada con la ayuda de un equipo homogenizador o de dispersión marca IKA Tipo T18 basic ULTRA-TURRAX y posteriormente se determinó la lectura (Figura 5) con potenciómetro (WTW -330) previamente calibrado de acuerdo a la norma (AOAC-981.12-1997) (Figura 4).



figura 4. Calibración del potenciómetro

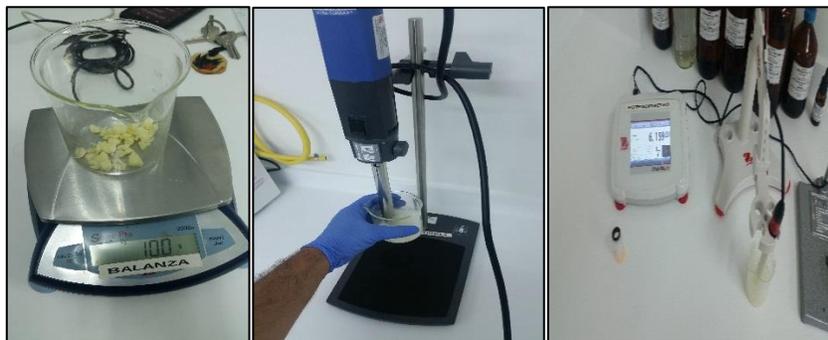


Figura 5. Determinación de pH en muestras de queso

La determinación de pH en Yogurt se realizó con el potenciómetro (WTW -330) previamente calibrado. El valor se obtuvo introduciendo directamente el electrodo en la muestra (figura 6).



Figura 6. Determinación de pH en muestras de yogurt

5.2.3. Acidez titulable en queso y yogurt

La prueba de acidez titulable se realizó de acuerdo a Meyer *et al.*, (1982), citado por Cortes *et al.*, (2015). Se tomó 10 gramos de queso y se le añadió 100 mL de agua destilada. La mezcla se homogenizó con la ayuda de un equipo homogenizador o de dispersión marca IKA Tipo T18 basic ULTRA-TURRAX y se filtró la solución, se tomaron 50 mL del filtrado, se añadió 5 gotas de fenolftaleína y se tituló con hidróxido de sodio 0.1 N (Figura 7), de acuerdo a la norma (AOAC-942.15-1997); la acidez se expresó como porcentaje de ácido láctico, teniendo en cuenta la ecuación 6:

$$\% \text{ Acidez Titu.} = \frac{(\text{ml NaOH gastado}) * (\text{Normalidad base}) * (\text{meq de ácido predom})}{\text{Volumen de la muestra}}$$

Ecuación 6: % Acidez Titulable



Figura 7. Determinación acidez titulable en muestras de quesoillo

La acidez titulable en yogurt se determinó de acuerdo al método 16.023 (A.O.A.C., 1984). Basado en una titulación con NaOH 0.1 N. Se colocaron aproximadamente 5 g de muestra en un matraz erlenmeyer de 250 mL, posteriormente se añadió agua destilada y se agitó vigorosamente, se incorporaron tres gotas de fenolftaleína al 1% y se tituló con NaOH 0.1 N, hasta obtener una coloración rosada (Figura 8). La acidez se expresó como porcentaje de ácido láctico, teniendo en cuenta la Ecuación 6.

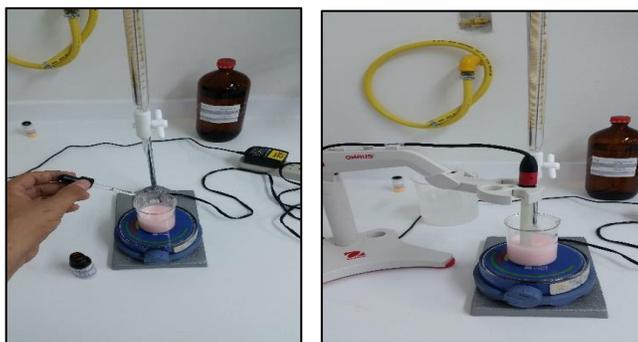


Figura 8. Determinación de acidez titulable en muestras de yogurt

5.2.4. Textura en quesoillo

Se realizaron ensayos de TPA (figura 9), de acuerdo a la metodología adaptada por Cortes *et al.*, (2016), con una sonda cilíndrica TA4/100 acrílico transparente de 38.1 mm de diámetro y una celda de carga de 10 kg comprimiendo dos veces consecutivas la muestra, a una velocidad de 0.8 mm/s con una carga de activación de 5 g y un 50% de deformación sobre bloques de quesoillo de 3x3 cm de lado con altura variada dependiendo del grosor del quesoillo a analizar;

también se realizaron pruebas de compresión simple utilizando sonda esférica TA18 (Figura 10) de diámetro de 6.35 mm sobre los bloques de queso ya mencionados, se utilizó un Analizador de Textura BROOKFIELD CT3.



Figura 9. Análisis de perfil de textura de muestras de queso.

Los parámetros de cada prueba se basó a lo expuesto por Zúñiga *et al.*, (2007) citado por Cortes *et al.*, (2016) con modificaciones para su aplicación en queso como muestra la Tabla 5.

Tabla 5. Parámetros para determinar el TPA y para la prueba de compresión simple

Tipo de test: TPA	Tipo de test: Compresión
Objetivo: 50.0%	Objetivo: 50.0%
Esperar t.: 0 s	Esperar t.: 0 s
Carga Activación: 5 g	Carga Activación: 5 g
Vel. Test: 0.8 mm/s	Vel. Test: 0.8 mm/s
Velocidad Vuelta: 0.8 mm/s	Velocidad Vuelta: 0.8 mm/s
Contador ciclos: 2	Contador ciclos: 1
Tpo. Recuperación: 0 s	Tpo. Recuperación: 0 s
Fr. Muestreo: 10 puntos/seg	Fr. Muestreo: 10 puntos/seg
Sonda: TA4/100	Sonda: TA18
Elemento: TA-BT-KI	Elemento: TA-BT-KI
Mismo activador: Exacto	Mismo activador: Falso
Velocidad Pretest: 2 mm/s	Velocidad Pretest: 2 mm/s
Celda Carga: 10000g	Celda Carga: 10000g

Fuente: Adaptado de E. Cortes *et al.*, (2016)

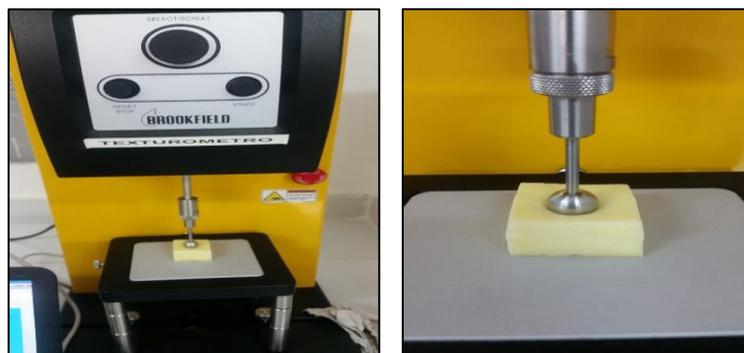


Figura 10. Ensayos de compresión simple en muestras de queso

5.2.5. Color en queso y yogurt

Se determinó de acuerdo a la metodología planteada por Ramírez *et al.*, (2012) citado por Cortes *et al.*, (2016). Se realizó sobre la superficie del queso como se muestra en la figura 11; se caracterizó el color utilizando los parámetros L^* , a^* y b^* del sistema CIE (Comisión Internationaled Eclairage) y los parámetros de croma métrico (C^*), tonalidad (H^*), diferencia de color (ΔE), índice de blancura (WI) e índice de amarillo (YI), se utilizó el Colorímetro Konica Minolta CR-410 N.J. USA, (Figura 11).



Figura 11. Determinación de coordenadas de color CIELab en queso

Para yogurt se determinó el color a través de un colorímetro Konica Minolta CR-410 (Figura 12), N.J. USA. Midiéndose la reflectancia de cada muestra, antes de medir el color de los sistemas el colorímetro se calibró con 1 mosaico (blanco), una vez calibrado se colocó aproximadamente 50 mL de muestra en un recipiente de cuarzo transparente que permitió el paso de la luz, obteniendo los parámetros L^* , a^* y b^* del sistema CIE (Comisión Internationaled Eclairage) y los parámetros de croma métrico (C^*), tonalidad (H^*), diferencia de color (ΔE), índice de blancura (WI) e índice de amarillo (YI).



Figura 12. Determinación de coordenadas de color CIELab en yogurt

5.2.6. Actividad de agua en queso

La actividad de agua en quesillos se midió con un higrómetro de punto de rocío AquaLab (Vapor sorption Analyzer) de Decagon Devices, Inc., WA. (Figura 13) calibrado con soluciones saturadas de NaCl, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, KCl, BaCl_2 ; como lo describen Roa *et al.*, (1991). Se trabajó con muestras de 1 a 5 gramos por cada ensayo a 25°C como se observa en la figura 13, las muestras de queso se dividieron en porciones pequeñas para facilitar la manipulación en las taras (Ho, 2016), se realizaron ensayos por triplicado para cada muestra.



Figura 13. Determinación de actividad de agua en muestras de queso

5.2.7. Viscosidad en yogurt

Para determinar los parámetros reológicos de las muestras de yogurt se empleó el viscosímetro digital Brookfield DV-I (Brookfield Engineering Laboratories Inc.) (Figura 14), con el que se tomaron mediciones a las muestras a diferentes velocidades de 0.1 a 1 rpm en el día 1 de elaboración, empleando para cada medición una cantidad de 6mL y la sonda SC4-31 durante 30 segundos.

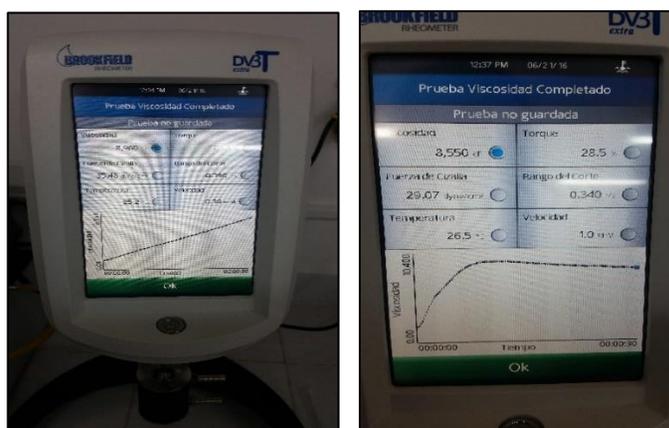


Figura 14. Determinación de viscosidad en muestras de yogurt

5.2.8 Sólidos solubles (°Brix) en yogurt

Para el cálculo de los sólidos solubles de las muestras de yogurt, se determinó con el refractómetro digital (ATAGO PR-201a) (figura 15), depositando 3 gotas de muestra en el sensor infrarrojo de tal manera que cubriese toda su superficie. Su expresión se da en °Brix.



Figura 15. Determinación de sólidos solubles en yogurt

5.3. Aislamiento BAL

5.3.1. Aislamiento de BAL provenientes de Qc y Qa

Se tomó una muestra de queso de 10 g y se homogenizó en 90 mL de solución estéril de caldo MRS (bacterias lácticas) (Dibico) (Anexo A), para luego efectuarse diluciones seriadas. Se vertió el medio en placa, luego de estar sólido se sembró sobre la superficie en masa alícuotas de 1 mL de las diluciones en medio de cultivo selectivo agar MRS (MERCK) por triplicado (Figura 16), luego fueron incubados durante 48h a 37°C en condiciones de aerobiosis en la incubadora de precisión digital modelo (Heratherm IMH60-S) marca Thermo SCIENTIFIC. Transcurrido el tiempo se seleccionaron las colonias más representativas según color, tamaño y textura para luego realizar un aislamiento puro de cada una de ellas en agar MRS (Figura 17), efectuándose la siembra en masa e incubadas a 37°C durante 24 horas.



Figura 16. Siembra de BAL de queso (Qc, Qa) en agar s MRS

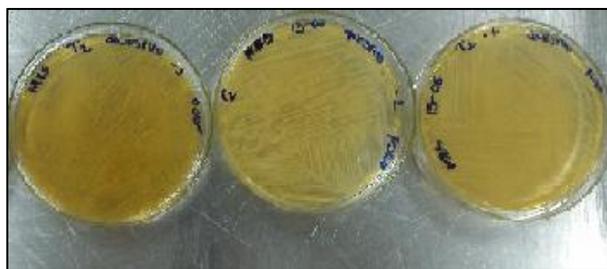


Figura 17. BAL aisladas de queso (Qc, Qa)

5.3.2. Aislamiento de BAL provenientes de Yc y Ya.

Se tomó una muestra de 1mL y se homogenizó en 9 mL de solución estéril de caldo MRS (bacterias lácticas) (Dibico) (Anexo A), para luego efectuarse diluciones seriadas. Se vertió el medio en placa, luego de estar sólido se sembró sobre la superficie en masa alícuotas de 0.1 mL de las diluciones en medio de cultivo selectivo agar MRS (MERCK) por triplicado (Figura 18), luego fueron incubados durante 48h a 37°C en condiciones de aerobiosis en la incubadora de precisión digital modelo (Heratherm IMH60-S) marca Thermo SCIENTIFIC. Transcurrido el tiempo se seleccionaron las colonias más representativas según color, tamaño y textura para luego realizar un aislamiento puro de cada una de ellas en agar MRS, efectuándose la siembra en masa e incubadas a 37°C durante 24 horas.



Figura 18. Aislamiento de BAL de muestras de yogurt (Yc, Ya)

5.4 Recuento e identificación de BAL.

5.4.1 Recuento de BAL.

A partir de la siembra realizada de cada producto a 37°C durante 48 Horas, se realizó un recuento de las BAL de los dos productos, que crecieron en cada una de las placas en sus diferentes diluciones (Figura 19 y 20), luego se calculó el crecimiento de BAL expresado en Log UFC/g.



Figura 19. Recuento de BAL de yogurt (Yc, Ya)

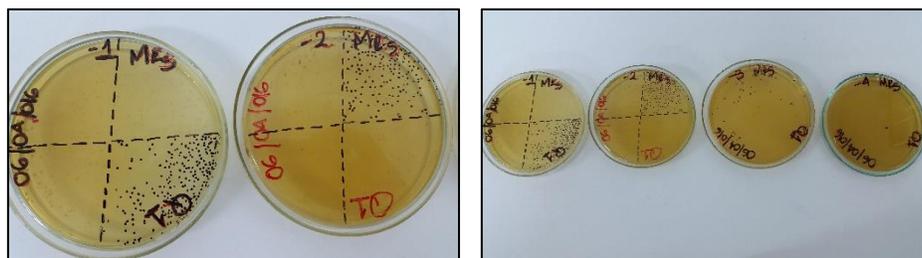


Figura 20. Recuento de BAL de queso (Qc, Qa)

5.4.2. Tinción GRAM.

Se realizó tinción a las colonias aisladas más representativas según tamaño, color y textura. De esta manera, se vertió una gota de agua destilada sobre un portaobjeto, a la cual se depositó con un asa de platino una pequeña parte de la colonia a examinar, extendiéndola suavemente. Luego, se dejó secar la preparación con calor suave y se fijó la preparación pasando el portaobjetos 3 veces por la llama del mechero. Luego, se cubrió o tiñó con violeta (Figura 21) de genciana (Mollabs) por 30 s, después se reemplazó el colorante por Lugol (Mollabs), dejándolo actuar 1 minuto, posteriormente se lavó con agua, se decoloró con alcohol por 30 s, se lavó con agua destilada, se tiñó con Fuchsin (Mollabs) durante 3 min, se lavó y se secó para luego ser observado en el microscopio (OLYMPUS CH-2).



Figura 21. Tinción Gram de BAL

5.4.3. Prueba de catalasa y oxidasa.

Mediante un asa de siembra se transfirió células de las cepas BAL a evaluar a un portaobjetos totalmente estéril, y posteriormente se añadieron dos gotas de agua oxigenada al 3% (Figura 22). La presencia de gas o efervescencia significa positiva para catalasa. El procedimiento para evaluación de oxidasa consistió en impregnar tiras de papel que contienen reactivo para-amino-N-dimetil-anilina, el cual al dar una coloración azul indicara positivo para oxidasa.



