

1-1-2007

Caracterización e identificación de los microorganismos causantes de la fermentación en el suero costeño utilizando leche de vaca de dos regiones diferentes

Alex de Jesús Pimienta Sandoval
Universidad de La Salle, Bogotá

Javier Augusto Vergara Ordogoistia
Universidad de La Salle, Bogotá

Follow this and additional works at: https://ciencia.lasalle.edu.co/ing_alimentos

Citación recomendada

Pimienta Sandoval, A. d., & Vergara Ordogoistia, J. A. (2007). Caracterización e identificación de los microorganismos causantes de la fermentación en el suero costeño utilizando leche de vaca de dos regiones diferentes. Retrieved from https://ciencia.lasalle.edu.co/ing_alimentos/20

This Trabajo de grado - Pregrado is brought to you for free and open access by the Facultad de Ingeniería at Ciencia Unisalle. It has been accepted for inclusion in Ingeniería de Alimentos by an authorized administrator of Ciencia Unisalle. For more information, please contact ciencia@lasalle.edu.co.

**CARACTERIZACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE LOS MICROORGANISMOS
CAUSANTES DE LA FERMENTACIÓN EN EL SUERO COSTEÑO UTILIZANDO
LECHE DE VACA DE DOS REGIONES DIFERENTES**

**ALEX DE JESUS PIMIENTA SANDOVAL
JAVIER AUGUSTO VERGARA ORDOGOISTIA**

**UNIVERSIDAD DE LA SALLE
FACULTAD DE INGENIERIA
INGENIERIA DE ALIMENTOS
BOGOTA D.C.
2007**

**CARACTERIZACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE LOS MICROORGANISMOS
CAUSANTES DE LA FERMENTACIÓN EN EL SUERO COSTEÑO UTILIZANDO
LECHE DE VACA DE DOS REGIONES DIFERENTES**

**ALEX PIMIENTA SANDOVAL
JAVIER AUGUSTO VERGARA ORDOGOISTIA**

**Proyecto de grado para optar al título de
Ingeniero de Alimentos**

**Director
María Clementina Cueto Vigil
MSc. en Ciencias**

**UNIVERSIDAD DE LA SALLE
FACULTAD DE INGENIERIA
INGENIERIA DE ALIMENTOS
BOGOTA D.C.
2007**

Nota de aceptación:

Presidente del jurado

Jurado

Jurado

Bogotá, 22 de agosto de 2007

CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCION	15
JUSTIFICACION	17
1. OBJETIVOS	18
1.1 OBJETIVO GENERAL	18
1.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS	18
2. MARCO TEORICO	19
2.1 LA LECHE	19
2.1.1 Definición	19
2.1.1 Composición química	19
2.1.3 Variedades comerciales de la leche	20
2.1.3.1 Leche homogenizada	20
2.1.3.2 Leche condensada	20
2.1.3.3 Leche en polvo	20
2.1.3.4 Leches fermentadas o modificadas	20
2.2 LECHE FERMENTADA	20
2.2.1 Definición	20
2.2.2 Tipos de leches fermentadas	21
2.3 SUERO COSTEÑO	22

2.3.1 Definición	22
2.3.1.1 Lactosuero	22
2.3.1.2 Calabazos	23
2.3.2 Zonas de producción	23
2.3.3 Tipos de suero costeño	23
2.3.4 Composición química	24
2.4 BACTERIAS ACIDOLACTICAS	26
2.4.1 Definición y clasificación	26
2.4.2 <i>Streptococcus</i>	27
2.4.3 <i>Leuconostoc</i>	27
2.4.4 <i>Pediococcus</i>	27
2.4.5 <i>Lactobacillus</i>	27
2.4.5.1 <i>Lactobacillus bifidus</i>	28
2.4.5.2 <i>Lactobacillus acidophilus</i>	29
2.4.5.3 <i>Lactobacillus bulgaricus</i>	29
2.4.6 Genero <i>Lactococcus</i>	29
2.5 HONGOS	30
2.5.1 Levaduras	30
2.5.2 Mohos	30

2.6 ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LAS BAL	31
2.6.1 DESCRIPCIÓN	31
2.6.2. MICROORGANISMOS INDICADORES	32
2.6.2.1 <i>Escherichia coli</i>	32
2.6.2.2 <i>Staphilococcus aureus</i>	32
3. MATERIALES Y METODOS	33
3.1 DISEÑO EXPERIMENTAL	33
3.2 OBTENCION DE MUESTRAS	34
3.3 ELABORACION DE SUERO COSTEÑO EN LABORATORIO	34
3.4 PRUEBAS PRELIMINARES	35
3.4.1 Preparación de los medios	36
3.4.2 Materiales y equipos	36
3.4.3 Diluciones seriadas	36
3.4.4 Recuento de microorganismos	37
3.5 ANALISIS FISICOQUIMICO DE LOS FERMENTOS	37
3.6 DETERMINACION DEL CRECIMIENTO DE LAS BAL	37
3.7 METODOS DE SIEMBRA	37
3.8 METODOS DE AISLAMIENTOS Y CONSERVACION DE LAS CEPAS	38
3.9 IDENTIFICACION DE LAS BACTERIAS ACIDOLACTICAS POR METODO API 50 CHOL	38
3.10 IDENTIFICACION DE LEVADURAS POR EL METODO API 20 AUX	39

3.11 DETERMINACION DE LA CANTIDAD DE MICROORGANISMOS POR ESPECTROFOTOMETRIA.	39
3.12 MEJORAMIENTO DE LAS CONDICIONES DE ELABORACIÓN DEL SUERO COSTEÑO.	40
4. RESULTADOS Y ANALISIS	41
4.1 PRUEBAS PREELIMINARES	41
4.2 ANALISIS FISICOQUIMICOS DE LOS FERMENTOS	42
4.3 DETERMINACION DEL CRECIMIENTO DE LAS BACTERIAS LACTICAS	43
4.4 AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE LA CEPAS	44
4.4.1 Aislamiento e identificación de las BAL	44
4.4.2 Aislamiento e identificación de levaduras	50
4.5 DETERMINACION DE LA CONCENTRACION DE MICROORGANISMOS POR ESPECTROFOTOMETRIA.	
4.5.1. Recuento de levaduras en diferentes concentraciones	53
4.5.2. Recuento de BAL en diferentes concentraciones	55
4.6. DETERMINACION FINAL DE LAS PROPIEDADES FISICOQUIMICAS DEL SUERO COSTEÑO UTILIZANDO DIFERENTES CONCENTRACIONES DE INOCULOS MICROBIANOS	56
4.7 ANALISIS ORGANOLEPTICO DE LOS FERMENTOS OBTENIDOS	56
4.8 ANALISIS MICROBIOLOGICOS DEL SUERO COSTEÑO FINAL ELABORADO EN EL LABORATORIO	57

CONCLUSIONES	59
RECOMENDACIONES	60
BIBLIOGRAFIA	62
ANEXOS	64

LISTA DE GRAFICAS

	Pág.
Gráfico 1. Comportamiento de las bacterias acidolácticas en el fermento 1 utilizando leche de Sucre	43
Gráfico 2. Comportamiento de las bacterias acidolácticas En el fermento 2 utilizando leche de Cundinamarca	44
Gráfico 3. Distribución de géneros de bacterias acidolácticas identificadas.	47

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Composición química de la leche	19
Tabla 2. Tipos de leches fermentadas	20
Tabla 3. Clasificación de leches fermentadas y del suero costeño	24
Tabla 4. Características fisicoquímicas del suero costeño	24
Tabla 5. Géneros principales de las bacterias acidolácticas	26
Tabla 6. Levaduras asociadas con derivados lácteos	30
Tabla 7. Bacteriocinas identificadas a nivel industrial	31
Tabla 8. Diseño de procedimientos	33
Tabla 9. Propiedades fisicoquímicas de las muestras de leche cruda	41
Tabla 10. Métodos de recuento realizados a las muestras de leche cruda	41
Tabla 11. Análisis fisicoquímicos de los fermentos	42
Tabla 12. Control de crecimiento de los microorganismos en los fermentos	43
Tabla 13. Aislamiento de bacterias acidolácticas y levaduras en los tiempos de fermentación	47
Tabla 14. Especies de bacterias acidolácticas identificadas en los fermentos	49
Tabla 15. Especies de levaduras identificadas en los fermentos	49
Tabla 16. Lecturas de patrones de levadura	51
Tabla 17. Lecturas de patrones de bacterias acidolácticas	51

Tabla 18. Primera lectura de concentración de bacterias acidolácticas	52
Tabla 19. Primera lectura de concentración de levaduras	52
Tabla 20. Segunda lectura de concentración de levaduras	52
Tabla 21. Segunda lectura de concentración de bacterias acidolácticas	53
Tabla 22. Conteo de levaduras para determinar la carga microbiana según valores de absorbancia	54
Tabla 23. Conteo de bacterias acidolácticas para determinar la carga microbiana según valores de absorbancia	55
Tabla 24. Propiedades fisicoquímicas finales de los fermentos según Concentraciones de inóculo microbiano.	56
Tabla 25. Comparación organoléptica de los fermentos mejorados	57
Tabla 26. Análisis microbiológico del fermento mejorado.	58

LISTA DE DIAGRAMAS

	Pág.
Diagrama 1. Proceso de elaboración del Suero costeño según ICTA, 1988.	25
Diagrama 2. Elaboración de suero costeño en el laboratorio	34
Diagrama 3. Diseño de procedimiento para el aislamiento e identificación de los microorganismo.	35
Diagrama 4. Proceso de elaboración del suero costeño en condiciones mejoradas	40

LISTA DE FOTOS

	Pág.
FOTO 1. Calabazo o prototipo fermentativo	23
FOTO 2. Ejemplo de algunos azúcares reductores de los 10 primeros de la galería API 50 CHL	38
FOTO 3. Cepas aisladas observadas bajo microscópio de contraste de fase (x100)	46

RESUMEN

En el presente proyecto de investigación se elaboró suero costeño a partir de dos tipos de leche procedentes de los departamentos de Sucre y Cundinamarca.

En primera instancia se analizaron microbiológica y fisicoquímicamente las dos muestras de leche de las dos regiones, para determinar las propiedades organolépticas y tener en cuenta su influencia en la preparación de los fermentos. Posteriormente se realizaron los fermentos bajo condiciones controladas, a las 24 horas siguientes se aislaron e identificaron bacterias ácido lácticas (BAL) y levaduras presentes en el "Suero costeño" por los métodos API 50 CHL para BAL y API 20 AUX para levaduras, en las cuales se detectaron las bacterias *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactococcus lactis lactis* y las levaduras *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Cryptococcus laurenti*, causantes de la fermentación de las muestras. Luego por medio del método de espectrofotometría se determinaron las concentraciones adecuadas a utilizar en los medios de leche pasteurizada.

Una vez determinada la concentración establecida tanto para las bacterias ácido lácticas como para las levaduras se elaboró un producto con materia prima controlada (leche pasteurizada), esto con el fin de verificar que las condiciones del proceso cumplan con los requerimientos de calidad higiénica y así concluir que se elaboró suero costeño con procedimientos artesanales con los estándares sanitarios y obtener un producto de buena calidad apto para los consumidores sin poner en riesgo su salud.

SUMMARY

In the Present investigation project was elaborated "suero costeño" starting from two types of milk coming from the departments of Sucre and Cundinamarca.

At first instance microbiological and physicochemical the two samples of milk of the two regions were analyzed, to determine the organoleptic estates and to keep in mind their influence in the preparation of the ferments. Later on they were carried out the ferments under controlled conditions, at the 24 following hours they were isolated and they identified bacterias lactic acid (BAL) and present yeasts in the "suero costeño" for the methods API 50 CHL for BAL and API 20 AUX for yeasts, in those which the bacterias *Lactobacillus brevis* was detected, *Lactobacillus plantarum*, *Lactococcus lactis lactis* and the yeasts *Cándida glabrata*, *Cándida tropicalis*, *Cryptococcus laurenti*, causing of the fermentation of the samples. Then by means of the espectrofotometría method of they determined the appropriate concentrations to use in the means of pasteurized milk.

Once certain the established concentration so much for the bacterias lactic acid like for you elaborates a product with controlled raw material (milk pasteurized), the end of verifying that the conditions of the process fulfil the requirements of hygienic quality and this way to conclude that coastal serum was elaborated with handmade procedures fulfilling the sanitary standards and obtaining a capable product of good quality for the consumers without putting in risk its health.

INTRODUCCIÓN

El suero costeño es una leche fermentada que hace parte de la identidad gastronómica de la región Caribe, constituyéndose en un producto básico de la canasta familiar, consumido por los diferentes estratos de la sociedad. A pesar de que su origen data desde hace cien años se conoce poco en el ámbito científico, sobre sus características microbiológicas, fisicoquímicas y su proceso de fermentación.

Los conceptos básicos de la nutrición están experimentando un cambio significativo en la actualidad, pues el concepto clásico de "nutrición adecuada" definida como aquella que aporta a través de los alimentos los nutrientes básicos como proteínas, grasas, vitaminas y minerales, suficientes para satisfacer las necesidades orgánicas particulares, que tienden a ser sustituida por el de concepto "nutrición óptima", que incluye, además de la definición anterior, la potencialidad de los alimentos para promocionar un mejor estado de salud y bienestar, reduciendo el riesgo de desarrollar enfermedades, por tanto en este ámbito aparecen los llamados "alimentos funcionales".

Un alimento se considera funcional porque además de destacarse por sus propiedades nutritivas contiene ciertos elementos, cuyo consumo diario dentro de una dieta equilibrada contribuye a mantener o mejorar las necesidades nutricionales.

Un panel de expertos coordinado por el ILSI (International Life Sciences Institute), fue el primero en elaborar en 1999 un documento consenso en el cual se definía lo que es un alimento funcional: *"alimento funcional es aquel que contiene un componente, nutriente o no nutriente, con efecto selectivo sobre una o varias funciones del organismo, con un efecto añadido por encima de su valor nutricional y cuyos efectos positivos justifican que pueda reivindicarse su carácter funcional o incluso saludable"*.

Según esta definición los alimentos funcionales son todos aquellos alimentos naturales o modificados y enriquecidos con, ácidos grasos, vitaminas, minerales, sustancias antioxidantes, fibra etc. que aportan efectos beneficiosos para la salud. Dentro de esta definición entrarían también los productos que contienen probióticos (bacterias vivas que proporcionan efectos beneficiosos para la salud) como el yogur, leches fermentadas, quesos, suero costeño y otros derivados lácteos.

La mayoría de los alimentos de elaboración casera o artesanal siempre son vistos hoy en día como alimentos de baja calidad higiénica, dada esta tendencia estos alimentos están amenazados a desaparecer; de tal manera se busca

fabricar o elaborar estos productos bajo tecnologías adecuadas que permitan que estos productos cumplan con las normas higiénico sanitarias haciéndolos mas confiables para su consumo.

El presente proyecto de investigación denominado "Caracterización e identificación de los microorganismos causantes de la fermentación en el suero costeño utilizando leche de vaca de dos regiones diferentes" nos permitirá elaborar un producto artesanal que pueda conservar la propiedades fisicoquímicas iniciales pero con un alto grado de inhibición de los microorganismos indeseables.

JUSTIFICACIÓN

Debido a las necesidades de comercializar y dar a conocer sus productos, se observó en la Costa Atlántica la posibilidad de desarrollar un producto fermentado a partir de la leche de vaca, autóctono y tradicional, que contenga las características nutricionales, microbiológicas y fisicoquímicas necesarias para ofrecer un producto de calidad higiénica que pueda ser reconocido a nivel nacional.

Por tal motivo, se pensó en el suero costeño, un producto que lleva muchos años siendo elaborado por generaciones de una forma artesanal y poco conocida. Se decidió estudiar las características del proceso de fermentación que conllevan a la elaboración de este producto, para identificar los microorganismos responsables de dicha fermentación, lo mismo que controlar las etapas del proceso permitiendo dar origen a un producto con un valor agregado más amplio.

De esta forma se pretende estandarizar un proceso de elaboración del suero costeño identificando los microorganismos presentes y su comportamiento en dos tipos de leche, una procedente del departamento de Sucre y otra del departamento de Cundinamarca, analizando las condiciones fermentativas y de esta forma observar cual de los dos productos finales se comporta en mejores condiciones y sirva como coadyuvante en la reconstitución de la flora intestinal mejorando la digestión.

1. OBJETIVOS

1.1 OBJETIVO GENERAL

Caracterizar e identificar los microorganismos causantes de la fermentación en el suero costeño a partir de dos tipos diferentes de leche de vaca procedentes de los departamentos de Sucre y Cundinamarca.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar las propiedades fisicoquímicas de las dos muestras de leche cruda correspondiente a las regiones de Cundinamarca y de Sucre.
- Identificar los microorganismos predominantes causantes de la fermentación durante la elaboración del suero costeño utilizando las muestras de leche cruda de las dos regiones.
- Comparar las propiedades fisicoquímicas y microbiológicas del suero costeño elaborado con leche cruda procedentes de las dos regiones.
- Mejorar las condiciones del proceso de elaboración del suero costeño, permitiendo así obtener un producto de buenas condiciones higiénica muchas mas confiable para los consumidores.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 LA LECHE.

2.1.1 Definición.

La leche es un líquido blanco, opaco, de sabor ligeramente dulce. Su densidad, o peso específico, tiene un valor promedio casi constante. Desde un punto de vista biológico, la leche es el producto de la secreción de las glándulas que a tal fin tienen las hembras mamíferas, cuya función natural es la alimentación de los recién nacidos. Desde el punto de vista fisicoquímico, la leche es una mezcla homogénea de un gran número de sustancias (lactosa, glicéridos, proteínas, sales, vitaminas, enzimas etc.) que están unas en emulsión (la grasa y sustancias asociadas), algunas en suspensión (las caseínas ligadas a sales minerales) y otras en disolución verdadera (lactosa, vitaminas hidrosolubles, proteínas del suero, sales, etc.). La grasa, que es el componente que más varía entre razas, es inversamente proporcional a la cantidad de leche producida¹.

2.1.2 Composición química.

La leche está compuesta principalmente por agua, proteínas, grasas, carbohidratos, vitaminas y minerales, lo que la hace un alimento de alto valor nutritivo, sobre todo en la alimentación infantil. (ver tabla1)

Tabla 1. Composición química de la leche.

Componentes	Características
Agua	La leche es 90% de agua,
Proteína	La leche contiene entre 3 y 4 % de proteína, dependiendo en la raza de la vaca. Leche con mucha grasa también tiene mucha proteína, y viceversa
Grasa	La grasa está entre 3.5 y 5.25%, dependiendo en la raza de la vaca y su nivel de nutrición. La grasa da a la leche un color amarillo, cuando esta cuenta con poco contenido graso entonces se torna más blanca
Lactosa	La lactosa es el carbohidrato de la leche y esta presente en un 5%, da a la leche su sabor dulce y forma el 52% de los sólidos en leche.
Minerales y vitaminas	<ul style="list-style-type: none">• <i>Vitamina A</i>: Protege contra enfermedades y mantiene la• <i>Vitamina D</i>: Ayuda a absorber el calcio.• <i>Calcio</i>: Regula el corazón, ayuda a los nervios, y hace huesos y dientes fuertes.

Fuente: Veisseyre, 1988.

¹ Tecnología de la leche, A. Revilla

2.1.3 Variedades comerciales de la leche.

2.1.3.1 Leche homogenizada

La leche homogeneizada es sometida a algún tratamiento físico, antes o después de la pasteurización, para romper los glóbulos de grasa que, una vez subdivididos, no se separan con facilidad del resto del líquido. La leche homogeneizada no acumula nata en la superficie, aunque quede en reposo durante 48 horas.

2.1.3.2 Leche condensada.

Se elimina agua operando a presión reducida (aproximadamente 0,5 atmósfera de presión) hasta obtener un líquido espeso, de densidad: 1,3 g/ml. Se le agrega 30% de azúcar si la materia prima es leche entera, porcentaje que se eleva al 50% para leche descremada. La disolución en agua de 350 - 400 g de leche condensada regenera un litro de leche líquida.²

2.1.3.3 Leche en polvo.

Exige deshidratación al vacío para no alterar sus componentes. Envasada herméticamente la leche en polvo, se conserva bien. Excepcionalmente pueden enranciarse las grasas. Con 125 g de leche en polvo se reconstruye un litro de leche líquida, es decir, cada kilogramo del producto desecado rinde 8 litros de leche para el consumo.³

2.1.3.4 Leches fermentadas o modificadas

Procedimientos químicos y biológicos provocan cambios en la composición de la leche. Las leches maternizadas y los alimentos para lactantes son hidrolizados con fermentos especiales que desdoblan químicamente a la caseína y los restantes prótidos, que de esta manera son digeridos sin dificultad.⁴

2.2 LECHES FERMENTADAS.

² Tecnología de la leche, A. Revilla

³ Et Al

⁴ Et Al

2.2.1 Definición.

Constituye un grupo especial entre las leches modificadas, es el producto resultante de una fermentación según sea el origen de la leche y la bacteria responsable de la fermentación, se obtienen una serie de productos de diferentes sabores, típicos de cada país.

Dentro de la denominación de leche fermentada se incluyen todos aquellos productos que proceden de la leche, generalmente de vaca, sometida a un proceso de fermentación por adición de microorganismos que la acidifican y espesan hasta darle el sabor y la consistencia típicas de este producto. Bajo la denominación específica de yogur se incluyen las leches fermentadas fundamentalmente con *S. thermophilus* y *L. bulgaricus*. Existen otras que llevan otros microorganismos que identifican al producto como los *L. casei imunitass* o *Bifidobacterium bifidus*. Las leches fermentadas distintas de los yogures carecen de una regulación específica y han de atenerse a la norma genérica de productos lácteos.

En la elaboración de estos productos se parte de leche parcial o totalmente desnatada, a la que se le añaden diversos componentes (leche en polvo o proteínas lácteas, azúcar, aditivos...), que determinarán su valor energético total, así como su contenido en nutrientes energéticos (grasas, proteínas e hidratos de carbono).

Se aportan datos referentes a leches fermentadas y yogures naturales. Cien gramos aportan entre 60 y 90 calorías (la diferencia radica en la adición o no de azúcar), en torno a un 2% de grasa y aproximadamente un 5% de azúcares.⁵

2.2.2 Tipos de leches fermentadas

En la tabla 2 se presentan varios subproductos elaborados con leches fermentadas conocidas comercialmente, en las cuales se muestran sus características organolépticas y los microorganismos fermentadores más conocidos en el medio, los cuales hacen de estos su importancia desde el punto de vista microbiológico, entre estas se encuentran:

⁵ Lactología Técnica, R. Veisseyre.

Tabla 2. Tipos de leches fermentadas

Tipos	Microorganismos fermentadores	Características
Quesos (madurados)	<i>Cultivos iniciadores lácticos</i>	Productos de pasta dura de sabor y aroma característico.
Kéfir	<i>Lactococcus lactis, Lactobacillus delbrueckii sub. Bulgaricus, Torula spp.</i>	Es una bebida batida hecha a partir de la leche fermentada con una mezcla compleja de bacterias y levaduras, las cuales producen CO ₂ alcohol y compuestos aromáticos en pequeñas cantidades dándoles sabor ácido y gaseoso.
Kumis	<i>Lactococcus lactis, Lactobacillus delbrueckii sub. Bulgaricus, Torula spp.</i>	Es un producto de olor y sabor característico, mas ácido que el yogurt. Importante regular la flora intestinal.
Yogurt	<i>Lactobacillus delbrueckii sub. Bulgaricus, Streptococcus thermophilus</i>	Es un producto ácido, debido al ácido fólico producido durante la fermentación que llevan a cabo las bacterias termofilas. De importante valor nutritivo, de gran digestibilidad. Puede contener fruta o no.

Fuente: LEVEAU, Y. y BOUIX, M. Microbiología industrial. Microorganismos de interés industrial

2.3 SUERO COSTEÑO

2.3.1 Definición

El suero costeño tiene muchas definiciones establecidas en diferentes textos, a continuación mencionaremos algunas:

- El suero costeño es un derivado lácteo obtenido mediante la acidificación de la leche a través de la fermentación. Es elaborado de acuerdo con el esquema tecnológico desarrollado y difundido en la región de la costa atlántica, usualmente de le conoce con las denominaciones de suero "ATOYABUEY" y "SUERO SALADO".⁶
- El suero costeño es un producto lácteo fermentado elaborado con leche de vaca y obtenido por separación mecánica del lactosuero.⁷
- El suero costeño puede definirse como un producto de la fermentación espontánea de leche de vaca.

⁶ CHAMIE 1999

⁷ SERPA 1998

2.3.1.1 Lactosuero

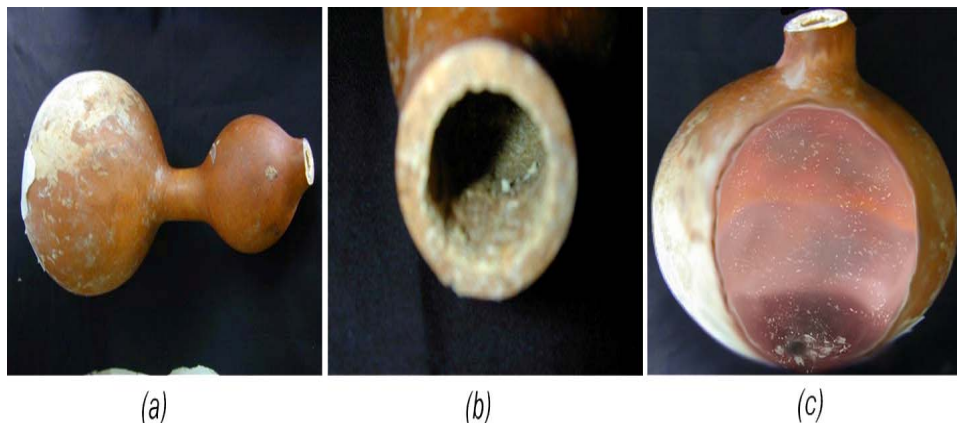
El suero de leche es un subproducto de la industria lechera y sus principales componentes son la lactosa (44 - 52 g/L), las proteínas (6 - 8 g/L) y las sales minerales (4.3 - 9.5 g/L). Aproximadamente el 47% de los 115 millones de toneladas de suero que se producen anualmente en el mundo se desechan en ríos, lagos u otros cuerpos de agua, en plantas de tratamiento de aguas residuales o en el suelo, lo que representa una pérdida significativa de recursos y ocasiona serios problemas de contaminación debido a que el suero de leche genera una demanda química de oxígeno (DOB) y una demanda química de oxígeno (DQO) muy altas, de 40.000 a 60.000 ppm y de 50.000 a 80.000 ppm, respectivamente. Más del 90% de la demanda bioquímica de oxígeno generada por el suero de leche se debe a la lactosa.

El uso del suero de leche como sustrato de fermentación para la producción de biomasa de levaduras tiene la ventaja de que es un proceso simple de tratamiento facilitando la descarga final del suero ya que se reduce significativamente la carga de contaminantes y convierte la lactosa en biomasa microbiana⁸

2.3.1.2 Calabazo

Es el recipiente natural que resulta del proceso de endurecimiento del calabazo, cuyo nombre científico es *Lagenaria vigaris*, conocido también en las diferentes regiones colombianas como árbol de totumo.

Foto 1. Calabazos o prototipo.



Fuente. Autores

Nota: en b y en c se observan restos de biocapa

⁸ Revista tecnología Láctea Latinoamericana N° 19 de 2000.