Figura 22. Prueba de catalasa a las BAL

5.4.4. Movilidad de BAL.

Mediante tubos de ensayo dispuestos con medio de cultivo SIM (Anexo A), se realizó una siembra por punción profunda usando aguja de inoculación recta, abarcando un tercio de la profundidad del medio de cultivo desde la superficie, llevando a incubación por 24 horas a 37 °C (Figura 23). Para movilidad crecimiento más allá de la línea de punzada indicará un resultado positivo.



Figura 23. Prueba de Movilidad de las BAL

5.4.5. Prueba de Citrato de Simmons

Mediante tubos de ensayo dispuestos con medio de cultivo Citrato de Simmons (Anexo A), en forma de pico de flauta, se realizó una siembra en la superficie, llevando a incubación por 24

horas a 37 °C (Figura 24). Los resultados se interpretaron positivos si en el pico de flauta hay un crecimiento con un cambio de coloración del medio de cultivo a azul intenso.



Figura 24. Prueba de Citrato como única fuente de Carbono

Para esta prueba se debe tener en cuenta que el inoculó debe ser liviano, pues si éste es demasiado grande, compuestos orgánicos preformados dentro de la pared celular de las bacterias que están muriendo pueden liberar suficiente carbono y nitrógeno como para dar un resultado falso-positivo.

5.4.6. Prueba de coagulación de la leche por las BAL

Se siguió la metodología propuesta por López (2010) a partir de leche comercial previamente esterilizada en autoclave, se tomaron 10 mL, a pH normal de 6,5 y se inocularon con 1 mL de cada una de las cepas ensayadas provenientes de un cultivo de 24 horas a 37°C en agar MRS, y se incubaron a la misma temperatura monitoreando la formación o no de un coagulo uniforme.

5.5. Evaluación antimicrobiana.

5.5.1. Selección y activación de los patógenos.

Las cepas de BAL aisladas fueron evaluadas frente a dos cepas de patógenos de 2 orígenes diferentes (Tabla 6) aislados por Pérez *et al.*, (2015). Para la activación de éstos patógenos se sembraron en estría directamente con el hisopo de conservación cada uno de ellos en medios selectivos ENDO para *Klebsiella* y XLD para *Escherichia coli*, (Figura 25) incubados durante 24 horas a 37°C.

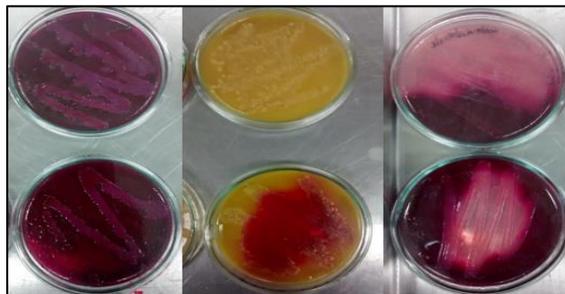


Figura 25. Crecimiento de *Escherichia coli* en agar XLD y de *Klebsiella* en agar ENDO

Tabla 6. Origen del aislamiento de las cepas de patógeno *Escherichia coli* y *Klebsiella*.

PATÓGENO	ORIGEN ASILAMIENTO
<i>Escherichia coli</i>	Venta ambulante de arepas (E.V.A.A)
	Restaurante Universidad Surcolombiana sede salud (E.R.S.)
<i>Klebsiella</i>	Salpicón del restaurante Universitario sede Salud (K.R.S.S)
	Venta ambulante de ají (K.V.A.A)

5.5.2. Método de discos, presencia de células BAL.

Se realizó la evaluación antimicrobiana en presencia de células BAL, para ello se empleó la técnica de discos según Yuan (2006) con algunas modificaciones. Las cepas de cada patógeno activados se sembraron en placas de Aa Plate Count (PC) con ayuda de un asa estéril y tomando solo una pequeña porción de ésta. De los cultivos puros de BAL a 24 horas en agar MRS obtenidos del aislamiento, se obtuvieron discos de 8 mm de diámetro cortándolos directamente con un sacabocados estéril. Los discos se depositaron sobre la placa de agar PC donde previamente se había sembrado ya los patógenos (Figura 26). Las placas se incubaron a 37°C durante 48 horas, transcurrido el tiempo se midió los halos de inhibición. Este procedimiento se realizó por triplicado para cada una de las BAL.



Figura 26. Evaluación antimicrobiana, método de discos (presencia de células).

5.5.3. Método del sobrenadante en pocillos, Ausencia de células BAL.

Este método se utilizó para evaluar la inhibición de los patógenos debido a los productos generados por las BAL y en ausencia de las células lácticas Yuan (2006). A partir de un cultivo de 24 horas de cada cepa láctica en agar MRS, se inoculó una alícuota en tubos de 10 ml de caldo MRS que se incubó a 37°C en condiciones de aerobiosis. Después de 24 horas, se tomó una alícuota de 2 mL del cultivo líquido, que se centrifugó a 10.000 rpm, durante 10 minutos. Con el propósito de eliminar las células, el sobrenadante obtenido se esterilizó mediante el uso de filtros con membrana de nitrocelulosa y 0.22 µm de tamaño de poro

(Milipore, Bedford, MA). Los ensayos con sobrenadante se realizaron a pH a 4.5 y a pH 7 ajustando con NaOH 1N para cada BAL, por triplicado (Figura 27).



Figura 27. Evaluación antimicrobiana, método del sobrenadante en pocillos (Ausencia de células)

5.6. Antibiograma.

Se analizaron los perfiles de susceptibilidad a antibióticos de BAL por el método de difusión en disco (Bauer *et al.*, 1966). Se depositó en la superficie de agar (MRS) donde previamente se había sembrado en masa cada una de las BAL, discos de papel secante impregnados con los dos antibióticos evaluados; Sulfametoxazol (80 mg / 5mL) y Cefalexina (250 mg / 5mL), transcurridas 18-24 horas de incubación a 37°C. Se midieron los diámetros de inhibición. Los ensayos se realizaron por duplicado (Figura 28).



Figura 28. Antibiograma de BAL frente a cefalexina y sulfametazaxol

5.7. Análisis estadístico

El análisis estadístico se hizo con el empleo del programa informático StatGraphics plus 5.1. Para Windows (Manugistics, Inc., Rockville MD, USA.). Se realizó un análisis de varianza simple (ANOVA) para los datos de inhibición en cada uno de los tratamientos y entre tratamientos, el cual efectuó varios tests y gráficos para comparar los valores medios entre los diámetros de inhibición para los tres tratamientos. En caso de presentarse valores atípicos se elige el test no paramétrico de Kruskal-Wallis que compara las medianas en lugar de las medias. Las diferencias entre medias o medianas fueron consideradas significativas cuando $p < 0.05$.

6. RESULTADOS Y DISCUSION

6.1. Análisis fisicoquímico del quesoillo

6.1.1. pH, % acidez titulable y contenido de humedad en % del Quesillo.

Tabla 7. Caracterización fisicoquímica de Quesillo (Qa y Qc)

PARÁMETROS	(Qa)	(Qc)
pH	5.798	6.206
Acidez titulable (% A. láctico)	0.255	0.135
Contenido de humedad (%)	49.242	45.544

En la Tabla 7. se muestra las características iniciales del quesoillo elaborado y distribuido artesanal y semi-industrialmente; se puede observar un pH ligeramente ácido para ambas muestras, los valores de humedad obtenidos resultaron más elevados (43-50%) que los reportados para queso fresco (Ramírez *et al.*, 2012); en general, la caracterización inicial encontrada para estas muestras de quesoillo recién fabricado, presenta variación con respecto a los reportados por Cortes *et al.*, (2015) para quesoillo Huilense y por Olszewski *et al.*, (2007) para quesoillo Argentino.

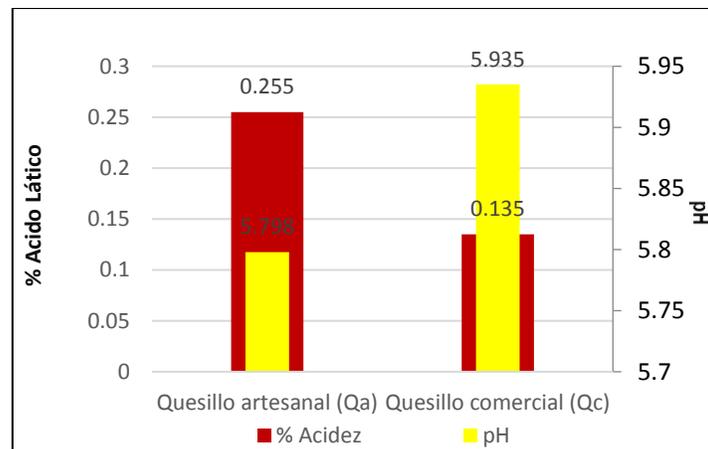


Figura 29. Valores promedios de acidez y pH en quesoillos (QA, Qc).

Se observa en la Figura 29 que a menor pH (5.798) mayor acidez (0.255% de A.L) el cual fue reportado por (Qa), y que a mayor valor de pH (6.206), el valor de acidez disminuyó (0.135% de A.L), en (Qc), guardando una relación inversa entre las dos variables. La diferencia en valores de acidez y pH de cada producto dependen de la temperatura ambiente y del tiempo de acidificación que se da más rápido en la ciudad de Neiva, debido a que las bacterias descomponen más rápido el sustrato a temperaturas mayores a 35 °C. Según Castillo (2001), los quesoillos presentan valores de pH 5.3 y acidez de 0.91 más o menos 0.07; lo cual son cercanos a los rangos de pH reportados en éste trabajo (5.798 para Qa y 5.935 para Qc)

mientras que los valores de % acidez de los quesillos evaluados están por debajo (0.255-0.135 % A.L).

En una investigación realizada por Maldonado y Llanca (2008), en quesos de mano venezolanos se encontró que el pH fue de 4.51 y la acidez de 0.76, los valores de pH y acidez están fuera de los rangos obtenidos en esta investigación.

Bennik (1999) reportó para quesos pH con rangos de 4.90 a 5.85, en su trabajo de bacterias acidolacticas para el control del crecimiento de *Listeria*, los cuales están en el rango de los valores de pH obtenidos en esta investigación para Qa. Por otra parte, Jay (2000), obtuvo en acidez valores de 0.47 a 0.53% para quesos, reportados en su libro *Modern Food Microbiology*, Maryland, estando muy por encima de los valores reportados por los quesillos (Qa y Qc) del departamento del Huila.

En general, la humedad de los quesillos elaborados (Qa, Qc), están en un rango elevado entre 45 y 50% como se observa en la Tabla 7, lo que permite clasificarlos como quesillos frescos que según su consistencia se clasifican en quesos blandos, dado que tienen una humedad mayor del 45 % (Ramírez *et al*, 2010).

6.1.2. Actividad de agua en quesillos (Qa y Qc)

Tras la fabricación, del día 1, las muestras de quesos analizados poseen una $A_w > 0,970$ (Figura 30), como era de esperar en quesos que no han madurado. La A_w en el queso es un factor determinante del crecimiento microbiano y de las transformaciones enzimáticas y químicas; además de contribuir al desarrollo de los caracteres organolépticos e incluso reológicos. En la tabla 8 se muestran los valores tomados para cada muestra de queso a temperatura específica, por triplicado.



Figura 30. Medición de A_w en quesillos

Tabla 8. Valores de A_w del quesoillo

Muestra	A_w	Temperatura (°C)
	0.975	23.81
Qc	0.979	24.58
	0.960	25.43
	0.974	25.10
Qa	0.976	24.79
	0.976	24.28

Los valores de actividad en promedio fueron de 0.971 a 24.6°C para Qc y 0.975 a 24.7°C para Qa, siendo uno de los mejores valores de éste parámetro para el crecimiento bacteriano (0.97-0.99), de modo que el quesoillo es potencialmente peligroso para el crecimiento de patógenos, por ello las técnicas de conservación y almacenamiento deben ser las adecuadas para mantener inocuidad en el producto.

6.1.3. Análisis de textura y compresión simple

Tabla 9. Análisis de textura y compresión simple de Quesillo (Qa y Qc)

Muestra	Dureza (g)	Cohesividad	Adhesividad (mj)	Elasticidad (mm)	Firmeza (g)	Masticabilidad (mj)
Qa	5249	0.63	1.1	10.34	3308	335.4
Qc	6472	0.64	1.9	9.57	4131	387.7

En la tabla 9 se muestran los valores promedios de dureza, cohesividad, adhesividad, elasticidad, firmeza y masticabilidad de las dos muestras de queso en estudio (Qa y Qc). Los valores de dureza, cohesividad, adhesividad, firmeza y masticabilidad son mayores en las muestras de queso elaborado y distribuido semi-industrialmente, mostrando valores de dureza superiores (6472 g) pues su contenido de agua en esta muestra fue menor respecto a la otra, y al haber menor cantidad de agua y un aumento de hidrólisis en la caseína, la consistencia (firmeza) es mucho mayor y por ello la dureza incrementa. Según Verdalet, (1998) esto podría deberse al tamaño de las micelas y concentración de la caseína, pues en sus investigaciones con quesos concluye que el tiempo de coagulación es más largo cuanto menor es el diámetro de las micelas brindado por su composición y sus contenidos de k-caseína y fosfato cálcico coloidal que son función de sus dimensiones. La masticabilidad es el producto multiplicativo de la elasticidad por la cohesión y la dureza. Representa la energía requerida para masticar un alimento hasta que esté listo para ser deglutido, según la tabla 9 el quesoillo Qc requiere de

más energía para masticarlo, esto debido a que la dureza y la cohesión aumentan en la misma proporción.

Los valores de cohesividad encontrados para el queso elaborado semi-industrialmente, están del mismo orden de los reportados por García *et al.*, (2014); esto no se presentó para los quesillos elaborados y empacados artesanalmente, esto se puede deber según Muller, (1997) al aumento de la elasticidad del producto aumentando directamente la resistencia a la deformación del alimento por la flexibilidad de los enlaces internos, por lo que es de esperar que aumente la cohesividad (Muller, 1997).

6.1.4. Colorimetría en muestras de queso (Qa y Qc)

El color de los alimentos es uno de los mayores atributos que afecta la percepción de la calidad por parte de los consumidores y también es una potente herramienta para el control de calidad y mercadeo. El color que se observa en el queso es una combinación de muchos factores (Ramírez *et al.*, 2012). En la tabla 10 se muestra los parámetros experimentales encontrados con el colorímetro Konica minolta CR-410 y los parámetros C* y H* calculados a partir de las coordenadas CIElab, como era de esperar, todos los quesos se caracterizaron por altos valores de luminosidad (91.98 para Qa, 88.95 para Qc) y tono ligeramente amarillo.

Tabla 10. Coordenadas CIElab del color de muestras de queso (Qa, Qc)

Muestra	L	a	b	C	H	YI	WI
Qa	91.98	-4.74	31.53	31.88	81.45	48.97	67.12
Qc	88.95	-4.01	29.36	29.63	82.22	47.15	68.37

De acuerdo a las coordenadas de CIElab, en el espacio del color, se infiere que las muestras de queso (Qa y Qc) presentan un ángulo de tono del croma en la zona amarilla.

Las dos muestras de quesillos (Qa, Qc) son de diferente origen y empaque, pero mantienen rangos de color similar como se observa en la tabla 10. También es posible observar en ella que este tipo de queso se encuentra en el sector amarillo (+b*), con ligeros tonos de verde (-a*), H * mayor que 80° y C* mayor que 20 como se presentó en el trabajo de Ramirez *et al.*, (2012).

6.2. Análisis fisicoquímico del yogurt

6.2.1. pH, % Acidez titulable y sólidos solubles del yogurt.

Tabla 11. Caracterización de las muestras de yogurt

PARÁMETROS	(Ya)	(Yc)
pH	4.60	3.905
Acidez titulable (% A. láctico)	0.890	1.01
Sólidos solubles (°Brix)	17.60	14.40

El pH y la acidez titulable (% ácido láctico) de (Ya, Yc) fueron 4,60; 3,905 y 0,890; 1,01; respectivamente (tabla 11); valores aceptables para comercialización; dado que los valores de acidez titulable están dentro del rango establecido por la norma NTP: 202.192. 2014 (INDECOPI-PERÚ, 2014), de 0,6 a 1,5%, para la acidez del yogurt de leche de vaca. Asimismo, otras normas como CODEX STAN 243-2003 (FAO, 2003) y NOM-181-SCFI-2010 (DGN MEXICO, 2010) para yogurt de leche de vaca, señalan una acidez mínima de 0,6% y de 0,5%, respectivamente; y al ser el pH una medida influenciada por la acidez, se puede afirmar que los valores de pH medidos son adecuados, además son similares a los valores reportados por Briceño *et al.*, (2001) y Ramírez (2007).