2.3.2 Zonas de producción

Las zonas principales de producción del suero costeño están localizadas en la región de la costa Atlántica, en la mayoría de los municipios de los departamentos de Bolívar, Cesar, Córdoba, Magdalena y Sucre. También se elabora en algunos municipios de Santander y norte de Santander, debido a la cercanía a estas regiones.⁹

2.3.3 Tipos de suero costeño

El suero costeño es un producto que concentra la grasa y la proteína, en promedio contiene un 9.3% de materia grasa con grandes variaciones. El Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos (ICTA) propone clasificar el suero costeño en tres tipos, magro, semimagro y graso. Esta diferencia se hace notar dependiendo de cómo se emplee la crema que es separa espontáneamente en el proceso de descremado¹⁰ (ver tabla 3)

Tabla 3 Clasificación de la leches fermentadas y del suero costeño

LACTEOS FERMENTADOS		SUERO COSTEÑO	
	% GRASA		% GRASA
Entera	2.5	Graso	10.9
Semidescremada	0.5	Semigrasa	3.7-10.9
Descremada	0.5	Magro	3.7

Fuente: CHAMIE y GARCIA. 1999.

⁹ Chamie 1999

¹⁰ Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos , 1988

2.3.4 Composición química

La tabla 4 describe la composición química del suero, de acuerdo a la adaptación tomada por Chamie (1999) y la clasificación propuesta por ICTA (1988)

Tabla 4 Características fisicoquímicas del suero costeño.

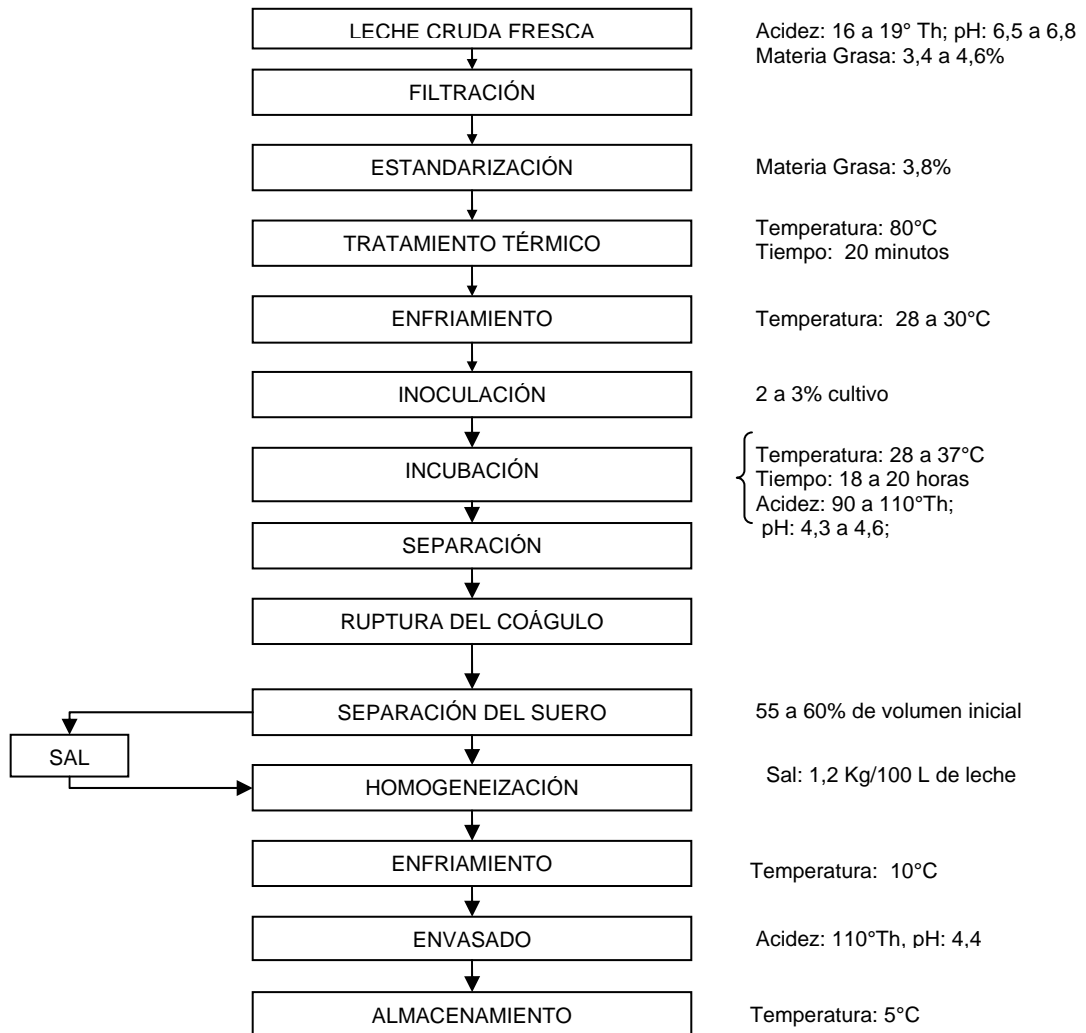
	Tipos de suero (referencia 29)*						Referencia) VERSSEYRE, 1988)**	
	MAGRO		SEMIGRASO		GRASO		PBH	PBS
	PBH	PBS	PBH	PBS	PBH	PBS		
Humedad	13,6 – 16,6		15,7 – 23,5		23,7 – 38,4		67,9	
Grasa	2 – 3,62	20,63	3,63 – 8,65	35,17	8,66 – 17,2	47,19	9,30	28,97
Proteína	4,5 – 6,55	22,19	2,8 – 4,45	21,26	1,02 – 2,70	7,62		
Ceniza	1 – 3,9	20,12	1 – 3,9	14,08	1 – 3,9	6,29		
pH	3,68		3,77		3,72			
Acidez	1 – 3,5		1 – 3,5				3,68	
a_w	0,92		0,92		0,92			
Densidad	1 – 1,2		1 – 1,2		1 – 1,2			
Calcio	0,02 – 0,15	0,32	0,02 – 0,15	0,39	0,02 – 0,15	0,31		
Fósforo	0,5 – 1,6	5,24	0,5 – 1,6	5,25	0,5 – 1,6	3,43		
Sal (NaCl)	0,95 – 3,5	18,5	0,95 – 3,5	12,7	0,95 – 3,5	6,01	2,09	6,51

Fuente: *Chamie, 1999.

*ICTA 1988

El diagrama 1 muestra el proceso de elaboración del suero costeño.

Diagrama 1 Elaboración de Suero Costeño



Fuente: ICTA, 1988

2.4 BACTERIAS ACIDOLACTICAS (BAL)

2.4.1 Definición y clasificación

Las bacterias lácticas son bacilos y cocos gran positivos, la mayoría son microorganismos aeróbios tolerantes que carecen de citocromos y de porfirinas y por esta razón son catalasa negativa y oxidasa negativa.

Las bacterias lácticas y los productos de su metabolismo han sido consumidos desde tiempos inmemoriales a través de alimentos fermentados. Esta circunstancia, unida al hecho de que muy raramente se les haya asociado a procesos patológicos, ha contribuido a su designación como bacterias seguras o GRAS (Generally Recognized As Safe). En contraposición con los aditivos químicos, los consumidores perciben las bacterias lácticas como algo "natural" y "beneficioso para la salud", por lo que su empleo en la conservación de los alimentos tiene gran aceptabilidad. En este sentido, consideran que si por bioconservación se entiende la extensión de la vida útil e incremento de la seguridad sanitaria de los alimentos mediante la microflora natural o sus metabolitos, entonces las bacterias lácticas son los candidatos ideales para su selección como cultivos bioprotectores. Así, no es de extrañar que se haya llegado a definir bioconservación como el empleo de bacterias lácticas, sus productos metabólicos o ambos para mejorar o asegurar la seguridad y calidad de los alimentos.¹¹

La tabla 5 muestra los principales géneros de bacterias acidolacticas presentes en los alimentos

Tabla 5 Géneros principales de las bacterias acidolácticas.

Familia	Genero	Especie
Streptococcaceae (cocos)	<i>Streptococcus</i>	• <i>S. thermophilus</i>
	<i>Lactococcus</i>	• <i>L. lactis.ssp. lactis</i> • <i>L. lactis. ssp. Biovar diacetiolactis</i> • <i>L. lactis ssp. cremoris</i>
	<i>Pediococcus</i>	• <i>P. pentosaceus</i> • <i>P. acidilactic</i>
	<i>Leuconostoc</i>	• <i>L. mesenteroides ssp. Cremoris</i> • <i>L. lactis</i>
Lactobacillaceae (bacilos)	<i>Lactobacillus heterofermentativo</i>	• • <i>L. helveticus</i> • <i>L. delbrueckii ssp. Bulgaricus</i> • <i>L. delbrueckii ssp. Lactis</i> • <i>L. acidophilus</i> • <i>L. casei</i> • <i>L. plantarum</i>
	<i>Lactobacillus homofermentativo</i>	• <i>L. kefir</i> • <i>L. brevis</i> • <i>L. fermentum</i>

Fuente: Frazier.

¹¹ W. Frazier. 1994.

2.4.2 Género *Streptococcus*.

El género *Streptococcus* está constituido por cocos Gram positivos, de forma esférica u oval, de 1-1,5 µm de diámetro, anaerobios facultativos, que se disponen a pares o en cadena por la existencia de puentes de pared celular. No producen catalasa, ni oxidasa y fermentan la glucosa con formación de ácidos. Son más exigentes que los *Staphilococcus* en sus necesidades nutritivas y de cultivo, y presentan una resistencia variable a los agentes externos, que depende de la especie.

Forman un grupo muy amplio y heterogéneo, algunos de cuyos componentes son saprofitos, otros forman parte de la flora normal y se comportan como oportunistas, y algunos son patógenos y pueden producir infecciones diversas en el hombre y los animales.¹²

2.4.3 Género *Leuconostoc*

Género de bacterias Gram positivas, facultativamente anaerobias cuyo crecimiento es dependiente de la presencia de un carbohidrato fermentable. No es patógeno para plantas y animales, incluidos al hombre.

Difieren de los *Streptococcus* en que son heterofermentativas y producen ácido láctico, etanol y CO₂, además se caracterizan por la producción de diacetilo a partir del citrato de la leche, son importantes por generar aromas en los productos donde son utilizados¹³.

2.4.4 Género *pediococcus*

Género de bacterias Gram positivas, facultativamente anaerobias cuyo crecimiento depende de la presencia de un carbohidrato fermentable. No se producen endosporas. Sus organismos se encuentran en productos fermentados de plantas y no son patógenos para las plantas y animales, incluido el hombre.

Son productores de ácido láctico D o L (+). Su incapacidad para fermentar lactosa no le permite acidificar ni coagular la leche.

2.4.5 Género *Lactobacillus*

Morfológicamente, algunos bacilos son bastones delgados y largos; otros son algo parecido al colibacilo, pero, al contrario de este, todos son grampositivos. Casi todos son inmóviles, pero se han señalado excepciones. Muchos cultivos

¹² A. Pumarola, 1998.

¹³ Leveau y Bouix, 2000

muestran una forma diplobacilar característica, a menudo reniforme. Frecuentemente los cultivos viejos muestran considerable pleomorfismo.

Los Lactobacilos, son microaerófilos o anaerobios, pero después de cultivos continuos, algunas cepas pueden desarrollarse en presencia de oxígeno. Sus necesidades nutritivas son complejas, y la mayor parte de las cepas no puede cultivarse en los medios nutritivos ordinarios, menos que se enriquezcan con glucosa y suero. Las necesidades individuales de aminoácidos varían de 2 a 15; en general, se requiere piridoxina, tiamina, riboflavina, biotina, ácido fólico y ácido nicotínico, variando las necesidades en cada caso. Estos requerimientos nutritivos variados tienen aplicación práctica en técnicas de dosificación microbiológica de vitaminas y de algunos aminoácidos, para los cuales son más sensibles que los métodos químicos disponibles. En concentración adecuada, hay cierta relación definida, incluso lineal, entre la concentración de vitamina en un medio de cultivo adecuado, pero exento de vitamina, y el desarrollo o la cantidad de ácido producidos⁽¹⁴⁾

Algunos bacilos forman parte de la flora intestinal normal y pueden predominar en lactantes e individuos con ingestión elevadas de azúcares, especialmente lactosa. Se supuso que la flora intestinal de lactobacilo era preferible a una flora proteolítica de coliformes, ya que tendía a inhibir los trastornos degenerativos aumentando la vitalidad en personas de edad avanzada, y que esa flora podía establecerse consumiendo leches fermentadas o leches búlgaras y acidófilas. De esta manera puede alterarse la composición de la flora intestinal, y también mediante el consumo de cantidades equivalentes de leche azucarada, pero el cambio es pasajero, y no está demostrado que esa flora intestinal por sí misma favorezca la salud.

Los Lactobacilos, según los productos de fermentación de azúcar, se dividen en dos grupos. El grupo homofermentativo es el mayor y convierte casi completamente el azúcar fermentada en ácido láctico; el grupo heterofermentativo está constituido por formas que producen cantidades importantes de otros productos de fermentación, incluyendo bióxido de carbono, etanol y ácido acético.

2.4.5.1 *Lactobacillus bifidus*.

Tiene una relación aparentemente muy estrecha con el *Lactobacillus acidophilus* y a menudo es difícil de distinguir de él, es un bastón más delgado con extremos algo más ahusados y generalmente bifurcados cuando es recién aislado. Lo obtuvo Tissier de heces de lactantes alimentados de pecho, en 1900. Aunque es común en el intestino de lactantes alimentados al pecho, formando a veces de 90 por 100 de la flora intestinal total, es menos abundante en niños con alimentación artificial. A veces se encuentra también

¹⁴ James, 2002.

en las heces de animales adultos, incluyendo al hombre. Como *Lactobacillus acidophilus*, produce ácido, principalmente láctico, a partir de muchos azúcares, pero también fermenta la insulina. Obtenido de aislamiento primario, es anaerobio, y algunas cepas nunca se desarrollan adecuadamente en condiciones aerobias. El desarrollo aumenta con cistina. En parte debido a sus necesidades aerobias, se ha clasificado con Bacteroides.