Los valores iniciales de pH (4,60 para Ya - 3.905 para Yc) para las muestras de Yogurt son similares a los reportados en este tipo de producto, por otros autores (Xanthopoulos *et al.*, 2001; Blanco *et al.*, 2006; Pérez, 2005; De Oliveira *et al.*, 2005 y Maragkoudakis *et al.*, 2006), quienes señalan que el pH característico del yogurt está entre 3,8 y 4,5.

Schimidt *et al.*, (2012) señala que el rango de pH entre 4,0 y 4,6 se considera más cercano al ideal para yogurt de leche de vaca, ya que el producto en este intervalo de pH no presenta un sabor demasiado amargo o agrio, en los resultados de ésta investigación sólo las muestras (Ya) están dentro del rango, debido a que en la elaboración de este producto su fermentación se detuvo cuando el pH se encontraba en éstos valores y con un % de acidez titulable de 0.70 a 0.80.

La muestra de yogurt elaborada y distribuida de manera artesanal presentó mayor cantidad de sólidos solubles (17.60°Brix), respecto a la semi-industrial (14.40°Brix), esto se debe a la adición directa de pulpa de fruta (fresa) la cual estaba en la muestra Ya en forma de grandes pedazos, confiriéndole mayores sólidos solubles al producto final. Los °Brix en la muestra semi-industrial fueron menores, pudiéndose deber según Adolfsson *et al.*, (2004), a que en el primer día de elaboración durante su refrigeración tanto los cultivos iniciadores como los microorganismos resistentes al tratamiento térmico después de la fabricación del yogurt, continuaron utilizando los azúcares presentes del medio, para cubrir sus necesidades energéticas por vías diferentes a través de la fermentación.

6.2.2. Viscosidad

En la tabla 12 se muestran los resultados de la prueba de viscosidad para las muestras de yogurt (Ya y Yc). Todas las pruebas se realizaron a 1 rpm a temperatura ambiente, y la viscosidad se expresó en unidades de CP.

Se evidencia que las muestras de yogurt fabricados y distribuidos artesanalmente presentan mayor viscosidad (1490 CP aprox) respecto a las muestras de yogurt semi-industrial, esto se puede deber a la hidratación de las pectinas abundantes en la fresa, estando esta fruta presente en esta muestra en gran cantidad confiriendo un aumento de éste parámetro evaluado (Karagul *et al.*, 2001; White, 2002 y Saint *et al.*, 2006). La baja viscosidad presentada por la muestra Yc (8426 CP aprox) podría deberse a factores como el escaso contenido de proteína en la leche, una agitación muy vigorosa en el momento de la elaboración del producto o la destrucción del coágulo durante la acidificación, como lo indica Wong (1995).

Tabla 12. Análisis de viscosidad en muestras de yogurt (Ya y Yc)

Muestra	Viscosidad (CP)	Torque (%)	Temperatura (°C)	Velocidad (rpm)
Yc	1596	52.0	24.4	1
	1596	53.2	24.5	
	1278	42.6	24.6	
Ya	8960	89.6	25.2	1
	8550	28.5	26.5	
	7770	25.9	25.8	

6.2.3. Colorimetría en muestras de yogurt

Tabla 13. Coordenadas CIElab del color de muestras de yogurt (Ya, Yc)

Muestra	L	a	b	C	H	YI	WI
Ya	59.61	16.57	5.65	17.51	18.83	13.54	59.01
Yc	62.35	13.77	8.11	15.99	30.49	18.58	61.31

Los valores de las coordenadas CIElab (tabla 13) en ambas muestras tuvieron un comportamiento similar con pequeña variación en el ángulo de la matiz ($^{\circ}H$), resaltando que la muestra Ya presenta una matiz más cercana a color roja-rosada con ($H=18.36^{\circ}$), mientras que Yc presenta un ángulo de matiz de 18.58 encontrándose en la tonalidad rojiza.

Según sus valores de L^* , las muestras de yogurt presentan una luminosidad baja (59.61 para Ya y 62.35 para Yc); por lo tanto, a mayores valores de L^* el color del producto tiende a ser más al blanco, como se infiere de lo reportado por MacDougall (2002), especialmente considerando que la presencia de trozos de fresa genera un color que tiende a tonalidades oscuras. Los valores positivos en el parámetro a^* se asocian con coloraciones rojizas mientras los negativos con coloraciones cada vez más verdes (Montesinos, 2003). Es por ello, que las muestras evaluadas de Yogurt (sabor a fresa) presentaron una tendencia a valores de a^* positivos.

En general, cabe destacar que los valores obtenidos en el presente estudio coinciden con los obtenidos por otros autores (Cruz *et al.*, 2013). Tal y como cabría esperar, ambas muestras se caracterizaron por valores en tonalidades rojizas y matices de ángulo entre rosado y rojizo.

6.3. Crecimiento e identificación bioquímica y morfológica de BAL.

6.3.1. Crecimiento de las BAL

En la Figura 31 se observa la viabilidad de las BAL expresada en Logaritmo en base 10 unidades formadoras de colonias por gramo (Log UFC/g) en función del producto y tipo de fabricación, el producto que presentó el mayor viabilidad fue el Yogurt (6 y 6,6 UFC/g),

cumpliendo con lo sugerido por (FAO, 2007), quien dice que para que un agente probiótico presente una acción benéfica en el organismo del consumidor, éste debe tener un crecimiento mínimo de BAL de orden de 10^6 UFC.

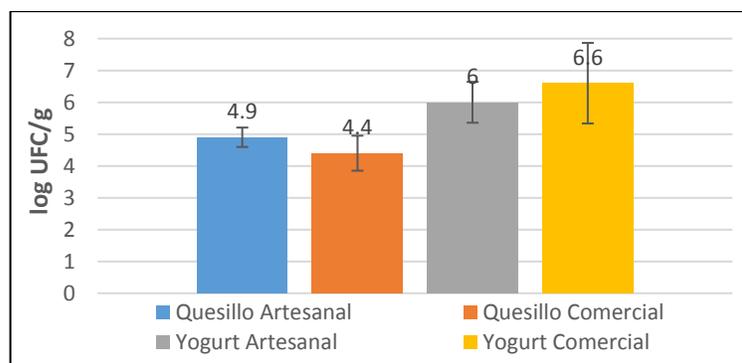
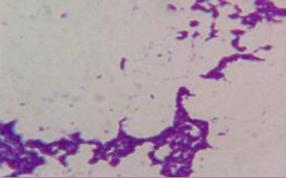
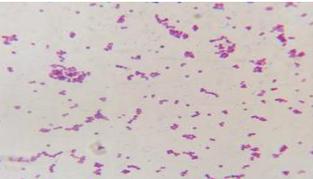


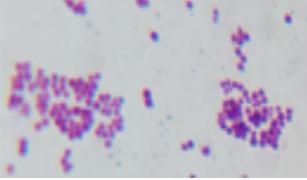
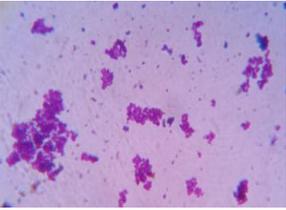
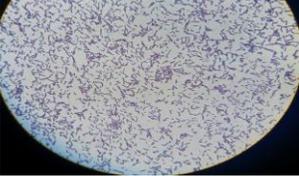
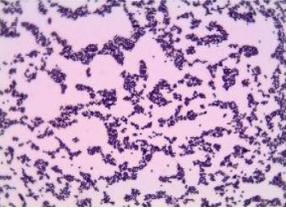
Figura 31. Crecimiento de BAL medido en Log UFC/g de Qa, Qc, Ya y Yc

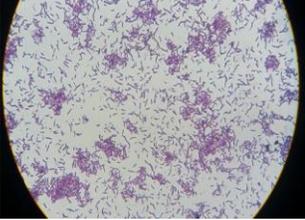
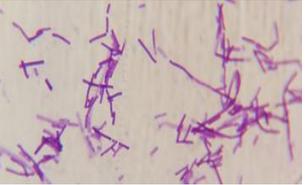
Se obtuvieron 3 morfotipos de BAL aisladas por cada producto, obteniendo en total 12 morfotipos de BAL. En la tabla 14, muestra la caracterización morfológica pertenecientes a bacterias que observadas al microscopio corresponden a bacterias grampositivas, las cuales se identificaron como: Q.A-3T2, Q.A-5T3, Q.A-7T3, Q.C-1T1, Q.C-2T2, Q.C-1T2, Y.A-3T1, Y.A-5T2, Y.A-3T2, Y.C-5T2, Y.C-5T1 y Y.C-4T2, agrupadas en cocos dispuestos en cadenas, cocos diplococos y bacilos.

Las morfologías bacterianas encontradas coinciden con las referencias bibliográficas consultadas, donde las cepas de BAL presentan una tinción Gram positiva, característica importante de éste grupo de bacterias, y cabe una gran probabilidad de que pertenezcan al género *Lactobacillus spp.* aquellas con morfología bacilar y al grupo de los *Lactococcus spp.* aquellas con morfología cocoide (Smita *et al.*, 2009).

Tabla 14. Identificación morfológica de las BAL aisladas de Qa, Qc, Ya, Yc

COLONIA	DESCRIPCION	IMAGEN MICROSCOPIO	IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA	GRAM
Q.A-3T2	Colonia de forma redondeada de color amarillo lechoso en la periferia, con un centro de color más oscuro. Diámetro de 6 mm.		Cocos dispuestos en cadena	(+)
Q.A-5T3	Colonia de forma redondeada de color blanco en la periferia, en el centro color lechoso amarillento. Diámetro de 4 mm.		cocos	(+)

Q.A-7T3	Colonia de forma redondeada de color blanco intenso, con aspecto viscoso. Diámetro de 5 mm.		Cocos dispuestos en pareja	(+)
Q.C-1T1	Colonia de forma redondeada, de color amarillo lechoso. Diámetro de 6 mm.		Bacilos	(+)
Q.C-2T2	Colonia de forma redondeada de color blanco, con un brillo en la periferia. Diámetro de 1 mm.		Cocos	(+)
Q.C-1T2	Colonia de forma redondeada de color blanco brillante en la periferia, con un centro de color blanco intenso. Diámetro de 2 mm.		Cocos dispuestos en pareja	(+)
Y.A-3T1	Colonia de forma redondeada achatada de color blanco brillante. Diámetro de 1 mm.		Bacilos	(+)
Y.A-5T2	Colonia de forma redondeada de color blanco brillante. Diámetro de 3 mm.		Bacilos	(+)
Y.A-3T2	Colonia de forma redondeada achatada de color blanco en la periferia, con un centro de color más claro. Diámetro de 7 mm.		Bacilos	(+)
Y.C-5T2	Colonia de forma redondeada no uniforme de color blanco brillante en la periferia, en el centro color lechoso. Diámetro de 4 mm.		Cocos dispuestos en pareja	(+)

Y.C-5T1	Colonia de forma redondeada de color blanco brillante en la periferia, con un centro de color blanco intenso. Diámetro de 3 mm.		Bacilos	(+)
Y.C-4T2	Colonia de forma redondeada de color blanco en la periferia, con un centro de color amarillento lechoso. Diámetro de 2 mm.		Bacilos	(+)

6.3.2. Catalasa y oxidasa de BAL.

Tabla 15. Catalasa y oxidasa de BAL aisladas de Qa, Qc, Ya, Yc

BAL	Catalasa	Oxidasa
Q.A-3T2	+	-
Q.A-5T3	+	-
Q.A-7T3	-	-
Q.C-1T1	-	-
Q.C-2T2	-	-
Q.C-1T2	-	-
Y.A-3T1	-	-
Y.A-5T2	+	-
Y.A-3T2	-	-
Y.C-5T2	-	-
Y.C-5T1	-	-
Y.C-4T2	-	-

Los signos indican actividad (+) e inactividad (-) de la cepa probada



Figura 32. Catalasa negativa

De las BAL de los productos (Yogurt y queso) elaborados, empaquetados y distribuidos semi-industrialmente, 1 cepa de queso artesanal (Q.A-7T3), 2 cepas de Yogurt artesanal (Y.A-3T1, Y.A-3T2) y las 3 cepas de Yogurt semi-industrial (Y.C-5t2, Y.C-5t1 y Y.C-4T2), Tabla 15, presentaron catalasa y oxidasa negativa. Los resultados obtenidos de estas pruebas ubican a las cepas aisladas dentro del género *Lactobacillus sp.* y *Lactococcus sp.* según lo reportado por el manual Bergey, y trabajos realizados por Kandler (1986), estas cepas se caracterizan por presentar reacciones negativas a las pruebas de catalasa y oxidasa lo cual las ubica dentro de estos géneros microbianos.



Figura 33. Catalasa positiva

Dos de las BAL (Q.A-3T2 y Q.A-5T3) aisladas de Qa y 1 BAL (Y.A-5T2) aislada de Ya (Figura 33), presentaron catalasa positiva (+), según Prescott *et al.*, (1999), en ciertas condiciones, algunas BAL son capaces de tomar grupos hemo externos para formar una enzima denominada pseudocatalasa.

Una característica física debido a la ausencia de citocromos en las BAL es la formación de colonias color blanco lechoso. Cabe destacar la importancia de realizar diferentes pruebas químicas y bioquímicas, para el estudio de estas BAL. La prueba de Oxidasa fue negativa para el 100% de las BAL en estudio, esto significa que no puede usar el oxígeno en la cadena de transferencia de electrones o aplican un citocromo diferente para transferir electrones al oxígeno.

6.3.3. Prueba de movilidad y de utilización del citrato como única fuente de energía de las BAL.

Tabla 16. Movilidad y utilización del citrato de BAL aisladas de Qa, Qc, Ya, Yc

BAL	Movilidad	Citrato fuente Carbono-energía
Q.A-3T2	-	-
Q.A-5T3	-	-
Q.A-7T3	-	-
Q.C-1T1	-	-
Q.C-2T2	-	-
Q.C-1T2	-	-
Y.A-3T1	-	-
Y.A-5T2	-	-
Y.A-3T2	-	-
Y.C-5T2	-	-
Y.C-5T1	-	-
Y.C-4T2	-	-

Los signos indican movilidad e inmovilidad (+/-) y Actividad e inactividad en prueba de citrato de Simmons (+/-) de la cepa probada

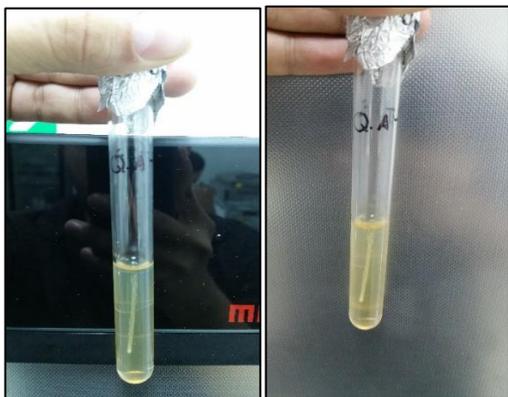


Figura 34. Prueba de Movilidad de BAL

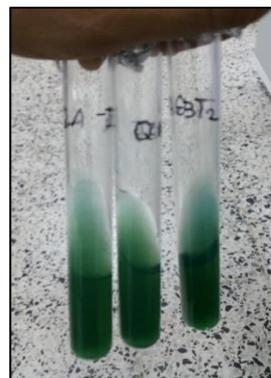


Figura 35. Prueba de Citrato como fuente de Carbón-Energía de BAL

El 100% de las BAL evaluadas, no presentaron movilidad (Tabla 16), confirmando que no presentan flagelos peritricos que confieren móviles (Figura 34). La ausencia de movilidad y de espora en las cepas de BAL son características propias de los géneros *Lactobacillus* y *Lactococcus*, aunque existen algunos que presentan flagelos peritricos (Castulo *et al.*, 2008).

Todas las BAL fueron negativas a la prueba de citrato como única fuente de Carbón-Energía, evidenciado en que el medio permanece de color verde debido a que no hay desarrollo bacteriano y no hay cambio de color (Figura 35), esto comprueba que estas bacterias no son capaces de utilizar citrato como única fuente de carbono para el metabolismo y crecimiento, provocando alcalinidad.

6.3.4. Prueba de coagulación de la leche por las BAL

Considerando que las cepas aisladas de productos lácteos comerciales del Huila podrían a futuro emplearse en la elaboración de leches fermentadas como probióticos, se evaluó si las cepas podían coagular la leche. Mostrando que el 100% de ellas presentaron esta propiedad, al desarrollar un coagulo uniforme al cabo de 16 horas de monitoreo.

Los resultados obtenidos en el presente estudio demostraron que las cepas de BAL aisladas son capaces de fermentar adecuadamente la leche vaca sin desencadenar la formación de aromas inapropiados o indeseables, por lo que las características que adquiere la leche tras el desarrollo de cualquiera de éstas BAL aisladas de quesillo y yogurt son aceptables para su aplicación industrial en productos donde interese esta característica.

6.4. Actividad antimicrobiana

Se evaluó la actividad antimicrobiana de cada cepa BAL frente a los patógenos seleccionados, en tres diferentes métodos: Presencia de células (1), ausencia de células pH ácido (2), ausencia de células pH neutro (3).

Las BAL son conocidas por su capacidad como microorganismos probióticos, que pueden inhibir el crecimiento bacteriano por la formación de ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno, diacetilo, antibióticos y bacteriocinas, una gran cantidad de las BAL más reconocidas pertenecen a los *Lactobacillus spp.* y muchos estudios se han enfocado en la evaluación de su actividad antagónica contra una gran variedad de microorganismos, se ha evaluado su capacidad de producir bacteriocinas y otros productos de su metabolismo que inhiben el desarrollo microbiano. Los resultados presentados en las figuras 36, 37, 38 y 39 muestran claramente que las cepas aisladas presentaron una acción inhibitoria contra *E. coli* y *Klebsiella*.

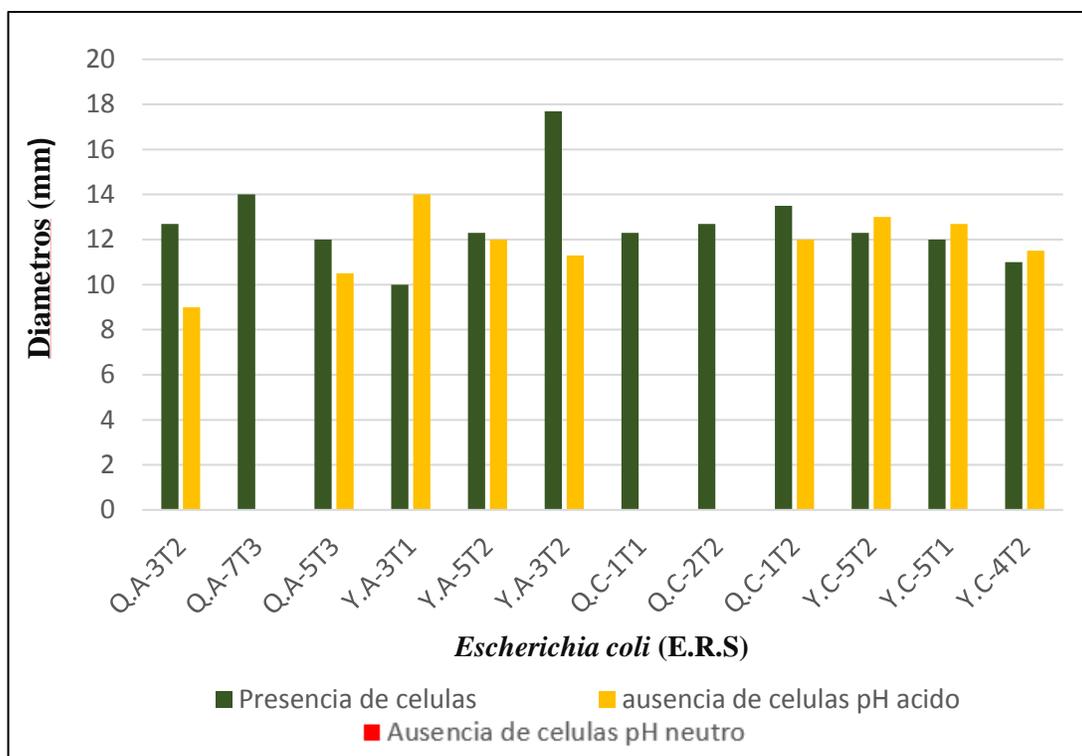


Figura 36. Actividad antimicrobiana frente a *Escherichia coli* (E.R.S) por los 3 métodos.

En la Figura 36 se muestra que el 100% de BAL aisladas de los 4 productos lácteos estudiados en esta investigación presentaron poder antimicrobiano frente a (E.R.S) por el método 1 (presencia de células) con diámetros que varían entre 10-17.7 mm, solo el 75% de cepas inhibieron éste patógeno por el método 2 (usencia de células a pH ácido) con diámetros comprendidos entre 9-14 mm, mientras que ninguna cepa BAL presentó inhibición frente a *E. coli* (R.S) por el método 3 (ausencia de células pH neutro), lo cual demuestra que no se produjo la inhibición por parte de bacteriocinas, además coincide con resultados de Hudault *et al.*, (1997) donde el sobrenadante de la cepa *L. rhamnosus* GG fue efectivo a pH de 3 a 5 y al neutralizarse no logró evitar la invasión de *Escherichia coli*, en un modelo celular *in vitro*. También los resultados coinciden con la investigación de Olivares *et al.*, (2006) quien mostró que los sobrenadantes de *L. coryniformis* CECT5711, *L. salivarius* CECT5713 y *L. gasseri* CECT5714 inhibieron a pH entre 3.86 y 4.4 y perdieron dicha capacidad a pH 7 al enfrentarse a *S. choleraesuis*, *E. coli* y *Clostridium*.

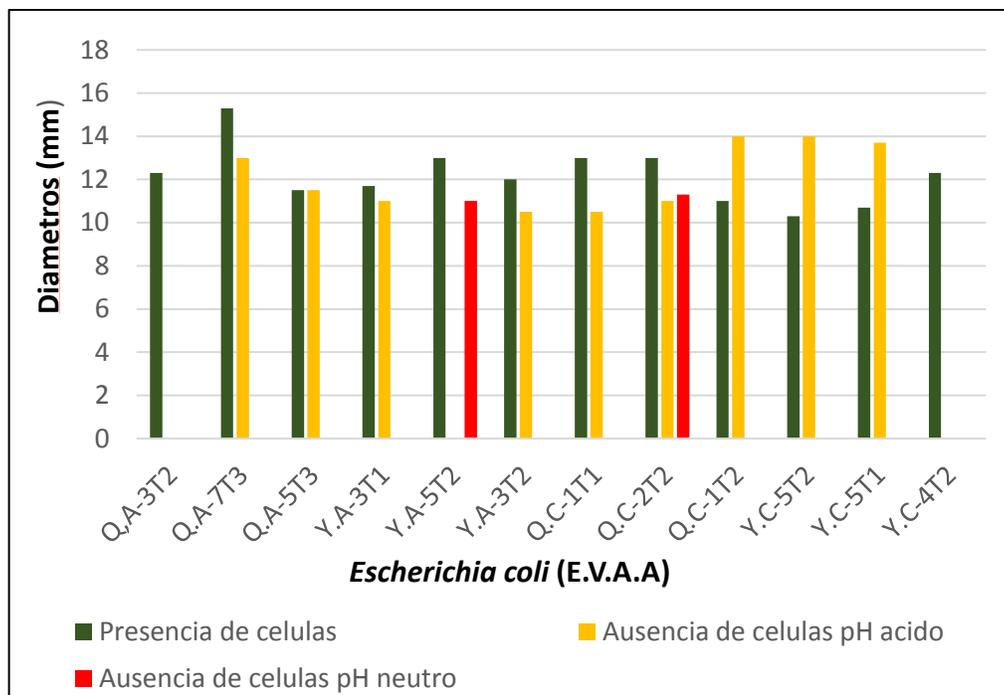


Figura 37. Actividad antimicrobiana frente a *Escherichia coli* (E.V.A.A) por los 3 métodos

En la Figura 37 se observa el comportamiento de los diámetros de inhibición de cada una de las cepas de BAL frente al patógeno (E.V.A.A), corroborando que frente a este patógeno el 100% de las BAL evaluadas con el método 1, presentaron inhibición aunque con diámetros de menor tamaño (10.3-15.3 mm), el 75% indicaron inhibición con el método 2 con tamaños de 10.5-14 mm en diámetro, y 16,7% de BAL tuvieron poder antagónico por el método 3, resaltando que frente a éste patógeno las BAL fueron capaces de producir sustancias péptidas como nisinas y bacteriocinas que actuaron como agente inhibidor.

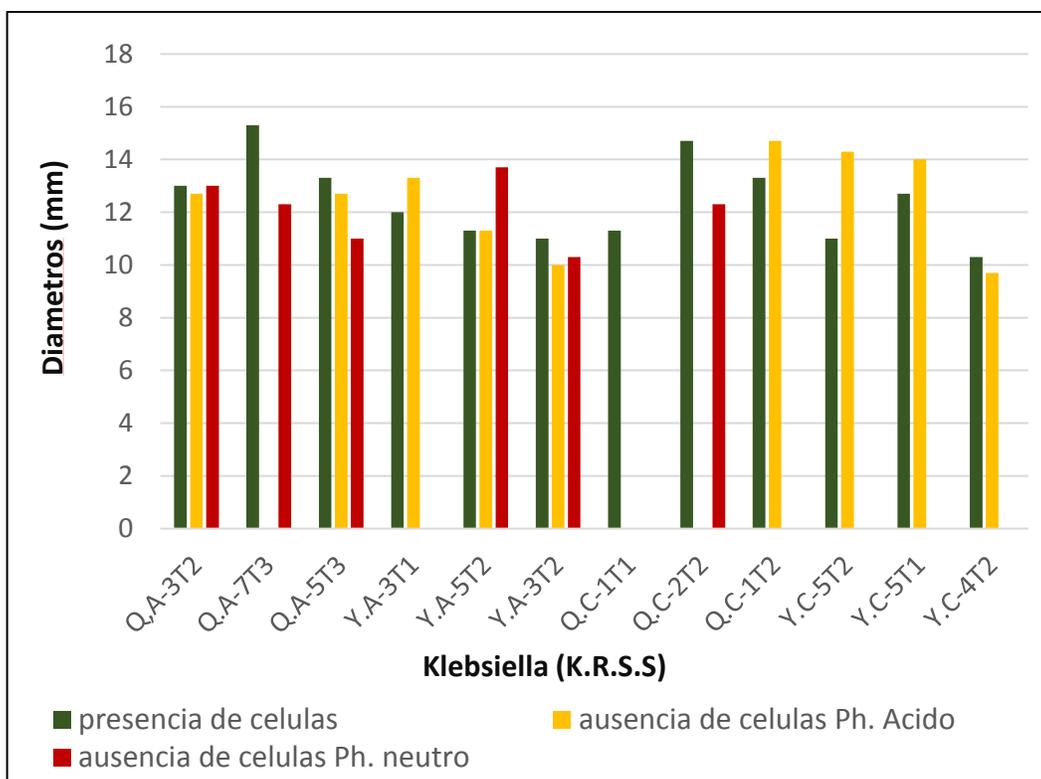


Figura 38. Actividad antimicrobiana frente a *Klebsiella* (K.R.S.S) por los 3 métodos

La actividad antimicrobiana de péptidos como nisina y bacteriocinas producidas por ciertas cepas de *Lactococcus lactis* subsp *lactis* y *Carnobacterium piscicola* JG126 respectivamente, están influenciados por el pH (Wilson *et al.*, 2005). En Figura 38 se puede observar que las BAL en su totalidad mostraron inhibición frente al patógeno (K.R.S.S) en presencia de sus células (método de discos) con diámetros que oscilan entre 10.3-15.3 mm, similar a lo publicado por (Wilson *et al.*, 2005). Adicionalmente, en ambientes a bajo pH, el ácido láctico puede funcionar como permeabilizador de la membrana externa de bacterias Gram negativas y por tanto, facilitar los efectos de otras sustancias antimicrobianas (Makras *et al.*, 2006).

El 75% de las BAL inhibieron también éste patógeno en ausencia de células (pH ácido) con diámetros menores que oscilan entre 9.7-14.7 mm frente a (K.R.S.S), el 50% de las cepas BAL en ausencia de células (pH neutro) presentaron de actividad antimicrobiana con diámetros 10.3-13.7 mm, resaltándose que las bacteriocinas frente a éste patógeno presentaron mayor influencia en su papel antagónico.

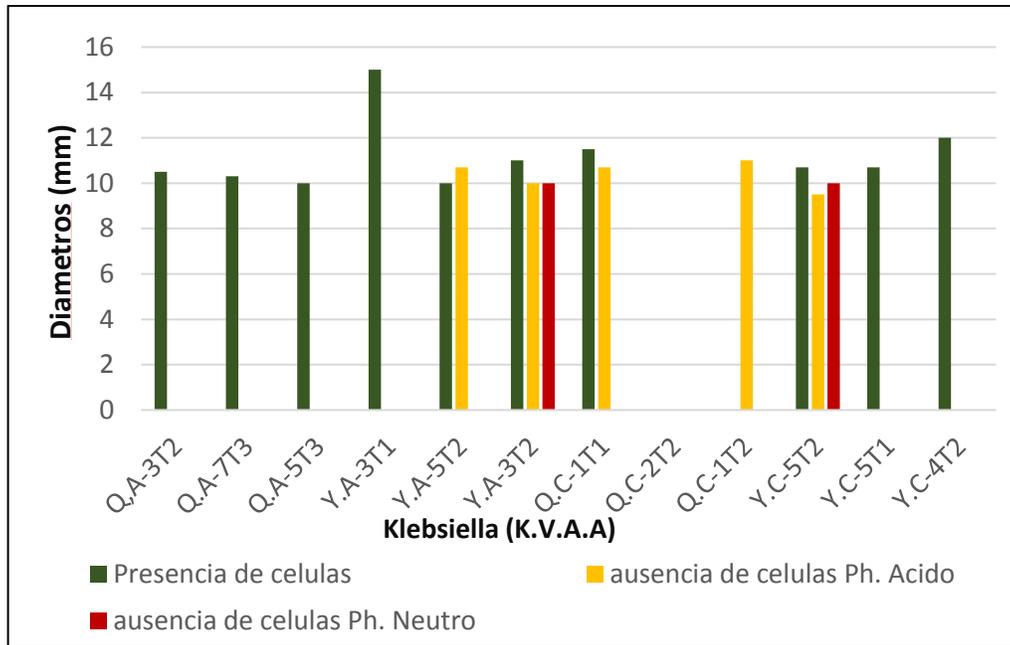


Figura 39. Actividad antimicrobiana frente a *Klebsiella* (K.V.A.A) por los 3 métodos.

Se puede evidenciar en la Figura 39. que el 83.3% de BAL inhibieron (K.V.A.A) en presencia de sus células (Método de Discos), el 41.7% de BAL inhibieron éste patógeno en ausencia de sus células (Método de pocillos pH ácido), y solo el 16,7% inhibieron (K.V.A.A) en ausencia de células (pH neutro) con diámetros menores de 10 mm.