2.4.5.2 *Lactobacillus acidophilus*.

Este organismo, cultivado por primera vez por Moro en 1900, a partir de heces de lactante, ha sido aislado del intestino de casi todos los mamíferos, muchos otros vertebrados y algunos invertebrados. Su cantidad aumenta en el intestino cuando aumenta el contenido de carbohidratos en la dieta; pueden ser predominantes cuando se ingiere una dieta láctea. Estos bacilos, bastante gruesos y de longitud variable, se disponen aislados, a pares frecuentemente algo flexionados en la unión, y en empalizadas. Las cadenas largas, las formas filamentosas y las formas en maza no son raras. Los cultivos jóvenes se tiñen uniformemente gram positivos; los cultivos viejos, a menudo muestran coloración listada o bipolar y pueden decolorarse fácilmente. Las colonias, generalmente pequeñas.

2.4.5.3 *Lactobacillus bulgaricus*.

Este nombre se asignó a un organismo aislado por Grigoroff, en 1905, de leche búlgara fermentada. Se ha señalado que *L. bulgaricus* raramente se desarrolla a 15 °C, muere en cultivos repetidos en caldo de lactosa – peptona – levadura, es incapaz de desarrollarse en medio que contengan 2.5 por 100 de cloruro de sodio y no crecen en caldo a pH de 7.8, en tanto que *L. acidophilus* puede crecer en todas estas condiciones.¹⁵

2.4.6 Género *Lactococcus*

Las células de estas bacterias normalmente son esféricas. Este género incluye las antiguas especies *Streptococcus lactis* y sus tres subespecies *Streptococcus raffinolactis* y dos nuevas especies mal clasificadas *Streptococcus plantarum* y *Streptococcus garviae* (Collins, 1983). La subespecie *Streptococcus lactis* subs. *diacetylactis* cambia en la subespecie *Lactococcus lactis* subs. *lactis*.

¹⁵ W. Frazier. 1994.

2.5 HONGOS

2.5.1 Levaduras.

Nombre genérico de ciertos hongos unicelulares, de forma ovoidea, que se reproducen por gemación o división. Suelen estar unidos entre sí en forma de cadena, y producen enzimas capaces de descomponer diversos cuerpos orgánicos, principalmente los azúcares, en otros más sencillo.

Las levaduras predominantes en los productos lácteos pertenecen a las especies *Debaryomyces bansenii* (anamorfo *Candida famatá*), *Kluyveromyces marxianus*, *Kluyveromyces lactis*, *Yarrowia lipolytica* (anamorfo *Candida lipolytica*), *Saccharomyces cerevisiae*, *Zygosaccharomyces rouxii*, *Pichia fermentans*, *Pichia membranefaciens* y *Rhodotorula mucilaginosa* [2, 14 y 25]. Estas y otras especies aparecen también en la mayoría de los quesos, aunque en niveles muy variables (entre 10^3 y 10^8 ufc/g). En general, las levaduras no tienen asignado un papel tecnológico definido y no se utilizan como fermento excepto en algunos quesos de corteza lavada en productos como el kéfir, el kumis y en varias leches fermentadas africanas llevan a cabo la fermentación alcohólica característica de estos productos.¹⁶ (Ver tabla 6)

Tabla 6 Levaduras asociadas con derivados lácteos.

Especie	Fermentan	Usos o lugar de aislamiento	Morfología
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Glucosa, no lactosa	Cerveza, panadería, quesos	Esféricas, ovoides
<i>Candida lipolytica</i>	No fermentan los azúcares	Mantequillas, margarinas	Ovoides
<i>Kluyveromyces lactis</i>	Lactosa y galactosa	Yogur, mantequilla, cremas	Esféricas y cilíndricas
<i>Kluyveromyces fragilis</i>	Lactosa	Kefir, koumis y yogur.	Cilíndricas o elipsoidales
<i>Candida kefir</i>	Lactosa y glucosa	Kefir, mantequilla y queso	Ovoides cortas o largas
<i>Turolopsis lactis</i>	Glucosa, no lactosa	Leches azucaradas	Ovoides

Fuente: Robinson, 1987.

2.5.2 MOHOS

Nombre de varias especies de hongos de tamaño muy pequeño que viven en los medios orgánicos ricos en materias nutritivas, provistos de un micelio filamentosos y ramificado del cual sale un vástago que termina en un esporangio esférico, a manera de cabezuela. Formando una capa que se forma en la superficie de un cuerpo metálico por alteración química de su materia; p. ej; la herrumbre o el cardenillo.

¹⁶ A. Pumarola, 1998.

2.6 ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LAS BAL

2.6.1. Descripción

Los productos activos de las sustancias inhibitorias no son más que los metabolitos excretados por la bacteria como el ácido láctico o derivados del metabolismo del oxígeno como el peróxido de hidrógeno. Además del ácido láctico y peróxido de hidrógeno, las bacterias lácticas también son productoras de otras sustancias inhibitorias conocidas como bacteriocinas. (Ver tabla 7)

Tabla 7 Bacteriocinas identificadas a nivel industrial.

Especie	Bacteriocina	Espectro de acción	Microorganismo afectado
<i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i>	Nisina	Actúa sobre bacterias negativas, impide germinación de esporas. No afecta <i>Streptococcus thermophilus</i> .	<i>Clostridium tybutyricum</i> , <i>Lc. Lactis. subsp. Cremoris</i>
<i>Lactococcus lactis subsp. cremoris</i>	Diplococina	Actúa sobre otras BAL y no afecta bacterias esporuladas.	<i>Lc. Lactis subsp. lactis</i>
<i>Lactococcus lactis subsp. lactis biovar diacetylactis</i>	Lactostreptocinas	Su espectro de acción es más reducido que el de la nisina, solo actúa frente a cepas de:	<i>L. helveticus</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Leuconostoc</i> .
<i>Streptococcus thermophilus</i>	Sin nombre	Es termoestable, actúa sobre:	<i>Lc. lactis</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Pseudomonas</i> , Enterobacterias.
<i>Lactobacillus helveticus</i>	Lactocina 27	Glicoproteína termoestable, bactericida, solo activa frente:	<i>L. acidophilus</i>
	Helveticina J	Solo activa frente a:	<i>L. delbrueckii subsp. Bulgaricus</i> , <i>L. lactis</i> .
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Lactacina B	Bacteriocina de origen cromosómico	<i>L. leichamanii</i> , <i>Lb. delbrueckii subsp. bulgaricus</i> , <i>Lb. helveticus</i> y <i>L. Lactis</i>
	Lactacina F	Bacteriocina de origen cromosómico	<i>L. fermentum</i> y <i>Enterococcus faecalis</i> .
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Plantaricina A	Capaz de inhibir levaduras, bacterias (-) y la mayor parte de las bacterias (-).	Levaduras, bacterias negativas, <i>Pc. pentosaceus</i> , <i>Ln. paramesenteroides</i> .
<i>Lactobacillus sake</i>	Sakacina A	Actúa sobre ciertas BAL. No actúa sobre bacterias negativas.	<i>En. faecalis</i> , <i>Ec. faecium</i> y diversos <i>Lactobacillus</i> y <i>Leuconostoc</i> .
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	Pediocina A	Inhibe el crecimiento de otros <i>Pediococcus</i> y de:	<i>L. plantarum</i> , <i>Leu. Mesenteroides</i> , <i>Micrococcus luteus</i> , <i>Ec. faecalis</i> , <i>S. aureus</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Clostridium butulinum</i> , <i>Cl. sporogene</i> , <i>L. brevis</i> , <i>Lc. lactis</i> y <i>Listeria monocygenes</i> .

Fuente: Leveau y Bouix, 2000.

2.6.2 MICRORGANISMOS INDICADORES.

Son aquellos microorganismos que se utilizan como detectores de defectos en los procesos de esterilización e higiene de los alimentos.

2.6.2.1 *Escherichia coli*.

Es una bacteria con forma de bastón (bacilo), que pertenece a la familia de las Enterobacteriáceas; se encuentra en el intestino grueso humano. Es un bacilo-catalasa positivo, oxidasa-negativo, negativo y anaerobio facultativo, mesófilo típico que crece a temperaturas desde 10 a 50°C, su temperatura óptima de desarrollo es de 37°C. Crecen rápidamente en la leche, en especial por encima de 20°C y actúa sobre las proteínas y la lactosa con formación de gas y la alteración del aroma de la leche, desarrollando un olor que se describe como a "sucio", su presencia en un alimento indica que éste ha tenido contacto y por tanto está contaminado por materia de origen fecal. No es termorresistente y se puede destruir fácilmente con la pasterización de la leche. Además se considera que la *E. coli* es el microorganismo índice ideal para la detección de contaminaciones recientes.¹⁷

2.6.2.2 *Staphylococcus aureus*

Es un prototipo de los estafilococos patógenos, es el agente causal de la mayoría de infecciones; se caracteriza por producir coagulasas o fermentar el manitol, elabora diversas toxinas, en especial la toxina α y sintetizar en su mayoría un pigmento amarillo dorado, no difusible que colorea las colonias.

Su presencia en los alimentos es indicador de procesos deficientes de eliminación de patógenos y de escasa higiene del personal involucrado. Es un coco positivo, catalasa-positivo, oxidasa-negativo, anaerobio facultativo, osmotolerante, capaz de soportar bajas actividades de agua. Resiste temperaturas de ebullición a presión atmosférica por periodos de hasta 30 minutos. Su temperatura óptima de crecimiento es de 30-37°C, aunque se puede desarrollar en un rango de temperatura más amplia que abarca desde los 6,5°C hasta los 46°C.

¹⁷ A. Pumarola, 1998.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 DISEÑO EXPERIMENTAL

A continuación se describen los materiales y métodos utilizados para la identificación y caracterización de los microorganismos responsables de la fermentación del suero costeño en las diferentes fases del proceso, lo mismo que los análisis fisicoquímicos realizados a las muestras, los cuales están descritos mediante tablas y gráficos, cuyos datos se obtuvieron al realizar las pruebas preliminares y finales en el laboratorio de microbiología de la Universidad de la Sabana (ver tabla 8)

Tabla 8 Cuadro de procedimientos

Fase del proyecto	Etapas	Descripción
1. Pruebas preliminares	Análisis fisicoquímicos	<ul style="list-style-type: none"> ➤ prueba de acidez titulable ➤ determinación del % de grasa por el método de Gerber. ➤ determinación de la densidad por medio del termo lactodensímetro. ➤ determinación de sólidos solubles por medio de refractometría.
	Medios de cultivos:	<ul style="list-style-type: none"> ➤ PDA, para mohos y levaduras. ➤ PCA, para aerobios mesófilos. ➤ MRS, para lactobacilos ➤ MacConkey, para entero bacterias.
	Diluciones	Se utilizarán diluciones directas y 1:100, posteriormente se realizarán 1:1000 o 1:10000 dependiendo el crecimiento se colonizaron los microorganismos en NaCl 0.89%
	Coloración	Se utilizarán el medio de coloración de para identificar los microorganismos Gram + o -
2. Caracterización de microorganismos causantes de la fermentación	Conteo	Se procederá a contar las cajas que tengan crecimiento entre 30 y 300 colonias en adelante.
	Caracterización de los microorganismos	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Morfología de los microorganismos y las colonias ➤ Prueba de catalasa ➤ Prueba bioquímica de fermentación de azúcares ➤ Aislamiento de los microorganismo
3. Mejoramiento de las condiciones de procesamiento del suero costeño	Estandarización del producto	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Leche pasteurizada ➤ Inoculación de los microorganismos
	Análisis sensorial	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Olor sabor y color correspondiente ➤ Buena viscosidad

Fuente: autores

3.2 OBTENCION DE MUESTRAS

Se utilizaron dos tipos de leches de vaca, procedentes del municipio de Nemocon, departamento de Cundinamarca y de la ciudad de Sincelejo, departamento de Sucre.

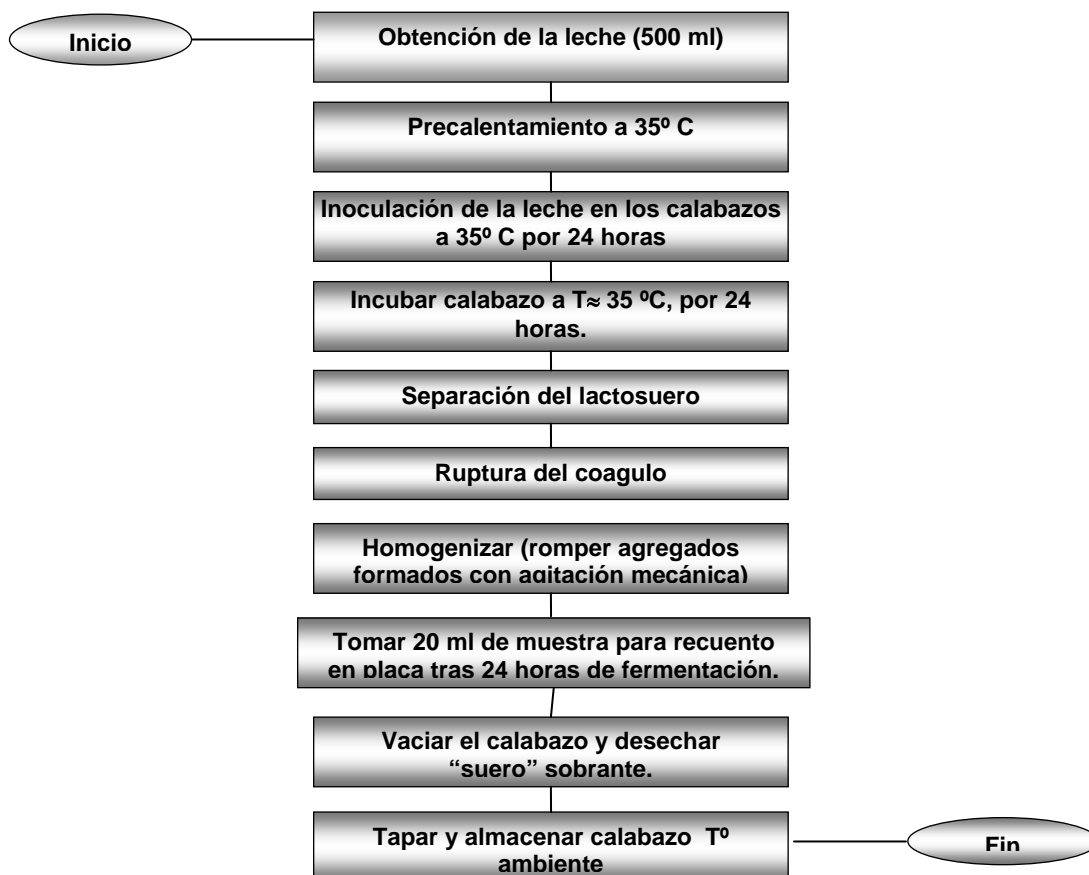
Se acondicionaron dos calabazos provenientes de la región de Sucre en los laboratorios de la Universidad de la Sabana, donde se hicieron varias fermentaciones para la formación la biocapa.

Las muestras de Suero costeño se tomaron en el laboratorio de Microbiología de La Universidad de La Sabana, utilizando los calabazos con la biocapa ya formada e incubados a temperatura de 35° C.

3.3 ELABORACIÓN DEL SUERO COSTEÑO EN EL LABORATORIO.

La base fundamental del proceso de elaboración del suero costeño es el artesanal, ya que se quería obtener las mismas características del elaborado artesanalmente para su posterior estudio.

Diagrama 2 ELABORACIÓN DE SUERO COSTEÑO EN LABORATORIO



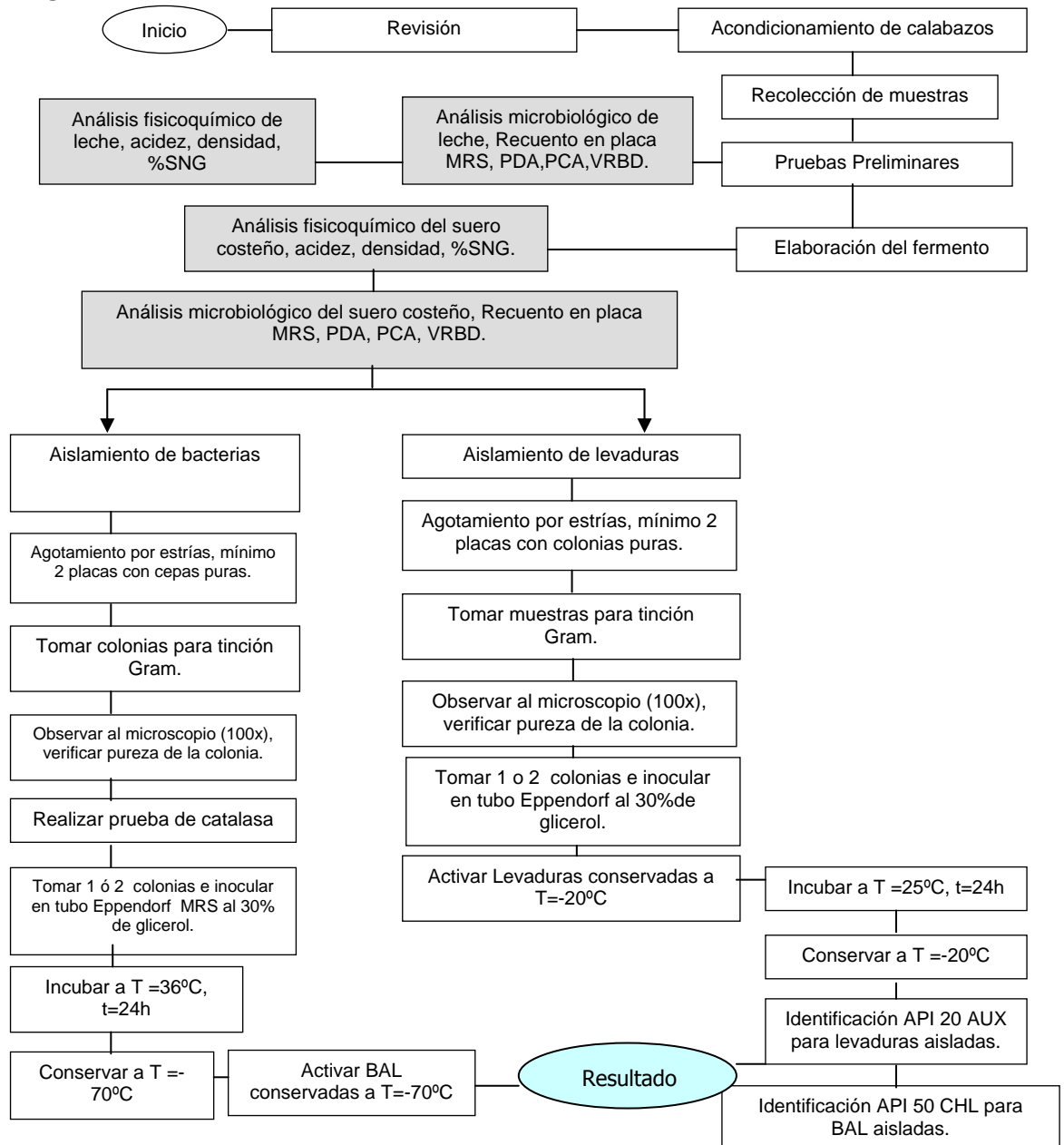
Fuente: Autores

3.4 PRUEBAS PRELIMINARES

En primera instancia se realizaron las pruebas fisicoquímicas a las dos muestras procedentes de los departamentos de Sucre y Cundinamarca para observar las condiciones iniciales y analizar si repercutían en el rendimiento y en las características organolépticas de los dos fermentos.

Igualmente se realizaron pruebas microbiológicas, para determinar el crecimiento de BAL, levaduras, mesófilos aerobios y enterobacterias, preparando una dilución directa y una dilución 1:100 para determinar la carga microbiana inicial y posteriormente realizar el aislamiento de las BAL. (Ver Anexo A).

Diagrama 3 Diseño de procedimientos



3.4.1 Preparación de los medios de cultivo.

Para observar la flora microbiana que intervino en el proceso de la fermentación se realizaron los siguientes recuentos en cada uno de los medios:

- ❖ El medio de cultivo utilizado para el recuento y crecimiento de las BAL fue caldo y Agar DE MAN, ROGOSA y SHARPE, (MRS) en la formulación establecida en la etiqueta del medio (52 g/l) y (62 g/l) respectivamente. Se utilizó rojo de clorofenol como indicador en el cambio de acidez del medio.
- ❖ Para el recuento de Levaduras AGAR PAPA DEXTROSA (PDA) para aislamiento de mohos y levaduras (39 g/l).
- ❖ El medio de cultivo utilizado para el recuento de mesófilos aerobios fue agar AGAR PLATE COUNT, (PCA), (23,5 g/l).
- ❖ El medio de cultivo utilizado para el recuento de enterobacterias fue agar MACCONKEY O VIOLETA CRISTAL-ROJO NEUTRO-BILIS-GLUCOSA-AGAR SEG. MOSSEL, (VRBD), (39 g/l).

3.4.2 Materiales y Equipos

- Cámara de flujo laminar CIAL Modelo CAE 30x36x6 pulgadas.
- Incubadora.
- Balanza analítica AB24.
- Espátula.
- Papel aluminio.
- Gasa.
- Vaso de vidrio de 500 ml.
- Vaso de vidrio de 200 ml.
- Leche cruda provenientes de dos regiones
- Micropipetas

3.4.3 Diluciones seriadas

Inicialmente para determinar la cantidad de microorganismos presentes en las muestras de leche cruda provenientes de las dos regiones se trabajó con una siembra directa y una dilución 1:100.

Posteriormente en la preparación de las muestras para determinar la carga microbiana en los fermentos, se trabajó con diluciones 1:100, 1:1000 Y 1:10000 para cada una de las cepas identificadas y de esta manera facilitar el proceso de aislamiento de los microorganismos.

3.4.4 Recuento de microorganismos

Se realizaron siembras para determinar, recuento de BAL, Levaduras y mohos, Mesófilos aerobios y recuento de enterobacterias presentes en las muestras de leche cruda procedentes de las dos regiones.

Para la identificación de bacterias Gram positivas y Gram negativas en la leche cruda y en los fermentos, se utilizó el método de tinción de Gram.

3.5 ANÁLISIS FISICOQUIMICO DE LOS FERMENTOS

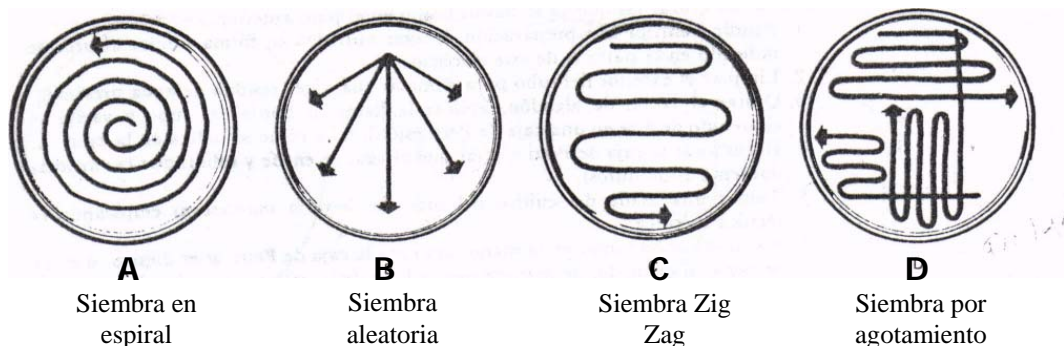
El suero elaborado en laboratorio y obtenido de las dos muestras de leche de las dos regiones (Cundinamarca y Sucre) se le determinó el porcentaje de grasa, acidez titulable, densidad y cantidad de sólidos no grasos, para analizar sus propiedades organolépticas.

3.6 DETERMINACION DEL CRECIMIENTO DE LAS BACTERIAS ACIDOLACTICAS.

En las dos muestras de suero costeño fue controlado el crecimiento de las bacterias acidolácticas referenciado el tiempo de inoculación, el cual nos permite determinar cual de ellas tiene mejor comportamiento frente al proceso de fermentación.

3.7 METODOS DE SIEMBRA

Para identificar los microorganismos responsables de la fermentación del suero costeño se realizaron métodos de recuento de BAL, recuento de levaduras y mohos, mesófilos aerobios y recuento de entero bacterias.



3.8 MÉTODOS DE AISLAMIENTO Y CONSERVACION DE LAS CEPAS

Se realizó el aislamiento por placa estriada del medio MRS solidificado, observando la formación de las colonias analizando la uniformidad entre ellas, posteriormente se realizaron pruebas de coloración de Gram y de catalasa para identificar las bacterias presentes en el medio.

Una vez aisladas las cepas y confirmadas se almacenaron a -70°C , para BAL y a -20°C para Levaduras utilizando una adaptación del sistema CRYOBANK, que consiste en un pequeño tubo que contiene esferas de cerámica porosas a las cuales los microorganismos se adhieren por medio de una solución hipertónica y crioprotector. (Ver anexo B)

3.9 IDENTIFICACION DE BAL POR EL METODO API 50 CHL

El método API 50 CHL (Biomeriux) consta de 49 azúcares, que permiten establecer una identificación del tipo de BAL, comparando el perfil de fermentación de los tipos de BAL. La bacteria aislada identificada es suspendida en el medio API 50 CHL, llenando cada una de las 49 capsulas de la galería.

Foto 2: Ejemplo de los 10 primeros azúcares de la Galería API 50 CHL (Biomeriux), tras 48 horas de incubación.



El método API 50 CHL comienza con la activación de la cepa previamente aislada y crioprotectorada, en medio líquido, luego se toman $100\mu\text{L}$ de la cepa activa y se inoculan en agar MRS.

Posteriormente se distribuye homogéneamente con un asa de vidrio estéril y se incuba durante 48 horas, vertiendo 5 ml de agua destilada estéril sobre la caja de incubación para generar un ambiente húmedo, luego se abre una ampolla de suspensión médium de 2 ml (o agua destilada estéril).

Se toman varias colonias, con la ayuda de un asa de metal estéril y se transfieren a la Ampolla de suspensión (S1). Luego se realiza este mismo procedimiento en una Ampolla de Suspensión Médium de 5ml con turbidez de 2, según la escala McFarland, transfiriendo una cantidad (S1), con ayuda de la micropipeta Eppendorf. (S2).

Después se reporta la cantidad de S1 que se necesita para alcanzar la escala de McFarland 2, Se reparte el Medio API 50 CHL utilizando dos veces la cantidad transferida de (S1) a (S2), sobre las capsulas con los diferentes azúcares de la Galería API 50 CHL (aproximadamente 25 μ L de medio por capsula), seguidamente se cubren las capsulas con aceite de parafina, para generar anaerobiosis, incubándolas a 36 °C por 48 horas.

3.10 IDENTIFICACIÓN DE LEVADURAS POR EL METODO API 20 AUX

La galería API 20 AUX, consta de 20 azúcares deshidratado que permiten realizar 19 pruebas de asimilación. La galería se inocula con la levadura aislada y suspendida en el Medio C AUX. La levadura solo crecerá si puede asimilar cada uno de los 19 carbohidratos como única fuente de carbono.