6.4.1. Evidencia de los resultados de la evaluación antimicrobiana

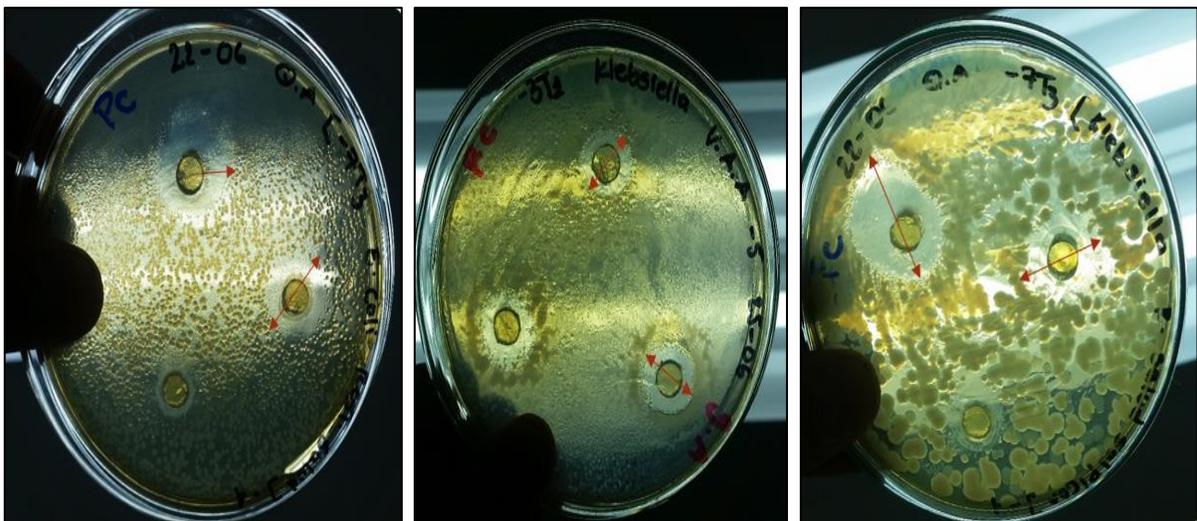


Figura 40. Halos de inhibición, método de discos (presencia de células)



Figura 41. Halos de inhibición, método del sobrenadante en pocillo a pH ácido y neutro, (ausencia de células)

Tabla 17. Comparación de los diámetros de inhibición frente a los tres métodos de evaluación

Diámetros de Inhibición			
Método	$\bar{X} \pm S$	Me \pm S	P valor
1	$11,701 \pm 2,335^a$	$12,0 \pm 2,335^a$	0,0
2	$9,993 \pm 2,846^b$	$10,0 \pm 2,846^b$	
3	$7,618 \pm 1,608^c$	$7,0 \pm 1,608^c$	

Letras minúsculas diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos con $P=0,0$

\bar{X} : media, Me: mediana, S: desviación estándar

Se observa en la Tabla 17 que de acuerdo al análisis estadístico, el test de Kruskal-Wallis aplicado entre los métodos 1, 2 y 3 se presentan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre los métodos utilizados, resaltando que por el método 1 de evaluación antimicrobiana se obtuvieron mayores diámetros de inhibición frente a las 4 cepas de patógenos en estudio, y el método 3 presentó los menores diámetros de inhibición, lo cual hizo diferir los resultados frente a los otros dos métodos.

Tabla 18. Comparación del efecto de las BAL en los diámetros de inhibición

Diámetros de Inhibición			
BAL	$\bar{X} \pm S$	Me \pm S	P valor
Q.A-3T2	$9,111 \pm 2,758^a$	$7,0 \pm 2,758^a$	0,071
Q.A-5T3	$9,333 \pm 3,535^a$	$7,0 \pm 3,535^a$	
Q.A-7T3	$9,444 \pm 2,455^a$	$10,0 \pm 2,455^a$	
Q.C-1T1	$8,844 \pm 2,373^a$	$7,0 \pm 2,373^a$	
Q.C-2T2	$9,488 \pm 2,966^a$	$7,0 \pm 2,966^a$	
Q.C-1T2	$9,688 \pm 3,182^a$	$7,0 \pm 3,182^a$	
Y.A-3T1	$9,444 \pm 2,904^a$	$7,0 \pm 2,904^a$	
Y.A-5T2	$10,08 \pm 2,538^a$	$10,0 \pm 2,538^a$	
Y.A-3T2	$10,80 \pm 3,279^a$	$11,0 \pm 3,279^a$	
Y.C-5T2	$10,64 \pm 2,805^a$	$11,0 \pm 2,805^a$	
Y.C-5T1	$10,20 \pm 2,865^a$	$11,0 \pm 2,865^a$	
Y.C-4T2	$9,02 \pm 2,241^a$	$7,0 \pm 2,241^a$	

\bar{X} : Media, Me: mediana, S: desviación estándar

En la tabla 18 se observa que, de acuerdo al análisis estadístico, el test de Kruskal-Wallis aplicado entre las cepas BAL y su efecto en los diámetros de inhibición, mostró que no hay diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) entre las BAL, esto resalta el valor agregado de los productos lácteos elaborados y empacados artesanalmente, pues al igual que los comerciales o industriales presentan características probióticas, con actividad antimicrobiana frente a los patógenos evaluados, incrementando su nivel de competitividad y valor benéfico en la salud del consumidor.

La cepa aislada de la muestra de yogurt artesanal Y.A-3T2, destacó dentro de la colección de las BAL pues presentó actividad antimicrobiana frente a las dos cepas de *Klebsiella* y frente a las dos cepas de *Escherichia coli* con los métodos 1 y 2. También mantuvo el efecto sobre las dos cepas de *Klebsiella* cuando el pH se ajusta a 7. Además, esta cepa presentó el diámetro mayor de inhibición (17.7mm) el cual es obtenido frente a la cepa patógena *Escherichia coli* (E.R.S) en presencia de células (método de Discos). Por tanto, se considera que su actividad antagónica se debe a la presencia de las células, componentes celulares, a los ácidos orgánicos producidos como el ácido láctico y las cepas que mantuvieron la actividad antimicrobiana a pH neutro se debe a la producción de otras sustancias activas como las bacteriocinas, como ya concluyeron Midolo *et al.*, (1995) y Jacobsen *et al.*, (1999) en estudios similares.

Todas las cepas de las BAL de los dos productos lácteos (Qa, Qc, Ya y Yc) presentaron actividad inhibitoria frente a las dos cepas de *Escherichia coli*, en presencia de células (Figuras 36 y 37). Las BAL aisladas en el presente estudio podrían adherirse y colonizar las células epiteliales del estómago y de este modo competir con patógenos como *E. coli* o *H. pylori*, con el fin de mejorar la tasa de erradicación del patógeno (Aiba *et al.*, 1998).

Los resultados en general, indicaron que la actividad inhibitoria frente a *Escherichia coli* y *Klebsiella* de las BAL podría deberse a los componentes celulares, exclusión competitiva por nutrientes, a la presencia de ácido láctico y otras sustancias activas a pH bajo. Es decir, que solo la presencia de células y los ácidos orgánicos de algunas de las BAL estudiadas tienen efecto sobre las cepas de éstos patógenos ensayados, y que algunas pocas de las BAL evaluadas presentaron producción de bacteriocinas las cuales están activas a pH neutros.

6.4. Antibiograma

Se emplearon en total 2 antibióticos clasificados de la siguiente forma (Tabla 18):

Tabla 19. Modo de acción de los antibióticos evaluados

Modo de Acción	Antibiótico
Inhibidores de la síntesis de la capa de peptidoglucano de la pared celular bacteriana.	Cefalexina (25µl)
Inhibidores de enzimas secuenciales que intervienen en la síntesis del ácido fólico bacteriano.	Sulfametoxazol (25µl)

En la tabla 20 se reportan los resultados obtenidos en la prueba de susceptibilidad a antibióticos por parte de las BAL.

Tabla 20. Prueba de susceptibilidad a antibióticos

BAL	Cefalexina	Sulfametoxazol
Q.A-3T2	S	S
Q.A-5T3	S	S
Q.A-7T3	R	R
Q.C-1T1	S	S
Q.C-2T2	R	R
Q.C-1T2	R	R
Y.A-3T1	R	R
Y.A-5T2	R	R
Y.A-3T2	R	R
Y.C-5T2	R	R
Y.C-5T1	R	R
Y.C-4T2	R	R

Los signos indican susceptibilidad (S) y resistencia (R) de las BAL

La selección de cepas probióticas requiere de este criterio para asegurar su uso y las posibles aplicaciones como adyuvante en los tratamientos de infecciones gastrointestinales.

El 100% de las BAL de las muestras de yogurt (Ya, Yc), fueron resistentes a los antibióticos Cefalexina y Sulfametoxazol, Estos resultados son similares a lo publicado por Mejía *et al.*, (2007), quien trabajó con cepas BAL, también concuerda con los resultados obtenidos por Verdenelli *et al.*, (2009). Sin embargo, se reconoce que algunos *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* pueden tener resistencia intrínseca a algunos antibióticos. Cuando el gen o los genes que confieren resistencia es de origen cromosomal y no está asociado a ningún elemento genético móvil, no es inmediatamente transferible y, por lo tanto, el riesgo de la transmisión de esta resistencia es mínima (European Food Safety Authority, 2008). Los mecanismos de resistencia bacteriana están distribuidos en una amplia variedad de bacterias y otros parecen ser más específicos en ciertas especies y géneros de bacterias (Rodríguez *et al.*, 2009).

La caracterización incluyó la susceptibilidad de algunas cepas lácticas frente a antibióticos. Las BAL (Q.A-3T2, Q.A-5T3 y Q.C-1T1) presentaron susceptibilidad frente a los dos

antibióticos en estudio (Cefalexina y Sulfametoxazol) con halos de inhibición comprendidos entre (15-18 mm), estos resultados concuerdan con los estudios realizados por Zhou *et al.*, (2005); Flórez (2007) y Maurad *et al.*, (2008), donde hacen mención que *Lactobacillus* spp, son generalmente susceptibles a estos antibióticos.

Los resultados obtenidos permitieron conocer que el conjunto de las cepas BAL aisladas de productos lácteos como yogurt y queso elaborado y distribuidos de manera artesanal y semi-industrialmente en el departamento del Huila además de poseer actividad antimicrobiana frente a patógenos, presentan sensibilidad a algunos antibióticos y a otros no. Esta información es de gran utilidad en el momento que se desee utilizar dichas cepas como probióticos y cuando se pretenda diseñar cultivos iniciadores específicos de las BAL aisladas de Yogurt y Quesillo elaborados y distribuidos de manera artesanal y semi-industrial (Tu *et al.*, 2010).

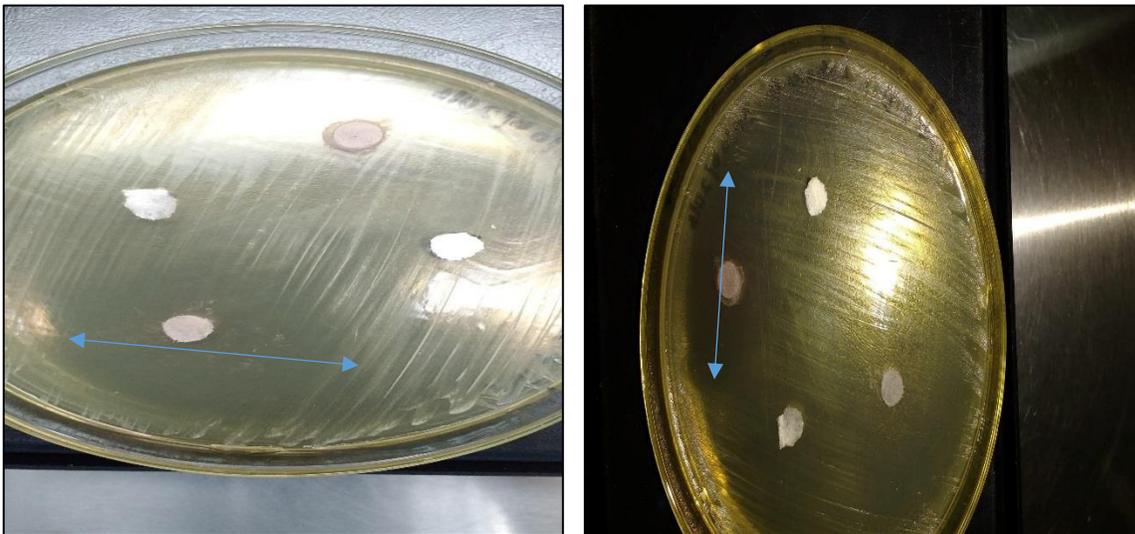


Figura 42. Prueba de susceptibilidad de BAL frente a Cefalexina y Sulfametoxazol.

7. CONCLUSIONES

Los resultados de la caracterización físico química de los productos lácteos (Yogurt y Quesillo), elaborados y distribuidos de manera artesanal y semi-industrial en el departamento del Huila, son de gran relevancia no solo para garantizar su calidad y aceptabilidad en el mercado para los consumidores; sino también como una herramienta de identidad útil para clasificar los diversos tipos de quesillos y yogurts.

Las BAL aisladas de yogurt y quesillo ofertados en el departamento del Huila, presentaron una caracterización física con morfología bacilar y cocoide, y bioquímica con catalasa y oxidasa negativa con algunas excepciones, no presentan movilidad y no usan el citrato como única fuente de energía, correspondientes a características típicas del género *Lactobacillus spp.* y *Lactococcus spp.* según su morfología descrita, confirmando su potencial como posible agente probiótico.

Las muestras de yogurt (YA y Yc) presentaron el mejor crecimiento de BAL expresado en UFC/g (6.0 - 6.6) respectivamente, cumpliendo con lo sugerido por la FAO, quien dice que para que un agente probiótico presente una acción benéfica en el organismo del consumidor, el producto final debe tener un crecimiento de BAL mínimo del orden 6 - 9 Log UFC/g.

La capacidad antagónica frente a *Escherichia coli* (E.R.S y E.V.A.A) y *Klebsiella* (K.R.S.S y K.V.A.A) por parte de las BAL aisladas de productos lácteos comerciales (Yogurt y quesillo) ofertados en el departamento del Huila de manera artesanal y semi-industrial, es atribuida a sus productos metabólicos, ya que al fermentar los carbohidratos producen una amplia variedad de sustancias con acción antimicrobiana como el ácido láctico y péptidos de bajo peso molecular como bacteriocinas y/o nisinas.

Los productos lácteos (Qa y Ya) elaborados y empacados artesanalmente presentan un valor agregado evidenciado al no presentar diferencias estadísticamente significativas frente a las BAL aisladas de los productos lácteos semi-industriales, resaltando que ambos productos en sus diferentes formas de elaboración y distribución poseen características y potencial probiótico por su actividad antimicrobiana, lo cual representa para los pequeños productores artesanales el aumento del nivel de competitividad de su producto en el mercado y valor benéfico en la salud del consumidor.

La cepa de Yogurt Artesanal Y.A-3T2, destacó dentro de la colección de las BAL pues presentó actividad antimicrobiana frente a las dos cepas de *Klebsiella* (K.R.S.S y K.V.A.A) y frente a las dos cepas de *Escherichia coli* (E.R.S. y E.V.A.A) con los métodos 1 y 2. También mantuvo el efecto sobre las dos cepas de *Klebsiella* cuando el pH se ajustó a 7. Además, esta cepa presentó el diámetro mayor de inhibición (17.7mm) el cual es obtenido frente a la cepa patógena *Escherichia coli* (E.R.S) en presencia de células (método de Discos).

Los resultados obtenidos en la actividad antimicrobiana por parte de las BAL de esta investigación, abre la posibilidad de ofrecer a la industria de lácteos local semi-industrial, artesanal y a los consumidores, información que les ayude a la producción de alimentos (Yogurt y quesillo) con atributos de calidad, y potencial probiótico con actividad antimicrobiana, posicionándolos como un alimento funcional.

8. RECOMENDACIONES

Realizar pruebas fenotípicas genotípicas y de taxonomía molecular, mediante pruebas *in vitro* e *in vivo*, que permitan identificar las BAL hasta su especie, para agruparlas dentro de los microorganismos probióticos con acción benéfica sobre el organismo del huésped lo cual le daría un valor agregado al producto posicionándolo como un alimento funcional.

Para garantizar la seguridad de las cepas BAL, se recomienda pruebas de resistencia a antibióticos verificando la ausencia de genes de resistencia transferibles, actividades metabólicas perjudiciales, estudios epidemiológicos sobre posibles efectos adversos en los consumidores y determinación de la producción de toxinas y capacidad hemolítica si la cepa pertenece a una especie potencialmente toxigénica

Es recomendable profundizar en los mecanismos de acción y en las pautas de administración de las BAL de queso y yogurt, y sus metabolitos frente a estos dos patógenos (*Klebsiella* y *Escherichia coli*), para identificar las sustancias que ejercen el efecto antimicrobiano y realizar estudios *in vivo*.

Además de la identificación de género, especie y cepa probiótica de las BAL se recomienda realizar estudios *in vitro* para la selección de probióticos de uso en humanos como: resistencia a la acidez gástrica y sales biliares y pruebas de adherencia a la mucosa intestinal y células epiteliales, para luego ser aplicadas en estudios *in vivo*.