Las cepa previamente aisladas y crió- conservadas en el agar PDA, se activan en una ampolla de Suspensión de NaCl. 1%. Luego se toman varias colonias, con la ayuda de un asa de metal estéril y se agregan a la Ampolla (S1), enseguida se agita la ampolla hasta homogenizarla.

Posteriormente se abre una Ampolla de Medio C AUX y se transfirieren 100 μ L de (S1), hasta alcanzar McFarland 2 y se reparte seguidamente en cada una de las 20 capsulas de la galería. Para evitar la formación de burbujas, se tapa la caja y se incuba a 25 °C por 48 horas.

3.11 DETERMINACIÓN ESPECTROFOTOMÉTRICA DE LA CANTIDAD DE MICROORGANISMOS.

Esta prueba se realizó en un espectrofotómetro de UV (Cari 100 conc, Spectronic 20). Para determinar la concentración de microorganismos presentes en las diluciones a través de la absorbancia.

Se activaron los microorganismos en medios de cultivo MRS incubados por 24 horas a 35°C. por consiguientes se hicieron diluciones tomando como 100% de concentración de microorganismos, el caldo MRS, con cultivo activado (10ml por 24 h a 35°C), para realizar diluciones de 25%, 50% y 75% de concentración.

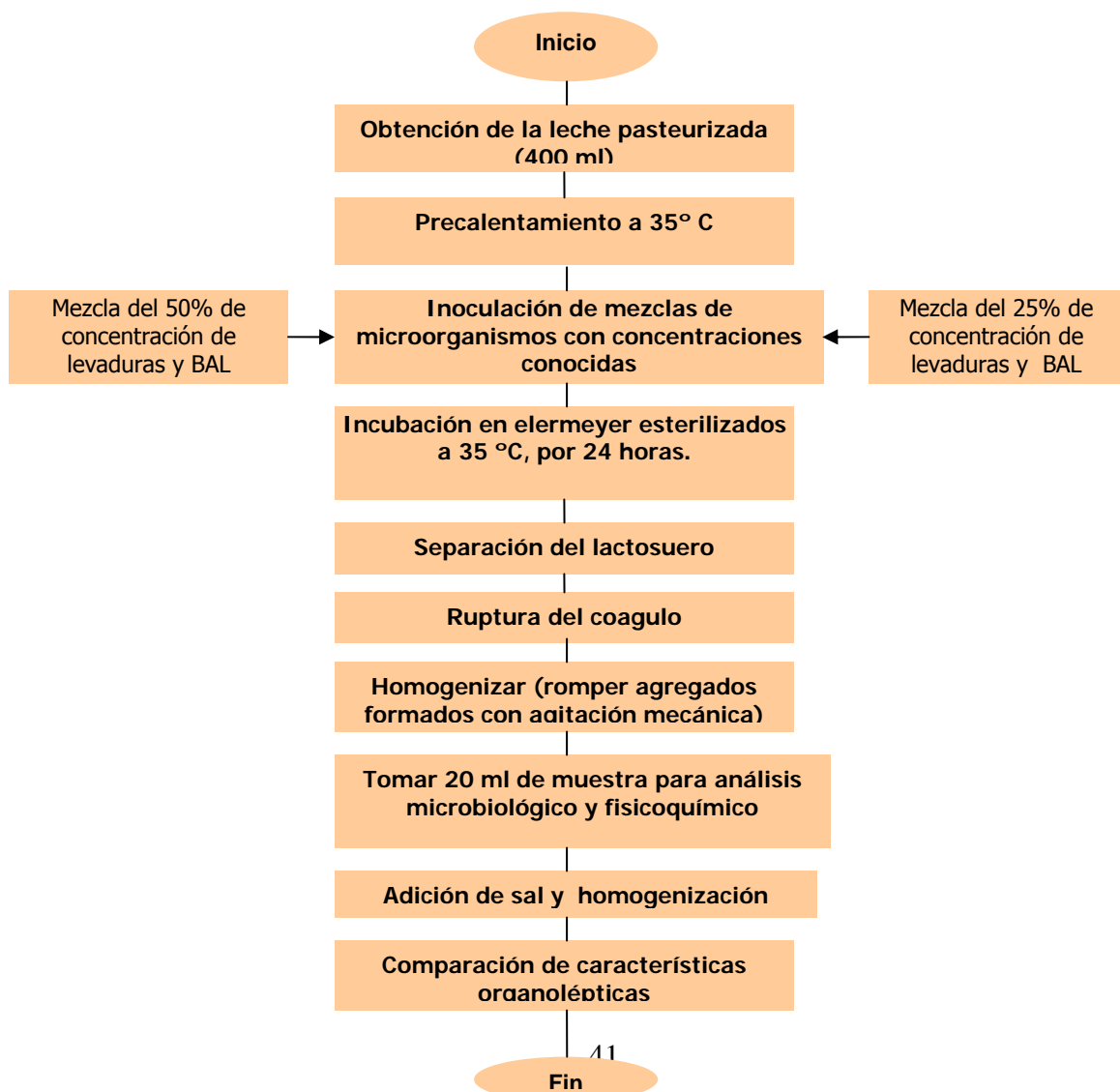
En esta fase se realizaron 2 pruebas espectrofotometricas para medir la concentración de microorganismos ajustandolo con una longitud de onda de 600 nm, que determinaron en el recuento en placa, la cantidad de unidades formadoras de colonia por mililitro (Ufc/ml) que se van a utilizar en la preparación de las mezclas de BAL y levaduras a utilizadas en el proceso de fermentación controlando las condiciones del proceso.

A partir de estas pruebas ajustadas se realizaron diluciones de 1:100, 1:1000, 1:10000 para recuento en placa, utilizando el medio MRS y PDA, los cuales se incubaron a 35°C por 24 horas, haciendo un recuento de cada una de las diluciones con sus respectivos conteos por medio de rayos UV en el espectrofotómetro.

3.12 MEJORAMIENTO DE LAS CONDICIONES DE ELABORACION DEL SUERO COSTEÑO.

Para mejorar las condiciones de procesamiento en elaboración del suero costeño, se realizó una prueba de control utilizando leche pasteurizada como materia prima inicial y un elermeyer esterilizado como recipiente de fermentación. Posteriormente se inocula de manera controlada la concentración de microorganismos generadores de la fermentación, y de esta manera comparar los resultados fisicoquímicos y organolépticos con los fermentos elaborados de forma artesanal en el laboratorio, donde se utilizó un prototipo (calabazos) como recipiente de fermentación.

Diagrama 4: Elaboración del suero costeño mejorando las condiciones del proceso



4. RESULTADOS Y ANALISIS

4.1 PRUEBAS PRELIMINARES

La realización de estas pruebas permitió determinar las propiedades fisicoquímicas y microbiológicas de las dos muestras de leche cruda procedentes de los departamentos de Sucre y Cundinamarca y analizar su influencia en la elaboración de los fermentos utilizando los calabazos como prototipo de fermentación.(ver tabla 9)

Tabla 9 Propiedades fisicoquímicas de las muestras.

	Leche de vaca (Cundinamarca)	Leche de vaca (Sucre)
Acidez (% AC)	0,18	23
% de grasa	3.4	4.2
Sólidos S.N.G	11	10.5
Densidad	1.028	1.032

Fuente: Autores.

De acuerdo a los resultados de los análisis fisicoquímicos realizados a las dos muestras de leches de las regiones de procedencia, la leche traída del departamento de Sucre muestra que las propiedades de acidez, grasa, sólidos no grasos y densidad son mayores. El aumento de la acidez de la muestra de Sucre se debió a que la leche tuvo que ser transportada hasta la ciudad de Bogotá, sin las condiciones de almacenamiento, lo que influyó en su variación.

Tabla 10 Métodos de Recuentos realizados a las muestras.

Medios	Leche de vaca Sucre (Directa)		Leche de vaca Sucre (1:100)		Leche de vaca Cund (Directa)		Leche de vaca Cund.(1:100)	
	Bacilos	Cocos	Bacilos	Cocos	Bacilos	Cocos	Bacilos	cocos
MacConkey	60% Gram +	40% Gram +	80% Gram +	20% Gram -	70% Gram +	30% Gram -	80% Gram -	20% Gram +
P.D.A	filamentos	10% Gram +	filamentos	10% Gram +	filamentos	20% Gram +	filamentos	10% Gram +
P.C.A	0	90% Gram -10% Gram +	90% Gram -	10% Gram +	0	80% Gram -20% Gram +		80% Gram -20% Gram +
M.R.S.	0	0	0	0	0	0	0	0

Fuente: Autores

En la siembra directa se encontró un 60% de bacilos Gram + y Gram - y un 40% de cocos Gram positivos. En la dilución 1:100, la presencia de bacilos

Gram + y Gram – fue mayor, manteniendo la tendencia que a diluciones mayores la prevalencia de bacilos seguirá aumentando. En comparación con la leche de Cundinamarca la presencia de bacilos Gram + fue relevante, mientras que no hubo crecimiento de bacilos Gram -, a diferencia de la dilución 1:100 donde si hubo crecimiento de bacilos Gram – y ningún crecimiento de bacilos Gram +, indicándonos que no hay relevancia en los resultados, lo cual no afecta en la producción de los fermentos.

En cuanto el recuento de levaduras utilizando como medio PDA, en la dilución directa con leche de Sucre, se observó crecimiento de levaduras con filamentos en un 90% y un 10% de cocos, igual sucedió con la dilución 1:100. Para el recuento en leche de Cundinamarca en la siembra directa se observó una disminución leve en cuanto a presencia de levaduras (80%) y 20% de cocos Gram +.

En el recuento de mesófilos aerobios, donde se utilizó medio PCA para el crecimiento de bacilos, se hizo una siembra directa que no presentó crecimiento de bacilos, mas si de cocos Gram + y Gram -, a diferencia de la dilución 1:100 que mostró crecimiento de bacilos Gram - en mayor proporción. El crecimiento de cocos en la leche de Cundinamarca fue negativo en ambas diluciones, y no hubo crecimiento de bacilos, ni en la dilución directa, ni en la dilución 1:100.

El recuento de BAL en todas las muestras fue nulo, indicándonos que no hubo presencia de bacterias acidolácticas que puedan intervenir en el proceso de fermentación, o en cantidades detectables para las condiciones ensayadas.

4.2 ANALISIS FISICOQUIMICOS DE LOS FERMENTOS.

Se realizaron los respectivos análisis fisicoquímicos a los dos fermentos dando como resultado los establecidos en la tabla 11.

Tabla 11 Análisis fisicoquímicos de los fermentos.

Pruebas	Suero 1 (Sucre)	Suero 2 (Cundinamarca)
% de grasa	5.1%	4.7%
Acidez	18,3% A.L.	16,7% A.L.
Densidad	1.015	1.018
Sólidos S.N.G	14	13.1

Fuente: autores

Según los resultados arrojados por estos análisis el porcentaje de grasa tiene incidencia sobre otras pruebas, ya que se puede observar que en el fermento de la costa se encontró un contenido mas alto de acidez y presentaba mayor densidad que el fermento realizado con leche de Bogotá, posiblemente las

variaciones pueden estar sujetas al mayor contenido de grasa y proteínas no solubles.

4.3 DETERMINACION DEL CRECIMIENTO DE BACTERIAS ACIDOLACTICAS.

Para analizar el comportamiento de las bacterias acidolácticas se determinó el crecimiento de las bacterias acidolácticas referenciando el tiempo de inoculación dando como resultado lo descrito en la tabla 12

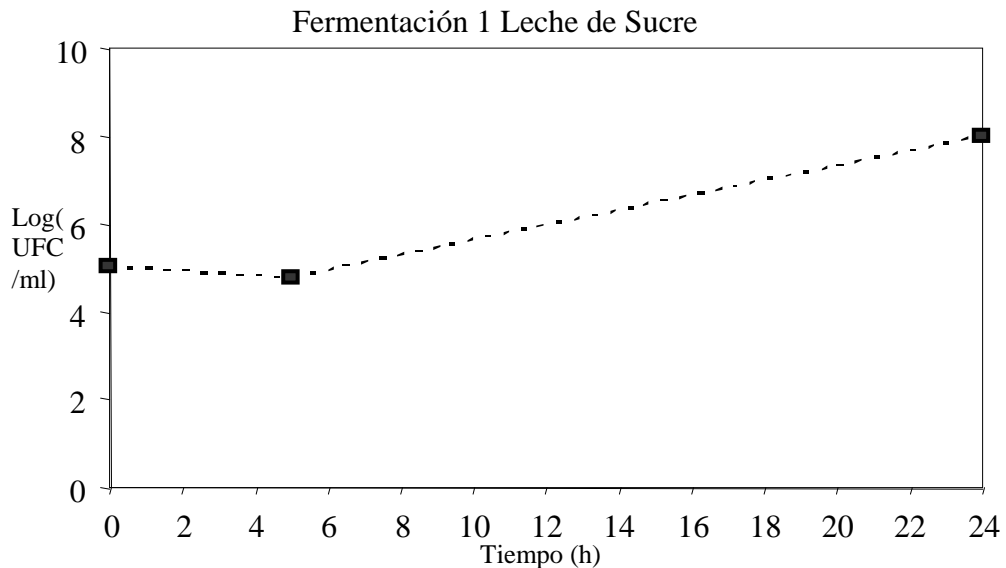
Tabla 12 Control de crecimiento de microorganismos en los fermentos.

Tiempo (horas)	Leche de Sucre		Leche de Cundinamarca	
	Fermento 1 Log(UFC _{ml})	Fermento 2 Log(UFC _{ml})	Fermento 1 Log(UFC _{ml})	Fermento 2 Log(UFC _{ml})
0	5	5	4	5.6
5	5.2	4.8	5	4.8
8	6.4	5.6	6.2	5
24	7.6	8	6	7.2

Fuente: Autores

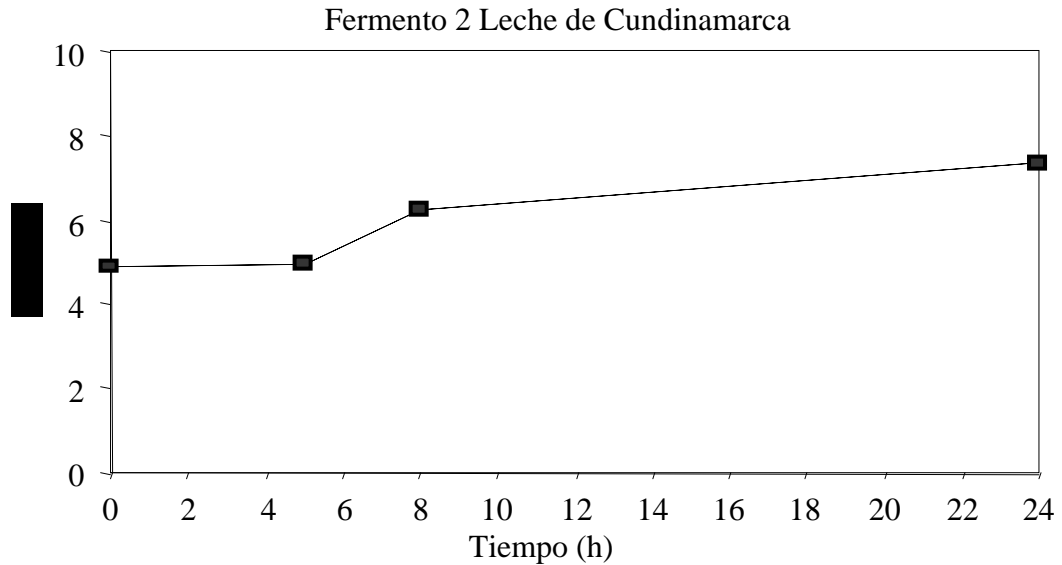
Ufc/ml (Unidades formadoras de colonias por mililitro)

Grafica 1 Comportamiento de las Bacterias Acidolácticas en el fermento 1 utilizando leche de Sucre.



Fuente: Autores

Grafica 2 Comportamiento de las Bacterias Acidolácticas en el fermento 2 utilizando leche de Cundinamarca.



Fuente: Autores

De acuerdo a las gráficas 1 y 2 se puede observar que el crecimiento de las bacterias acidolácticas en el fermento 1 y 2, con leche de Sucre, en comparación con los fermento 1 y 2 con leche de Cundinamarca fue significativo, pues a las ocho horas de empezar el fermento las UFC en los fermentos con leche de Sucre fue mayor frente a la de Cundinamarca. y al finalizar las 24 horas se mantuvo esta diferencia, lo que quiere decir que las condiciones de los fermentos con leche de Sucre muestran mejores resultados en cuanto a la presencia de nutrientes y de microorganismos, que influyen en el proceso de fermentación y por tanto al crecimiento de bacterias acidolácticas.

4.4 AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE LAS CEPAS

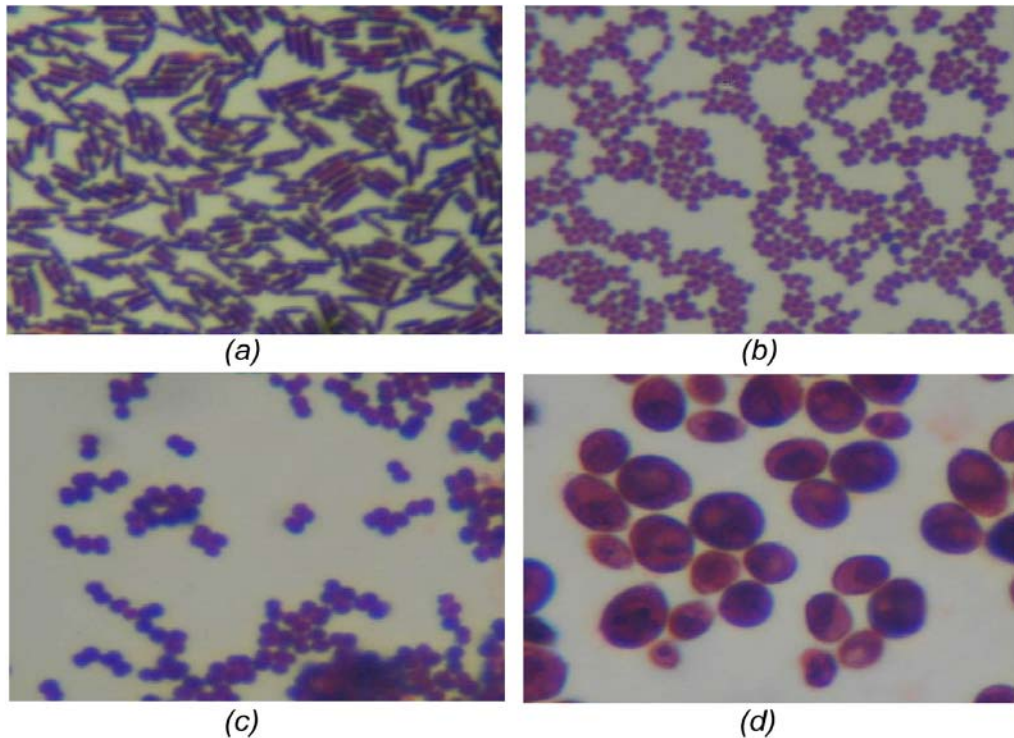
4.4.1 Aislamiento e identificación de BAL

Para el aislamiento de las cepas, inicialmente se hicieron a partir de los primeros recuentos, tomando varias colonias y sembrándolas en otras placas con medios MRS, utilizando la técnica de agotamiento por estrías.

Se realizaron varias siembras para dar mayor diversidad de las cepas aisladas, se incubaron por 24 horas hasta obtener las primeras cepas, en las cuales crecieron otras que tenían las mismas características pero que no eran BAL, luego se pasaron a otras placas sin tocar las otras colonias que la rodeaban, así de esta forma se pudieron aislar las primeras BAL por cultivos sucesivos.

Para el aislamiento de las BAL, a cada fermento se le realizó una serie de diluciones decimales, las cuales se distribuyeron en placas de agar MRS y se incubaron durante 72 h a 25°C. Tras proceder al recuento de aquellas placas que presentaban entre 25 y 100 colonias se seleccionaron diez cepas en base a su morfología, su reacción frente a la oxidasa, catalasa, y su comportamiento a la tinción de Gram. Posteriormente se confirmó la pureza del cultivo por estría en agar MRS. Las cepas se conservaron en caldo MRS con 20 % de glicerol a -20°C.

Foto 3. Cepas aisladas, observadas bajo microscópio de contraste de fase (x100). (a) Bacilo, (b) coco en grupos, (c) diplococos y cadenas, (d) levadura oval.



Fuente: Autor.

Los microorganismos que se muestran en la foto N° 3, posteriormente fueron identificados mediante las pruebas bioquímicas API 50 CHL y API 20 AUX; (a) *Lactobacillus plantarum* 1, (b) *Lactococcus lactis lactis* 2, (c) *Leuconostoc lactis*, (d) *Rhodotorula mucilaginosa* 2.

Tabla 13 Aislamiento de BAL y Levaduras

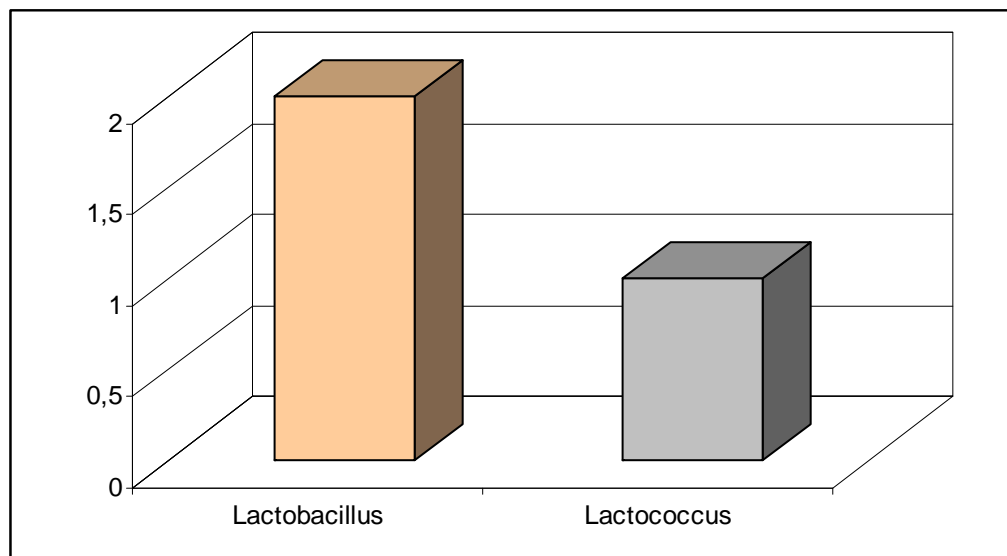
Tiempo fermentación	Aislamientos BAL	Aislamientos Levaduras	% aislamientos en cada tiempo
0 horas	-	-	
5 horas	-	-	
8 horas	-	4	100%
24 horas	4	-	100%
Totales	4	4	100,%
Total aislamientos	8		

Fuente: Autores

Para la identificación de las cepas de BAL se utilizó el sistema API 50 CHL, en la cual fue posible identificar cuatro cepas aisladas, este resultado se considera bajo debido a la presencia de microorganismos similares, ya que algunos no fueron detectados en el microscopio y que accedieron a la tinción de Gram positiva, prueba catalasa negativa y fueron reportadas como bacterias aisladas.

Las cepas de BAL identificadas se ubicaron en dos géneros: dos del género *Lactobacillus*, uno del género *Lactococcus*. (ver gráfico 3)

Gráfico 3 Distribución de géneros de BAL identificadas.



Fuente: autores

Las cepas de *Lactobacillus* predominan en las mayorías de las leches fermentadas, mientras que los géneros *Lactococcus* se encontraron en menor proporción por que son mesófilos predominantes en climas frescos y fríos, mientras que los *Lactobacillus* lo son en climas cálidos, por lo que se consideran termófilos¹²

El dominio del género *Lactobacillus* se puede explicar por que la temperatura utilizada para el proceso fermentación del suero costeño era de 35°C, ideal para el crecimiento de este género de BAL.

Se identificaron 2 especies de *Lactobacillus*, las cuales se hallaron a las 24 horas del proceso fermentativo del suero, *L. plantarum*, y *L. brevis*. De lactococcus se identificó una especie, *Lactococcus*, en el tiempo de 24 horas de fermentación, estas BAL son iniciadores de fermentaciones espontáneas en la leche, producen ácido láctico que reduce el pH y genera un sustrato favorable para el crecimiento de los *Lactobacillus*, que al desarrollarse disminuyen aun más el pH inhibiendo o disminuyendo el desarrollo de los géneros *Lactococcus* que son menos tolerantes a pH bajos que se han encontrado.¹⁸

Este fenómeno explica el dominio del genero *Lactobacillus* en la etapa final de la fermentación y la fermentación mixta al inicio del proceso.

Las 4 cepas de BAL identificadas por API 50 CHL dieron como resultado en la tinción, Gram positiva, en la prueba de catalasa, negativa, crecieron a 36°C y no fermentaron los siguiente carbohidratos de la galería API; Temoin, Erytriol, L-Xilosa, D-Adonitol, Metil-Bd-Xilopiranosida, Dulcitol, Inositol, Inulina, D-Rafinosa, Xilitol, D-Lixosa, D-Fructosa, D-Arabitol, L-Arabitol, Potasio 2-Cetogluconato, Potasio 5-Cetogluconato.

Además todas las cepas fermentaron en común los siguientes carbohidratos; D-Galactosa, D-Glucosa, D-Fructosa, D-Manosa, D-Lactosa, a excepción de las cepas identificadas como *Leuconostoc lactis* y *Leuconostoc mesenteroides ssp cremoris* que fueron incapaces de fermentar la D-fructuosa, y la D-lactosa respectivamente.

¹⁸ Sánchez y Ortega, 2003

Tabla 14. Especies de BAL identificadas en los fermentos.

RECIPIENTE FERMENTADOR	NOMBRE DEL FERMENTO	ORIGEN DE LA LECHE	<i>Lactobacillus brevis</i>				<i>Lactobacillus plantarum</i>				<i>Lactococcus Lactis Lactis</i>			
			HORAS				HORAS				HORAS			
			0	5	8	24	0	5	8	24	0	5	8	24
Calabazo 1	Fermento 1	Sucre				<u>2</u>							<u>1</u>	
Calabazo 2	Fermento 2	Cundinamarca							<u>97</u>					
TOTAL BAL			1				1				1			
TOTAL = 3														

Fuente: Autores

Nota: Los números subrayados son los códigos de aislamientos que identifican a las BAL aisladas.

Tabla 15. Especies de levaduras identificadas en los fermentos.

RECIPIENTE FERMENTADOR	NOMBRE DEL FERMENTO	ORIGEN DE LA LECHE	<i>Candida Glabrata</i>				<i>Criptococcus laurenti</i>				<i>Candida tropicalis</i>			
			HORAS				HORAS				HORAS			
			0	5	8	24	0	5	8	24	0	5	8	24
Calabazo 1	Fermento 1	Sucre			<u>42</u>								<u>140</u>	
Calabazo 2	Fermento 2	Cundinamarca						<u>44</u>						
TOTAL BAL			1				1				1			
TOTAL = 3														

Fuente: Autores

Nota: Los números subrayados son los códigos de aislamientos que identifican a las BAL aisladas.

4.4.2 Aislamiento e identificación de levaduras

Entre los microorganismos procedentes del ambiente se encuentran presentes en la leche diversas especies de levaduras, algunas encuentran en esta un medio favorable para su crecimiento.