9. BIBLIOGRAFIA

- Adolfsson, O., M. Nikbin y R. Russell. (2004). El yogurt y su función en el intestino. *American J. Nutr.* 80(2): 245-256.
- Aiba, Y., Nobuyuki, S., Kabir, A.M., Takagi, A., Koga, Y. (1998). Lactic acid-mediated suppression of helicobacter pylori by the oral administration of lactobacillus salivarius as a probiotic in a gnotobiotic murine model. *The American Journal of gastroenterology*, pág.2097-2101.
- Amoroch Cruz, C. M. (2011). Caracterización y potencial probiótico de bacterias lácticas aisladas de leche de oveja Guirra. Valencia: Universidad Politecnica de Valencia.
- Andrighetto, C., Zampese, L., Lombardi, A. (2001). RAPD-PCR characterization of lactobacilli isolated from artisanal meat plants and traditional fermented sausages of Veneto region (italy). *Letters in Applied Microbiology*, 33, pág.26-30.
- Angón, G., Pedro, Santos, S., Norma, F. y Hernandez, G. (2006). Índices para la determinación de las condiciones óptimas de maduración de un fruto. <http://www.utm.mx/temas/temas-docs/ensayo1t30.pdf>. (Consultado: septiembre de 2014).
- AOAC (Association of Official Analytical Chemists). (1997). *Methods of Analysis of the AOAC International*. 3rd ed. Volumen II. Maryland USA.
- Asahara, T., Nomoto, J., Watanuki, M. y Yokokura, T. (2001). “Antimicrobial activity of intraurethrally administered probiotic *Lactobacillus casei* in a murine model of escherichia coli urinary tract infection” *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2001; 45: 1751–1760.
- Axelsson, L.T. (1993). Lactic acid bacteria: classification and physiology. En: Salminen, S, von Wright A; *Lactic acid bacteria*. Ed. Marcel Dekker, New York, EEUU.
- Azaïs-Braesco, V., Bresson, J.L., Guarner, L. y Corthier, G. (2010). Not all lactic acid bacteria are probiotics, but some are. *British Journal of Nutrition*, 103, pág.1079–1081.
- Badui Dergal, S. (2006). *Química de los alimentos*. Segunda edición. Imperio en Mexico.
- Bauer, A.W., Kirby, W.M.M., Sherris, J.C. y Turk, M. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol*, 45, págs.493–496.
- Bennik, M., Overbeek, W., Smid, E. y Gorris, L. (1999). Biopreservation in modified atmosphere stored mungbean sprouts: The use of vegetables-associated bacteriocinogenic lactic acid bacteria to control the growth of *Listeria monocytogenes*. *Lett Appl Microbiol*.
- Bergey, H., John, G. y Bergey. (1994). *Bergey’s Manual of Determinative Bacteriology*. Novena edición, Williams and wikins, USA, Baltimore, 787 pag.
- Blanco, S., Pacheco, E. y Frágenas, N. (2006). Evaluación física y nutricional de un yogurt con frutas tropicales bajo en calorías. *Rev. Fac. Agron. UCV*. (32):131-144.

- Bouhnik, Y., Flourie, B., Andrieux, C., Bisetti, N., Briet, F. y Rambaud, J.C. (1996). Effects of *Bifidobacterium sp* fermented milk ingested with or without inulin on colonic bifidobacteria and enzymatic activities in healthy humans
- Boun, H.R. y Huxsoll, C.C. (1991). El control de Mínimamente Procesados Carrot (*Daucus carota*) La decoloración de la superficie por abrasión Peeling. J Food Sci. Pág: 416-422.
- Briceño, A., Martinez, R. y K. García. (2001). Viabilidad y actividad de la flora láctica (*Streptococcus salivarius subsp thermophilus Lactobacillus delbrueckii subsp bulgaricus*) del yogurt en Venezuela. Acta Científica Venezolana. 52(1):46-54.
- Bruce, A.W. y Reid, G. (2003). Probiotics and the urologist. Can J Urol. pag 45-113
- Bruschi.J. Producción De Quesos.S.F. Consideraciones particulares <http://www.vet.unicen.edu.ar/html/Areas/Tecnologia%20y%20calidad%20de%20leche%20y%20productos%20lacteos/2012/Produccion%20de%20quesos,%20consideraciones%20particulares.pdf>. (Consultado: Septiembre 2016).
- Burdock, G.A., Carabin, I.G. y Griffiths, J.C., (2006). The importance of GRAS to the functional food and nutraceutical industries. Toxicology.
- Casas, I. A y Dobrogosz, W. J. (2000). Validation of the probiotic concept: *Lactobacillus casei* confers broad spectrum protection against disease in humans and animals En: Microbial Ecology of Health Disease. Vol.12 pag. 47-285.
- Castillo, J. (2001). Elaboración de queso mozzarella con diferentes porcentajes de grasa en la leche de vaca. Trabajo de grado de Ingeniería 75 agrónoma. Guácimo. Costa Rica.: Universidad EARTH. Facultad de Ingeniería agronómica. pag 36.
- Cástulo, I., Del Campo, M., Gómez, H. y Alaníz, R. (2008). Bacterias ácido lácticas con capacidad antagonica y actividad bacteriocinogénica aisladas de quesos frescos.e-Gnosis Universidad de Guadalajara.
- Chandan, R.C. (1999). Enhancing market value of milk by adding cultures. J Dairy Sci; 82: 2245-2256.
- Chen, A.E., Carroll, K.C., Diener-West, M., Ross, T., Ordun, J., Goldstein, M.A., Kulkarni, G., Cantey, J.B. y Siberry, G.K. (2011). Randomized controlled trial of cephalexin versus clindamycin for uncomplicated pediatric skin infections Pediatrics.
- Chuayana, E., Ponce, C., Rivera, M. y Cabrera, E. (2003). “Antimicrobial activity of probiotics from milk products” Phil J Microbiol Infect Dis.
- Clarke, S.C. (2001). Diarrhoeagenic *Escherichia coli*-an emerging problem. Diagn Microbiol Infect Dis.

- Condony, R., Mariné, A. y Rafecas, M. (1998). *Yogurt: elaboración y valor nutritivo*. Madrid: Fundación española de la nutrición
- Consignado, G., Peña, A. y Jacalne, A. (1993). "In vitro study on the antibacterial activity of *Lactobacillus casei* against four diarrhea-causing organisms" *Phil J Microbiol Infect Dis* 22: 50-55.
- Cortes, E.T., Peña, N., Amorocho, C.M. y Gutierrez, N. (2016). Evolución de parámetros fisicoquímicos de queso Huilense, en almacenamiento refrigerado, *Biotecnología en el sector agropecuario y agroindustrial*, Vol 14 N°2, pág 110-118
- Cruz, A.G., Cavalcanti, R.N., Guerreiro, L.M.R., Sant'Ana, A.S., Noriega, L.C., Oliveira, C.A.F., Deliza, R., Cunha, R.L., Faria, J.A.F. y Bolini, H.M.A. (2013). Developing a prebiotic yogurt: Rheological, physico-chemical and microbiological aspects and adequacy of survival analysis methodology, *J.Food Eng*.
- D'Souza, A.L., Rajkumar, C., Cooke, J. y Bulpit, C.J. (2002). Probiotics in prevention of antibiotics associated diarrhoea: Meta-analysis.
- Dagan, R., Einhorn, M. y Lang, R. (1992). Once daily cefixime compared with twice daily trimethoprim/sulfamethoxazole for treatment of urinary tract infection in infants and children. *Pediatr Infect Dis* 11:198:203.
- De Oliveira, M., Hernández, R. y S. Prudencio-Ferreira. (2005). Suplementação de iogurte de soja com frutooligosacarídeos: características probióticas e aceitabilidade. *Revista de Nutrição. Campinas*. 18 (5):613-622.
- De Vrese, M., Stegelmann, A., Richter, B., Fenselau, S., Laue, C. y Schrezenmeir, J. (2001). Probiotics-compensation for lactase insufficiency. *Am J Clin Nutr. (Suppl. 2)*: 421-42.
- Demman, J., Rogosa, M. y elizabeht, M. (1960). A medium for the cultivation of lactobacilli. *Journal of Applied Bacteriology*, 23, 130.
- DGN (Dirección General de Normas) - MÉXICO. (2010). Norma Oficial Mexicana: NOM-181-SCFI-2010, Yogurt-Denominación, Especificaciones Fisico-químicas y Microbiológicas, Información Comercial y Métodos de Prueba.
- Diplock, A.T., Agget, P.J., Ashwell, M., Bornet, F., Fern, E.B. y Roberfroid, M.B. (1999). Scientific concepts of functional foods in Europe. Consensus document. *Br J Nutr*.
- Dupont, H.L. y Ericsson, C.D. (1993). Prevention and treatment of traveler's diarrhea. *N Engl J Med*.
- Eck, A. (1990). *El Queso*. Ed. Omega, Barcelona, España.
- Eickhoff, T.C. y Ehret, J.M. (1976). In vitro comparison of cefoxitin, cefamandole, cephalexin, and cephalothin. *Antimicrob Agents Chemother*.

- Erdigón, G., Álvarez, S., Rachid, M., Agüero, G. y Gobbato, N. (1995). Immune system stimulation by probiotics. Symposium: Probiotic Bacteria for Humans: Clinical Systems for Evaluation of Effectiveness. *J Dairy Sci*.
- ErdogruL, O. y Erbilir, F. (2006). "Isolation and characterization of *Lactobacillus bulgaricus* and *Lactobacillus casei* from various foods" *Turk J Biol* 30: 39-44.
- European Food Safety Authority (2008). Scientific Opinion of the Panel on Biological Hazards on a request from the European Food Safety Authority on foodborne antimicrobial resistance as a biological hazard. The EFSA Journal. 765, 1-87 Disponible en: <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/765.pdf>. [Consultado: Agosto 2016].
- Fang, H., Elina, T., Heikki, A. y Seppo, S. (2000). Modulation of humoral immune response through probiotic intake. *FEMS Immunol Med Microbiol*.
- FAO (Food and Agriculture Organization). (2003). Norma del Codex para Leches Fermentadas: CODEX STAN 243-2003. Leche y Productos Lácteos (2da edición).
- FAO. (2007). Report on Functional food.
- FAO, OMS, (2001). Informe de la consulta de expertos FAO/OMS sobre evaluación de las propiedades saludables y nutricionales de los probióticos en los alimentos, incluida la leche en polvo con bacterias vivas de ácido láctico.
- Farnworth, E. R. (2001). Probiotics and prebiotics. En: Handbook of nutraceutical and functional foods. Vol. 25; pag. 407-422.
- Femia, A.P., Luceri, C., Dolara, P., Giannini, A., Biggeri, A., Salvadori, M., Clune, Y., Collins, K.J., Paglierani, M. y Caderni, G. (2002). Antitumorigenic activity of the prebiotic inulin enriched with oligofructose in combination with the probiotics *Lactobacillus rhamnosus* and *Bifidobacterium lactis* on azoxymethane-induced colon carcinogenesis in rats. *Carcinogenesis*.
- Figueroa. A.J. (2006). Perfil Textural De Queso Chanco Comercial Elaborado En Tres Regiones De Chile. Chile, 110p. Tesis (Licenciado en Ciencia de los Alimentos.) Universidad austral de chile. Facultad de ciencias agrarias. Escuela de ingeniería en alimentos.
- Flórez, A. B. (2007). Tesis: Perfiles de susceptibilidad/resistencia a antibióticos en bacterias del ácido láctico y bifidobacterias. Caracterización molecular de genes de resistencia. Universidad de Oviedo.
- Fooks, L.J., Fuller, R. y Gibson, G.R. (1999). Prebiotics, probiotics and human gut microbiology. *Int. Dairy J.*, 9, pág.53-61.
- Fox, P.F., Guinee, T.P., Cogan, T.M. y Mcsweeney, P.L.H. (2000). *Fundamentals of cheese science*, An Aspen Publication, USA.

- Fung, D.Y.C. (1997). Overview of Rapid Methods of Microbiological Analysis. En: Food Microbiological Analysis New Technologies. (eds.: Tortorello, M.L. y Gendel, S.M.). Ed.: Marcel Dekker, Inc., New York. pp: 1-25.
- Gamel, T.H., Abd el-Razek, A.M. y Damir, A.A. (2008). Dried peeled roots of *glossostemon bruguieri* (moghat) as a potential functional food. *Journal of Food Processing and Preservation*, 34, pág.55–67.
- García, M.E.M. y Fernández, S. I. (2012). Determinación de la humedad de un alimento por un método gravimétrico indirecto por desecación. <http://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/16339/Determinaci%C3%B3n20de%20humedad.df?sequence=1&isAllowed=y>. (Consultado: Agosto de 2016).
- García, V., Rovira, S., Boutoial, K. y López, M. (2014). Improvements in goat milk quality: A review. *Small Ruminant Research* 121 (1): 51-57.
- Gaya, H., Adnitt, P.I. y Turner, P. (1970). Changes in gut flora after cephalixin treatment. *Br Med J*.
- Goldin, B.R., Gorbach, S.L., Saxelin, M., Barakat, S., Gualteri, L. y Salminen, S. (1992). Survival of *Lactobacillus* species (strain GG) in human gastrointestinal tract. *Dig Dis Sci*.
- Gonzales, E.P. (2010). Caracterización de la composición fisicoquímica del queso fresco elaborado artesanalmente en Sehaulaca municipio de Minatitlan, Veracruz. Tesis Médico veterinario Zootecnista, Universidad Veracruzana. pag.52.
- Gower, P.E. y Tasker, P.R. (1976). Comparative double-blind study of cephalixin and cotrimoxazole in urinary tract infections. *Br Med J*.
- Guandalini, S.(2002). Use of *Lactobacillus*-GG in paediatric Crohn's disease. *Dig Liver Dis (Suppl. 2)*: 63.
- Guandalini, S., Pensabene, L. y Zikri, M.A. (2000). *Lactobacillus* GG administered in oral rehydration solution to children with acute diarrhea: Amulticenter European study. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*.
- Guarner, F., Khan, A., Garisch, J., Eliakim, R., Gangl, A. y Thomson A. (2011). Guía Práctica de la Organización Mundial de Gastroenterología: Prebióticos y Probióticos. [Serie en Internet]. Consultado 10 enero 2017.
- Guérin-Danan, C., Chabanet, C., Pedone, C. y Popot, F. (1997). Milk fermented with yogurt cultures and *Lactobacillus casei* (DN 11400) compared to yogurt and gelled milk: Influence on intestinal microbiota in healthy infants. *Am J Clin Nutr*.
- Haller, D. (2000). Activation of human peripheral blood mononuclear cells by nonpathogenic bacteria in vitro evidence of NK cells as primary targets. *Infect Immun*.

- Hamilton-Miller, J.M. (2003). The role of probiotics in the treatment and prevention of *Helicobacter pylori* infection. *International Journal Antimicrobial Agents*, 22, pág.360-366.
- Hassan, A.N. y Frank, J.F. (2001). Starter cultures and their use. En H.E. Marth y L. Steele; *Applied dairy microbiology*. Second edition. Revised and expanded. Ed. Marcel Dekker, INC, New York, EEUU.
- Hatakka, K., Savilahti, E. y Ponka, A. (2001). Effect of long term consumption of probiotic milk on infections in children attending day care centres: Double blind, randomised trial. *BMJ*. 1327.
- Hebuterne, X. (2003). Gut changes attributed to ageing: Effects on intestinal microbiota. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*.
- Hernández, A. (2005). *Lactococina 972: Caracterización genética, modo de acción y optimización de la producción en biorreactores*. Tesis Doctoral. Oviedo: Universidad de Oviedo.
- Horie, H., Zeisig, M., Hirayama, K., Midtvedt, T., Mollér, L. y Rafter, J. (2003). Probiotic mixture decreases DNA adduct formation in colonic epithelium induced by the food mutagen 2-amino-9H-pyrido[2,3-b] indole in a human-flora associated mouse model. *Eur J Cancer Prev*.
- Hudault, S., Liévin, V., Oise Bernet-Camard, M.F. y Servin, A.L. (1997). Antagonistic Activity Exerted in vitro and in vivo by *Lactobacillus casei* (Strain GG) against *Salmonella typhimurium* C5 Infection. *Applied and Environmental Microbiology*, págs.513-518.
- Iañez, E. (1998). La Célula Procariota. Tomado de: www.fai.unne.edu.ar/biologia/microgeneral/micro-Ianez-102-micro.htm.
- Indecopi (Instituto Nacional de Defensa de la Competencia y de la Protección de la Propiedad Intelectual) - PERÚ. 1998. Norma Técnica Peruana. Ensayo de determinación de la densidad relativa – Método usual: NTP 202.008.1998.
- Isenberg, H.D. (2004). *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. American Society for Microbiology; pag. 3.3.2-3.3.2.13.
- Isolauri, E., da Costa, H. y Gibson, G. (2000). Working Group on Functional Foods and Probiotics. Boston. pag. 75-81.
- Jacobsen, C.N., Nielsen, V.R., Hayford, A.E., Moller, P.L., Michaelsen, K.F., Paerregaard, A., Sandström, B., Tvede, M. y Jakobsen, M. (1999). Screening of Probiotic Activities of forty-seven strains of *Lactobacillus spp.* By In vitro techniques and evaluation of the colonization ability of five selected strain in humans. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(11), págs.4949-4956.
- Jamuna, M. y Jeevaratnam, K. (2004). “Isolation and characterization of lactobacilli from some traditional fermented foods and evaluation of the bacteriocins” *J Gen Appl Microbiol* 50: 79–90.

- Jiang, T., Mustapha, A. y Savaiano, D.A. (1996). Improvement of lactose digestion in humans by ingestion of unfermented milk containing *Bifidobacterium longum*. En: Journal of Dairy Science. Vol. 79, No.5; pag. 750 -757.
- Kaila, M., Isolauri, E., Virtanen, E., Laine, S. y Arvilommi, H. (1992). Enhancement of the circulating antibody secreting cell response on human diarrhea by a human lactobacillus strain. *Pediatr Res*.
- Kandler, O. (1983). Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek J. Microbiol. Serol.* pag:209-224.
- Karagul-Yuceer, Y., Wilson, J.C. y White, C.H. (2001). Formulations and processing of yogurt affect the microbial quality of carbonated yogurt. *Journal Dairy Science* 84(1): 543-550.
- Kiessling, G., Schneider, J. y Jahreis, G. (2002). Long-term consumption of fermented dairy products over 6 months increases HDLcholesterol. *Eur J Clin.*
- Kimball y Jhon, W. (1986). *Biología*. Cuarta edición. Adisson-ewslwy iberoamericana. pag. 638-649.
- Konowalchuk, J., Speirs, J.I. y Stavric S. (1977). Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. *Infect.Immun.*, 18, 775-779.
- Langhendries, J.P., Detry, J., Van Hees, J. y Lamboray, J.M. (1995). Effect of a fermented infant formula containing viable *bifidobacterial* on the fecal flora composition and pH of healthy full-term infants. *J Pediatr Gastroenterol*.
- Lilly, M. y Stillwell, R., (1965). Probiotics: Growth-Promoting Factors Produced by Microorganisms. *Science*, 147(3659), pág.747 - 748.
- Londoño, O.M. (2006). Aprovechamiento del suero ácido de queso doble crema para la elaboración de quesillo utilizando tres métodos de complementación de acidez con tres ácidos orgánicos. *Revista Perspectivas en nutrición humana*. Número 16. Julio-Diciembre de 2006 págs. 11-20.
- Lucey, J. A., Johnson, M. E. y Horne, D. S. (2003). Invited review: Perspectives on the basis of the rheology and texture properties of cheese. *Journal of Dairy Science*. Citado por: Influence of pH and NaCl on rheological properties of rennet-induced casein gels made from UF concentrated skim milk A.O. Karlsson, R. Ipsen, Y. Ardo. *Journal of Dairy Science*, 85, 281-294. p. 1054.
- Lyons, R.W. y Andriole, V.T. (1971). Cephalexin: clinical and laboratory studies. *Yale J Biol Med*.
- MacDougall, D.B. (2002). *Colour in food: improving quality*. CRC Press, Boca Ratón, FL, USA.
- MacFaddin, J.F. (2000). *Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria*. 3rd ed. Philadelphia:Lippincott Williams and Wilkins. pag. 363-7.

- Madigan, M., Martinko, J. y Parker, J. (2003). *Biología de los microorganismos*. 10ed. Southern Illinois University Carbonale.
- Madigan, Michael, T., Martinko, Jhon, M., Parker y Jack. (2000). *Biology of Microorganisms*. Southern Illinois University Carbondale. Ninth Edition. Pag. 50-72.
- Majamaa, H., Isolauri, E., Saxelin, M. y Vesikara, T. (1995). Lactic acid bacteria in the treatment of acute rotavirus gastroenteritis. *J Pediatr Gastroenterol*.
- Makras, L., Triantafyllou, V., Fayol-Messaoudi, D., Adriany, T., Zoumpopolou, G., Tsakalidou, E., Servin, A. y De Vuyst, L. (2006). Kinetic analysis of antibacterial activity of probiotic *lactobacilli* towards *Salmonella enterica serovar Typhimurium* reveals a role for lactic acid and other inhibitory compounds. *Research in Microbiology*, 157, págs.241-247.
- Maragkoudakis, P., Miaris, C., Rojas, P., Manalis, N., Magkanari, F., Kalantzopoulos, G y Tsakalidou, E. (2006). Production of traditional Greek yoghurt using *Lactobacillus* strains with probiotic potential as starter adjuncts. *Int. Dairy J.* 16:5260.
- Marcos A. III Cumbre Internacional del Yogur. Barcelona 22-23 de Abril 2000. Editada por Danone S.A. <http://www.monografias.com/trabajos10/provi/provi.shtml#ixzz4Qhqe6GYP>
- Markosyan, A., McCluskey, J.J. y Wahl, T.I. (2009). Consumer Response to Information about a Functional Food Product: Apples Enriched with Antioxidants. *Canadian Journal of Agricultural Economics*, 57, págs.325–341.
- Mateos, J. A. (2002). Aspectos básicos de la tecnología de las leches fermentadas. En: ORTEGA, R. *Alimentos Funcionales Probióticos*. Madrid: Médica Panamericana. Cap. 6.
- Maurad, K. y Meriem, K. H. (2008). Probiotic characteristics of *Lactobacillus plantarum* strains from traditional butter made from camel milk in arid regions (Sahara) of Algeria. *Grasas y aceites*, 59(3), 218-224.
- Mayeux, J.V., Sandine, W.E. y Elliker, P.R. (1962). A selective médium for detecting leuconostoc organisms in mixed strain cultures. *Journal Dairy Science*.
- Mayra-Makinen, A. y Bigret, M. (1993). Industrial use and production of lactic bacteria. En: S. Salminen y A. von Wright; *lactic acid bacteria*. Ed. Marcel Decker, New York. EEUU.
- McCray, S., (2003). Lactose intolerance: Considerations for the clinician. *Practical Gastroenterology*. Nutrition support in Gastroenterology, pág.21-39.
- McLeod, A., Ludvig Nyquist, O., Snipen, L., Naterstad, K. y Axelsson, L. (2008). Diversity of *lactobacillus sakei* strains investigated by phenotypic and genotypic methods. *Systematic and Applied Microbiology*, 31, págs.393–403.
- Meier, R., Burri, E. y Steuerwald, M. (2003). The role of nutrition in diarrhea syndrome. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*.

- Mejía, J.A., Chacón, Z., Guerrero, B., Otoniel, J. y López, G. (2007). Obtención de Cepas de *Lactobacillus*. Caracterización in vitro como Potenciales Probióticas. Revista Científica. 2: 178-185.
- Mercenier, A., Gaskins, R., Berg, R.D., Corthésy, B., Delespesse, G., Gill, H.S., Grangette, C., Pouwels, P.H., Scott, F.W. y Von der Weid, T. (2002) Probiotics and the Immune System-Position Paper. Disponible desde:<<http://www.isapp.net/docs/immune.pdf>>. [Acceso Setiembre 2016].
- Metchnikoff, E. (1908). The prolongation of life, 1ª ed. Nueva York: Putnam Sons, 19.
- Midolo, P.D., Lambled, J.R., Hull, R., Luo, F. y Grayson, M.L. (1995). *In vitro* inhibition of *Helicobacter pylori* NCTC 11637 by organic acids and lactic acid bacteria. Journal of Applied Bacteriology, 79, pág.475-479.
- Mombelli, B. y Gismondo, M.R. (2000). The use of probiotics in medical practice. Int. Antimicrob Agents.
- Moncada, M. (2007). Efecto de la acidez y cantidad de suero en las características físico-químicas y sensoriales del queso Zamorano. Tesis (Ingeniero Agroindustrial en el Grado Académico de Licenciatura). Honduras, 41p.
- Montesinos, R. (2003). Especificación cromática de gama de colores usados en la industria del calzado. Universidad de Alicante. Alicante, ESP.
- Mulabagal, V., Ngouajio, M., Zhang, Y., Gottumukkala, A.L. y Nair, M.G. (2010). *In vitro* evaluation of red and green lettuce (*Lactuca sativa*) for functional food properties. Food Chemistry, 118, págs.300–306.
- Muller, H.G. (1977). Introducción a la reología de los alimentos. Madrid (España): Acribia. pag. 8.
- Murch, S.H. (2001). Toll of allergy reduced probiotics. Lancet 357:1057-1059.
- Nataro, J.P. y Kaper, J.B. (2008). Diarrheagenic *Escherichia coli*. Clin. Microbiol. Rev., 11, 142–201.28.
- Novoa, C.C.F. y Rodriguez, C.A. (1994). Guía para producir quesos colombianos. Banco Ganadero ISBN: 9589406017 v. 1 pag. 140.
- Nowroozi, J., Mirzaii, M. y Norouzi, M. (2004). “Study of *Lactobacillus* as probiotic bacteria” Iranian J Publ Health 33:1 -7.
- O’Brien, A.D. y Laveck, G.D. (2003). Purification and characterization of a *Shigella dysenteriae* type 1-liketoxin produced by *Escherichia coli*. Infect. Immun., 40, 675–683.

- Oliszewski, R., Cisint, J. C., y Núñez de Kairúz, M. (2007). Manufacturing characteristics and shelf life of Quesillo, an Argentinean traditional cheese. *Food control*, 18(6), 736-741.
- Olivares, M., Díaz-Roperó, M.P., Martín, R., Rodríguez, J.M. y Xaus, J. (2006). Antimicrobial potential of four *Lactobacillus* strains isolated from breast milk. *Journal of Applied Microbiology*, 101(1), pág.72-79.
- Ouwehand, A.C., Lagstrom, H., Suomalainen, T. y Salminen, S. (2002). Effect of probiotics on constipation, fecal azoreductase activity and fecal mucin content in the elderly. *Ann Nutr Metab* 46: 159-16.
- Oyetayo, V., Adetuyi, F. y Akinyosoye, F. (2003). "Safety and protective effect of *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* used as probiotic agent *in vivo*" *African Journal of Biotechnology* 2: 448-452.
- Padola, N.L., Sanz, M.E., Lucchesi, P.M., Blanco, J.E., Blanco, J., Blanco, M., Etcheverría, A., Guillermo, H.A. y Parma, A.E. (2012). First isolation of the enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O145:H- from cattle in feedlot in Argentina. *BMC Microbiología* 2(1): 6.
- Pardio, V.T., Krzysatof, N., Waliszewski, K.N. y Robledo, G. (1994). Los probióticos y su futuro. *Arch Latinoam*.
- Pedler, S.J. y Bint, A.J. (1985). Comparative study of amoxicillin-clavulanic acid and cephalexin in the treatment of bacteriuria during pregnancy. *Antimicrob Agents Chemother*.
- Penna, F.J. (1998). Diarrea y probióticos. Simposio sobre utilidad de los probióticos en el manejo de las diarreas. *Rev Enfer Infec Ped* XI (6):182.
- Pérez, A. (2005). Elaboración de un yogurt firme saborizado con coco. Tesis Ing. Agr. Universidad Central de Venezuela. Maracay, Venezuela. 80 pp.
- Perez, MA. y Echeverry, S. (2015). Análisis microbiológico de alimentos preparados en la vía pública en los alrededores de la Universidad Surcolombiana mediante el estudio de coliformes (Tesis de pregrado). Universidad Surcolombiana. Neiva-Colombia.
- Prescott, L.M., Harley, J.P. y Klein, D.A. (1999). *Microbiología*. 4a ed., Ed. McGraw-Hill Interamericana. Zaragoza, España. pp. 515-518.
- Ramírez, J. y Rodríguez, A. (2012). Caracterización del quesillo colombiano por espectrocolorimetría. *Vitae*, vol. 19, No. 2, pp.178-185.
- Ramírez Navas, J.S. (2010). Espectrocolorimetría: Caracterización de la leche y quesos. *Tecnol LacT Latinoam*. Págs.: 52-58.
- Ramírez, A. (2007). Obtención de harinas de frutas tropicales. Utilización en productos para regímenes especiales de alimentación. Tesis Doctoral. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela. 400pp.

- Ramírez, C. y Vélez, J.F. (2012). Quesos frescos: propiedades, métodos de determinación y factores que afectan su calidad.
- Reddy, B.S. (1998). Prevention of colon cancer by pre- and probiotics: Evidence from laboratory studies. *Brit J Nutrition* 80: 219-22.
- Reid, G. (2001). Probiotic agents to protect the urogenital tract against infection. *Am J Clin Nutr* 73 (Suppl.): 437-44.
- Reid, G. (2002). Burton, J. Use of *Lactobacillus* to prevent infection by pathogenic bacteria. *Microbes Infect* 4: 319-32.
- Rembecken, B.J., Snelling, A.M., Hawkey, P.M., Chalmers, D.M. y Axon, A.T.R. (1999). Non-pathogenic *Escherichia coli* versus mesalazine for the treatment of ulcerative colitis: A randomised trial. *Lancet* 354: 635-639.
- Reque, E., Pandey, A., Franco, S. y SoccoL, C. (2000). "Isolation, identification and physiological study of *Lactobacillus fermentum* lpb for use as probiotic in chickens" *Brazilian Journal of Microbiology* 31:303-307.
- Roberfroid, M.B. (2000). Prebiotics and probiotics: are they functional foods? *Am J Clin Nutr* 71:1682S-7S.
- Rodríguez, G. (2007). Aislamiento e identificación de bacterias ácido lácticas a partir de leche cruda y queso Paipa elaborado en los municipios de pacho (Cundinamarca) y Belen (Boyacá). Bogotá, 80 p. Tesis (Zootecnista). Universidad de la Salle. Facultad de Zootecnia.
- Rokka, S., Pihlanto, A., Korhonen, H. y Joutsjoki, V. (2006). *in vitro* growth inhibition of *Helicobacter pylori* by *lactobacilli* belonging to the *lactobacillus plantarum* group. 2006. *Lett Appl Microbiol*, 43(5), págs.508-513.
- Roos, K., Grahn Hakansson, E. y Holm, S. (2001). Effect of recolonization with 'interfering' streptococci on recurrences of acute and secretory otitis media in children: Randomised placebo-controlled trial. *BMJ* 322: 1-4.
- Ross, L.J. y Jean, C. (1995). Introducción a la bioquímica y tecnología de los alimentos. Impreso en Zaragoza, España.
- Rugama, F. y Castillo, Y. (2010). Un enfoque práctico para la inocuidad alimentaria. Universidad Nacional de Ingeniería. UNI – Norte.
- Russell, A.D. y Fountain, R.H. (1971). Aspects of the mechanism of action of some cephalosporins. *J Bacteriol*.
- Rutgeerts, P. (2003). Modern therapy for inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol Suppl*

- Saarela, M., Mogensen, G., Fondén, R., Mättö, J. y Mattila-Sandholm, T. (2000). Probiotic bacteria: Safety, functional and technological properties. *J Bio- technol*
- Saavedra, J.M., Bauman, N.A., Dung, I., Perman, J.A. y Yolken, R.H. (1994). Feeding of *Bifidobacterium bifidum* and *Streptococcus thermophilus* to infants in hospital for prevention of diarrhoea and shedding of rotavirus. *Lancet* 344: 1046-104.
- Saint-eve, A., Levy, C., Martin, N. y Souchon, I. (2006). Influence of proteins on the perception of flavored stirred yogurts. *Journal of dairy Science* 89(1): 922-933.
- Sakamoto, I., Igarashi, M., Kimura, K., Takagi, A., Miwa, T. y Koga, Y. (2001). Suppressive effect of *Lactobacillus gasseri* OLL2716 (LG21) on *Helicobacter pylori* infection in humans. *J Antimicrob Chemother* 47: 709-710.
- Salminen, S., Nybom, S., Meriluoto, J., Collado, M.C. y Vesterlund, S. (2010). Interaction of probiotics and pathogens - Benefits to human health? *Current Opinion in Biotechnology*, 21, págs.157-167.
- Sanders, M.E. (2000). Considerations for use of probiotic bacteria to modulate human health. *J Nutr* 130: 384-39.
- Sanz, Y., Hernández, M., Ferrús, M.A. y Hernández, J. (1998). Characterization of lactobacillus sake isolates from dry-cured sausages by restriction fragment length polymorphism analysis of the 16S rRNA gene. *Journal of Applied Microbiology*, 4, págs.600-606.
- Savaiano, D.A., AbouElAnouar, A., Smith, D.E. y Levitt, M.D. (1984). Lactose malabsorption from yogurt, pasteurized yogurt, sweet acidophilus milk and cultured milk in lactase-deficient individuals. *Am J Clin Nutr* 40:1219:23.
- Schiffirin, E.J., Rochat, F., Link-Amster, H., Aeschmann, J.M. y Donnet-Hughes, A. (1995). Immunomodulation of human blood cells following the ingestion of lactic acid bacteria. *J Dairy Sci* 78: 491-497.
- Schmidt, C.A.P., Pereira, C., Dos Anjos, G. y Lucas, S.D.M. (2012). Formulação e avaliação sensorial hedônica de iogurte com polpa de Acerola. *Revista Eletrônica Científica Inovação e Tecnologia* 1 (5): 10-14.
- Siitonen, S., Vapaatalo, H., Salminen, S., Gordin, A. y Saxelin, M. (1990). Effect of *Lactobacillus* GG yoghurt in prevention of antibiotic associated diarrhoea. *Ann Med* 22: 57-59.
- Singh, N., Gayowski, T. y Yu. (1995). Trimethoprim-sulfamethoxazole for the prevention of spontaneous bacterial peritonitis in cirrhosis: a randomized trial. *Ann Intern Med* 122:595;8.
- Smego, R.A., Moeller, M.B. y Gallis, H.A. (1983). Trimethoprim-sulfamethoxazole therapy for *Nocardia* infections. *Arch Intern Med*; 143:711;8

- Smita, S., Pawas, G., Rameshwar, S. y Knut, J. (2009). Application of molecular identification tools for *Lactobacillus*, with a focus on discrimination between closely related species: A review. *LWT - Food Science and Technology*. 4 2, 448–457.
- Stanley, G. (1998). Microbiología de los productos lácteos fermentados. En: R. Early; Tecnología de los productos lácteos. Segunda edición. Editorial Acribia ZaragozaEspaña.
- Stein, D.S., Stevens, R.D., Terry, D. Laizure, S.C., Plate, S., Lancaster, D.J., Weems, J.J. y William, C.L. (1991). Use of low-dose trimethoprim-sulfamethoxazole thrice weekly for primary and secondary prophylaxis of *Pneumocystis carinii* pneumonia in human immunodeficiency virus-infected patients. *Antimicrob Agents Chemothe* 1991;35:1705:9.
- Strockbine, N.A., Wells, J.G., Bopp, C.A. y Barrett, T.J. (2008). Overview of detection and subtyping methods. In: *Escherichia coli* O157:H7 and Other Shiga Toxin-Producing *E. coli* Strains, Kaper J.B. & O'Brien A.D., eds. ASM Press, Washington, D.C., USA, 331–356.
- Sullivan, A. y Nord, C.E. (2002). Probiotics in human infections. *J Antimicrob Chemother* 50: 625-627.
- Tamime, A. y Robinson, R. (1991). *Yogurt Ciencia y Tecnología*, 368. Acribia, Zaragoza, España.
- Taranto, M.P., Medici, M., Perdigón, G., Ruiz Holgado, A.P. y Valdez, G.F. (1998). Evidence for hypocholesterolemic effect of *Lactobacillus reuteri* in hypercholesterolemic mice. *J Dairy Sci* 81: 2336-2340.
- Terzaghi, E. y Sandine, W. (1975). Improved medium for lactic streptococci and their bacteriophages. *Applied Microbiology*. pag. 29, 807.
- Thirabunyanon, M., Boonprasom, P. y Niamsup, P. (2009). Probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from fermented dairy milks on antiproliferation of colon cancer cells. *Biotechnol Lett*, 31, págs.571-576.
- Torres, R. (1999). *Flora intestinal, probióticos y salud*. Guadalajara. Edit Gráfica Nueva, Yakult.
- Tu, R.J., Wu, H.Y., Lock, Y.S. y Chen, M.J. (2010). Evaluation of microbial dynamics during the ripening of a traditional Taiwanese naturally fermented ham. *Food Microbiology*, 27, págs.460-467.
- Tzanetakis, N. y Litopoulou-Tzanetaki, E. (1989). Lactic acid bacteria in raw goat milk and some of their biochemical properties. *Microbiology Aliments Nutrition*. pag. 73-80.
- Urango, M.L.A. (2012). Elaboración de queso fresco semigraso, adicionado con fructooligosaccharides (FOS). <http://www.bdigital.unal.edu.co/9155/1/50915454.2012.pdf> (Consultado: Septiembre 2016).
- Urrea, J. y Sánchez, A. (1996). Producción y comercialización de leche en el departamento de Antioquia. Medellín: Secretaría de Agricultura de Antioquia; p. 325-326.

- Vélez, J. y A. (2001). Rivas, Propiedades y características del yogur. *Revista Internacional Información Tecnológica*: 12 (6), 35-42.
- Verdalet, I. (1998). Importancia de las variantes genéticas de las proteínas sobre el comportamiento quesero de leches. *Información Tecnológica*. pag. 263-271.
- Verdenelli, M.C., Ghelfi, F., Silvi, S., Orpianesi, C., Cecchini, C. y Cresci, A. (2009). Probiotic properties of *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus paracasei* isolated from human faeces. *Eur J Nutr*, 48, págs.355–363.
- Verweyen, H.M., Karch, H., Brandis, M. y Zimmerhackl, L.B. (2005). Enterohemorrhagic *Escherichia coli* infections: following transmission routes. *Pediatr Nephrol* 14(1): 73-83.
- Vesa, T.H., Marteau, P. y Korpela, R. (2000). Lactose intolerance. *J. Am. Coll. Nutr.*, 19, págs.165–175.
- Wang, W.M., Wang, K.Y., Li, S.N., Liu, C.S., Perng, D.S., Su, Y.C., Wu, D.C., Jan, C.M., Lai, C.H. y Wang, T.N. (2004). Effects of ingesting *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* containing yogurt in subjects with colonized *Helicobacter pylori*. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 80(3), págs.737-741.
- Watkinson, P., Coker, C., Crawford, R., Dodds, C., Johnston, K., McKenna, A. y White, N. (2001). Effect of cheese pH and ripening time on model cheese textural properties and proteolysis. *International Dairy Journal*. 11: 455–464.
- Wenceslao, C. M., Dick, Z., Arianna, K., Peñafiel, U. y Jaime, F. (2012). “Implementación y Validación de una Metodología Económica para la Medición de Color Aplicada en Alimentos”.
<http://www.dspace.espol.edu.ec/bitstream/123456789/21537/1/TESIS%20%20Chuchuca%20%20G.,%20Dick%20A.,%20Pe%C3%B1afiel%20J.pdf> (Consultado: Agosto de 2016).
- White, P.J. (2002). Recent advances in fruit development and ripening an overview. *Journal of Experimental Botany* 53 (377):1995-2000.
- Williams, J.W., Jr. Holleman, D.R., Samsa, G.P. y Simel, D.L. (1995). Randomized controlled trial of 3 vs 10 days of trimethoprim/sulfamethoxazole for acute maxillary sinusitis. *JAMA* 273:1015:21.
- Wilson, A.R., Sigeo, D. y Epton, H.A. (2005). Anti-bacterial activity of *Lactobacillus plantarum* strain SK1 against *Listeria monocytogenes* is due to lactic acid production. *The society for Applied Microbiology*, 99(6), págs.1516-1522.
- Wong, D. (1995). *Química de los Alimentos. Mecanismos y Teoría*. Editorial Acribia. España. 476 pp.

- Xanthopoulos, V., Pedritis, N. y Tzanetakis, N. (2001). Characterization and classification of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* strains isolated from traditional greek yogures. J. Food Sci. 66(5):747-752.
- Yuan, K.L. (2006). Microbial biotechnology. Principles and applications Second., National.
- Zamora, R. y Lucero, M. (2003). Aislamiento, Identificación y Conservación de Cultivos de Bacterias Lácticas Antagonistas de Microbiota Contaminante de Sangre de Matadero. pag. 44.
- Zhou, J.S., Gopal, P.K. y Gill, H.S. (2001). Potential probiotic lactic acid bacteria *Lactobacillus rhamnosus* (HN001), *Lactobacillus acidophilus* (HN017) and *Bifidobacterium lactis* (HN019) do not degrade gastric mucin *in vitro*. International Journal of Food Microbiology, 63, págs.81–90.
- Zúñiga, L.A., Ciro, H.J. y Osorio, J.A. (2007). Estudio de la dureza del queso Edam por medio de análisis de perfil de textura y penetrometría por esfera. Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín. Vol.60, No.1.pp.3797-3811

ANEXOS

Anexo A. Medios de Cultivo

- **Medios de cultivo líquido**

Los medios líquidos fueron distribuidos en tubos de ensayo, esterilizados a 121°C por un tiempo de 30 minutos, en autoclave y atemperados a temperatura ambiente y luego, almacenados en el refrigerador a 4°C.

- ✓ **Agua de Peptona (Merck KGaA, ref. 64271 Darmstadt, Alemania)**

Se disuelve 25,5 g en un litro de agua desmineralizada

pH : 7,0±0,2 a 25°C

Composición para un litro de agua destilada:

Peptona de Caseína	10.0	g
Cloruro sódico	5.0	g
Dihidrogeno fosfato potásico	1.5	g
Hidrogenofosfato disódico dodecahidrato	9.0	g

- ✓ **Caldo MRS (DIBICO, México)**

Se disuelve 55 g en un litro de agua desmineralizada

pH: 6,5

Composición para un litro de agua destilada:

Acetato de sodio	5.0	g
Citrato de armónico	2.0	g

Dextrosa	20.0 g
Extracto de carne	10.0 g
Extracto de levadura	5.0 g
Fosfato disódico	2.0 g
Peptona proteosa N° 3	10.0 g
Polisorbato (Tween 80)	1.0 g
Sulfato de magnesio	0.1 g
Sulfato de Manganeso	0.05 g

- **Medios de cultivo sólido**

- ✓ **Agar MRS (Merck KGaA, ref. 64271 Darmstadt, Alemania)**

Se disolvieron 68,2 g en 1 litro de agua desmineralizada se esterilizo a 121°C durante 15 minutos en autoclave y atempero a 50°C y posteriormente, se vertió en placas estériles.

pH:5,7 ± 0,2 a 25 °C

Composición para un litro de agua destilada:

Peptona de Caseína	10.0 g
Extracto de carne	10.0 g
Extracto de levadura	4.0 g
D(+) – glucosa	20.0 g
Dipotasio hidrogenofosfato	2.0 g
Tween 80	1.0 g
Diamonio hidrogenocitrato	2.0 g

Sodio acetato	5.0	g
Magnesio sulfato	0.2	g
Manganeso sulfato	0.04	g
Agar-agar	14.0	g

✓ **Simmons Citrato Agar**

Medio utilizado para la diferenciación de enterobacterias, en base a la capacidad de usar citrato como única fuente de carbono y energía.

Composición para un litro de agua.

Citrato de sodio	2,0	g
Cloruro de sodio	5,0	g
Fosfato dipotásico	1,0	g
Fosfato monoamónico	1,0	g
Sulfato de magnesio	0,2	g
Azul de bromotimol	0,08	g
Agar	15,0	g

✓ **Sim medio**

Es un medio semisólido destinado a verificar la movilidad, producción de indol y de sulfuro de hidrógeno en un mismo tubo. Es útil para diferenciar miembros de la familia Enterobacteriaceae.

Composición para un litro de agua.

Tripteína	20,0	g
Peptona	6,1	g
Sulfato de hierro y amonio	0,2	g
Tiosulfato de sodio	0,2	g

Agar

3,5 g

Anexo B. Determinación de acidez (% de ácido láctico)

Para la determinación del porcentaje de ácido láctico se utilizó:

- ❖ Se tomó 50 ml de muestra y se colocó en un vaso de precipitado.
- ❖ Se adicionó 5 gotas de fenolftaleína
- ❖ Se adicionó hidróxido de sodio 0,1N, hasta un pH de 8,2.
- ❖ Se realizó los cálculos utilizando la siguiente formula

$$\%Acidez = \frac{AxBxC}{D} x100$$

Dónde:

A= volumen de NaOH gastado en la titulación(ml)

B= Normalidad del NaOH: (0,1 eq/litro)

C= Peso molecular del ácido predominante (peso molecular del ácido láctico = 90,08 g/mol)

D= Peso de la muestra en mg.

Anexo C. Requisitos microbiológicos para queso fresco.

Requisitos	n	m	M	C
Exámenes de rutina				
Coliformes ,UFC/g(30°C)	3	1000	5000	1
Coliformes, UFC/g (45 °C)	3	50	100	1
Recuento de mohos y levaduras, UFC/g	3	500	5000	1
Exámenes especiales:				
Recuento de Estafilococos coagulasa positiva, UFC	3	100	1000	1
Detección de <i>Salmonella</i> /25 g	3	0	-	1
Detección de <i>Listeria monocytogenes</i> /25 g.	3	0	-	1

Tabla 21. Requisitos microbiológicos para queso fresco.

Donde:

n: número de muestras por examinar

m: índice máximo permisible para identificar nivel de buena calidad

M: índice máximo permisible para identificar nivel de calidad aceptable
c: número máximo de muestras permisibles con resultados entre m y M

Anexo D. Curva típica obtenida en el análisis de textura realizado con el texturometro CT3

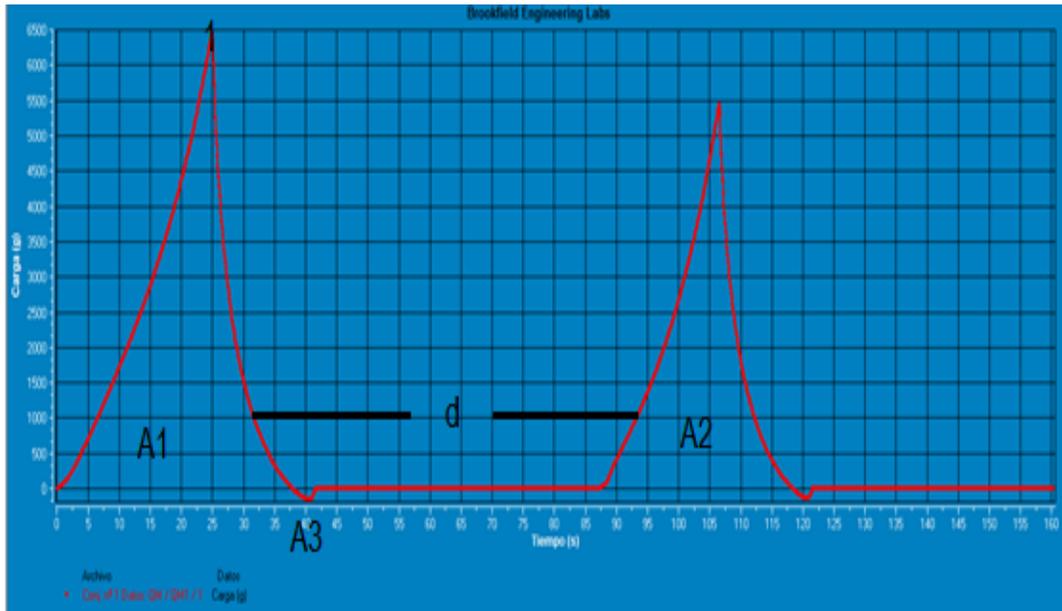


Figura 43. Curva típica obtenida del análisis de textura (Texturometro CT3)