Para la identificación de levaduras se utilizó el sistema API 20 AUX, en el cual se encontraron 5 cepas presentes en el suero costeño, entre las cuales están; *Cryptococcus laurenti*, *Candida glabrata*, *Candida tropicales*. Las levaduras están presentes en la leche en algunas ocasiones, siendo más predominante su presencia en los productos fermentados. Como se observa en la tabla 15, las especies de levaduras *Candida glabrata*, *Candida tropicales*, *Cryptococcus laurenti* se desarrollaron a las ocho horas de iniciado el proceso de fermentación.

La siembra se hizo con una suspensión de las levaduras en agua estéril adicionada de dos o tres gotas de una solución de extracto de levadura al 2% como fuente de vitaminas. El medio TGYA se preparó según Pitt & Hocking y los otros de acuerdo a Déak & Beuchat.

A los 3, 7 y 14 días se registró crecimiento macroscópico (color, forma y tamaño de las colonias) y microscópico (forma y tamaño celular, posición de los brotes, presencia de pseudomicelio, tipo y número de ascosporas). También se hicieron preparaciones microscópicas teñidas según el método de Wirtz para detectar ascosporas. Con los datos obtenidos se consultaron las claves de Déak & Beuchat.¹⁹

4.5 DETERMINACION DE LA CONCENTRACIÓN DE MICROORGANISMOS POR ESPECTROFOTOMETRIA.

En la determinación de la concentración de los microorganismos a través del espectrofotómetro se obtuvieron los siguientes resultados en la primera lectura de concentraciones expresada en absorbancia a una longitud de onda de 600nm.

Tabla 16 Lectura de patrones de levaduras

Código	Tipo de microorganismo	Absorbancia a 600 nm.
ASC00-5	<i>NI</i>	0.102
ACT03-42	<i>Candida glabrata</i>	0.137
ACT03-44	<i>Cryptococcus laurenti</i>	0.150
ACL25-140	<i>Candida tropicalis</i>	0.158

Fuente: AUTORES

¹⁹ BENITEZ, AHRENTS. Sept 2004.

Tabla 17 Lectura de patrones de BAL

Código	Absorbancia a 600 nm	
	[] 75%]50%
<i>Lactococcus lactis lactis</i> – ACS00-1	0.345	0.337
<i>Lactobacilos brevis</i> ACS00-2	0.398	0.370
<i>Lactobacilos plantarum</i> ACS212-97	0.398	0.373
NI ACCS23-126	0.394	0.356

Código	Tipo de microorganismo	Absorbancia a 600 nm
ACS00-1	<i>Lactococcus lactis lactis</i>	0.410
ACS00-2	<i>Lactobacilos brevis</i>	0.418
ACS212-97	<i>Lactobacilos plantarum</i>	0.412
ACCS23-126	<i>NI</i>	0.416

Fuente: AUTORES.

Tabla 18 Primera lectura de concentraciones de BAL

Código	Absorbancia a 600 nm	
	[] 75%] 50%
<i>Lactococcus lactis lactis</i> – ACS00-1	0.345	0.337
<i>Lactobacilos brevis</i> ACS00-2	0.398	0.370
<i>Lactobacilos plantarum</i> ACS212-97	0.398	0.373
NI ACCS23-126	0.394	0.356

FUENTE: Autores

Después de hacer las lecturas correspondientes a las concentraciones seleccionadas, se obtuvo como resultado un conteo con presencia de alta carga microbiana la cual no era la recomendada a utilizar, motivo por el cual realizaron otras lecturas a concentraciones de 25%, 50% y 100%.

Tabla 19 Primera lectura de concentraciones de levaduras

Levaduras	Absorbancia a 600 nm	
	[] 75%	[] 50%
NI ASC00-5	0.779	0.062
<i>Candida glabrata</i> ACT03-42	0.127	0.088
<i>Cryptococcus laurenti</i> ACT03-44	0.117	0.078
<i>Candida tropicalis</i> ACL25-140	0.146	0.121

Fuente: Autores

En los resultados de la primera lectura de concentraciones de 50% y 75%, observamos que los valores de absorbancia fueron muy altos y no se acercaban a los resultados esperados, por tan motivo fue necesario hacer una segunda lectura, analizando entonces concentraciones de 25%, 50% y 100%.

Tabla 20 Segunda lectura de concentraciones de levaduras

Levaduras	Absorbancia a 600 nm		
	[] 100%	[] 50%	[] 25%
NI ASC00-5	0.105	0.052	0.026
<i>Candida glabrata</i> ACT03-42	0.124	0.060	0.031
<i>Cryptococcus laurenti</i> ACT03-44	0.100	0.051	0.028
<i>Candida tropicalis</i> ACL25-140	0.125	0.066	0.033

Fuente: Autores

Después de haber realizado la segunda lectura, se determinó que la concertación de levaduras del 25% era la carga microbiana apropiada para la inoculación, de esta forma fue la de mejor comportamiento en cuanto a los tiempos de fermentación. Y se determinó que las otras concentraciones manejadas fueron descartadas para esta prueba debido a su carga microbiana tan alta.

Tabla 21 Segunda lectura de concentraciones de BAL

Levaduras	Absorbancia a 600 nm		
	[] 100%	[] 50%	[] 25%
NI ASC00-5	0.105	0.052	0.026
<i>Candida glabrata</i> ACT03-42	0.124	0.060	0.031
<i>Cryptococcus laurenti</i> ACT03-44	0.100	0.051	0.028
<i>Candida tropicalis</i> ACL25-140	0.125	0.066	0.033

Fuente: Autores

Después de haber realizado la segunda lectura, se determinó que la concertación de BAL del 25% y 50% fueron las cargas microbianas de mejor comportamiento para la inoculación.

De acuerdo a los resultados arrojados por el espectrofotómetro en cada una de las concentraciones, se realizaron las distintas siembras para la confirmación en placa, obteniéndose los recuentos determinados, el cual permitió calcular por medio de la fórmula XUFC/placa agar, la cantidad de microorganismos por mililitro de solución presentes en cada una de las preparaciones, con el fin de preparar las mezclas de manera apropiada para que las cargas microbianas fueran adecuadas.

$$\frac{\text{XUFC}}{\text{CAJA}} \times \frac{\text{dilucion}}{1 \text{ ml}} \times \frac{1 \text{ caja}}{\text{ml inoculados}} = \text{UFC/ml}$$

Tomamos como ejemplo para la aplicación, un resultado de la tabla 22 y aplicamos la fórmula:

$$\frac{4232}{1 \text{ caja}} \times \frac{1000 \text{ ml}}{1 \text{ ml}} \times \frac{1 \text{ caja}}{0.1 \text{ ml}} = 5 \times 10^3 \text{ UFC/ml}$$

4.5.1 RECuento DE LEVADURAS EN DIFERENTES CONCENTRACIONES.

De acuerdo a los resultados obtenidos de los recuentos levaduras a concentraciones de cultivo en caldo a 100%, 50% y 25 %, la dilución 1:100 en todas las concentraciones presento recuentos incontables debido a que la carga microbiana era muy alta, las poblaciones de microorganismos se calcularon con el conteo de la mejor dilución con lectura dentro del rango de la metodología y el resultado de este recuento se presenta en la ultima columna de la tabla. Teniendo en cuenta los conteos más bajos se realizaron las mezclas de microorganismos que tuvieron un desarrollo apropiado para la fermentación esperada.

TABLA 22. Conteo de levaduras según diluciones

Levadura	Concentración	Ufc/ml
<i>Candida glabrata</i>	100%	MNPC
		10^3
		10^3
	50 %	MNPC
		5×10^3
		1×10^3
	25%	MNPC
		4×10^3
		6×10^2
<i>Candida tropicalis</i>	100%	2×10^3
		2×10^2
		2×10^1
	50%	4×10^2
		4×10^1
		7×10^1
	25%	3×10^2
		6×10^1
		8×10^1
No identificable	100%	7×10^1
		9×10^1
		No crecimiento
	50%	2×10^1
		3×10^1
		No crecimiento
	25%	1×10^1
		1×10^1
		No crecimiento
<i>Cryptococcus laurenti</i>	100%	MNPC
		6×10^3
		3×10^3
	50%	MNPC
		7×10^3
		7×10^2
	25%	MNPC
		MNPC
		8×10^2

MNPC: muy numerosas para contar

Fuente: Autores

4.5.2. RECUENTO DE BAL EN DIFERENTES CONCENTRACIONES.

Tabla 23. Conteo de BAL según diluciones

BAL	Concentración	Ufc/ml
<i>Lactococcus lactis lactis</i>	100%	MNPC
		MNPC
		MNPC
	50 %	MNPC
		MNPC
		7×10^2
	25%	MNPC
		MNPC
		6×10^3
<i>Lactobacilos brevis</i>	100%	MNPC
		MNPC
		6×10^3
	50%	MNPC
		MNPC
		4×10^3
	25%	MNPC
		9×10^3
		2×10^2
<i>Lactobacilos plantarum</i>	100%	6×10^3
		3×10^3
		2×10^3
	50%	MNPC
		7×10^3
		6×10^3
	25%	9×10^3
		4×10^3
		2×10^2
No identificables	100%	MNPC
		MNPC
		5×10^3
	50%	MNPC
		MNPC
		1×10^1
	25%	MNPC
		MNPC
		6×10^1

MNPC: muy numerosas para contar

Fuente: Autores

4.6 DETERMINACION FINAL DE LAS PROPIEDADES FISICOQUIMICAS DEL SUERO COSTEÑO UTILIZANDO DIFERENTES CONCENTRACIONES DE INOCULOS MICROBIANOS.

En esta parte muestra cual de los resultados fisicoquímicos de las dos concentraciones utilizadas en la fermentación fue mejor.(ver tabla 24)

Tabla 24 Propiedades fisicoquímicas finales de los fermentos según concentraciones

Concentración de las mezclas de microorganismos	Fermento 2			Fermento 1		
	pH	% A.L	D (g/ml)	Ph	% A.L.	D (g/ml)
50%	5.13	8,6	0.44	5.04	8,5	0.62
25%	5.13	8,4	0.66	4.82	1,11	0.58

Fuente: Autores

De acuerdo a los resultados fisicoquímicos que arrojaron los fermentos de diferentes concentraciones se pudo determinar que las mejores características de pH, porcentaje de ácido láctico y densidad se encontraron en la concentración de 25% del fermento 2 (suero elaborado con muestra de Cundinamarca), en tanto el fermento 1 presentó una aceleración progresiva en la acidez afectando los tiempos de fermentación su pH y su densidad, siendo este un motivo por el cual se descartó la muestra para el análisis organoléptico.

4.7 ANALISIS ORGANOLEPTICO DE LAS MUESTRAS

Para determinar las características organolépticas de la muestra elaborada en el laboratorio se comparó con una muestra de suero costeño artesanal.

Tabla 25. Comparación de las características organolépticas de las muestras.

Característica organolépticas	Muestra laboratorio	Suero costeño artesanal
Color	Blanco característico	Blanco amarillento
Aroma y sabor	Parecido al kumis y un poco salado	Parecido al lacto suero salado
Acidez	Poca acidez	Acido
Cuerpo y consistencia	Líquido homogéneo suave algo viscoso	Líquido con presencia de grumos
Apariencia	Muy atractiva	Regular
Total	Excelente	Bueno

Fuente: autores

Según los resultados obtenidos del análisis organoléptico se puede determinar que se mejoraron las características organolépticas del suero costeño, ya que la muestra hecha en el laboratorio presentó mejores condiciones que la artesanal,

puede ser a la cantidad microbiana que fue seleccionada para la fermentación o la no presencia de otros microorganismos que intervienen de alguna forma en el proceso de fermentación.

4.8 ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DEL SUERO COSTEÑO FINAL ELABORADO EN EL LABORATORIO.

Se realizó una prueba de control utilizando leche pasteurizada para la elaboración del fermento, lo que nos permitió comparar los resultados microbiológicos del suero costeño elaborado con leche pasteurizada y leche de los dos departamentos, esto con el fin de determinar si las condiciones higiénicas de elaboración eran las mas adecuadas.

Tabla 26 Análisis microbiológico de los sueros costeños según concentraciones

Origen	Concentración	Medio	Ufc/ml
Suero costeño 1	50%	MRS	4×10^3
		PDA	5×10^3
		PCA	6×10^3
		VRBD	2×10^2
Suero costeño 2	25%	MRS	3×10^2
		PDA	8×10^3
		PCA	4×10^3
		VRBD	1×10^2

Fuente: Autores

Se puede observar que el comportamiento de los microorganismos fermentadores estuvo en concentraciones similares a las reportadas en un trabajo de tesis realizado en la ciudad de Valledupar. Se realizó un estudio con el objeto de determinar cepas benéficas de mesófilos fermentadores en los quesos que se comercializan en los expendios de la ciudad de Valledupar, utilizando técnicas de aislamiento y purificación microbiana en aras de aplicarlos en procesos de purificación microbiana con el fin de utilizarlos en procesos de bioconservación de queso costeño.

En esa investigación se realizó la técnica del Swab (siembra por contacto) en agar MRS; este último permitió el aislamiento de levaduras (79,59%) cocos diversos Gram positivos (17,86) y bacilos Gram. positivos (2.55%).

La levaduras aisladas fueron del tipo *Kluyveromces lactis*, *Kluyveromices fragilis*, *Kluyveromices bulgaricus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida versatis* y *Zigosaccharomyces rouxii*.

Es de anotar que el principal papel de las levaduras en los quesos es el metabolismo del ácido láctico provocando el aumento de acidez, permitiendo el crecimiento de las bacterias responsables de la maduración de los quesos. Las levaduras inoculadas a los quesos le confieren sabor y textura por lo que esta investigación trae complicaciones imputables al desarrollo económico de la región²⁰

²⁰ VILLEGAS, RAFAEL. 2000

CONCLUSIONES

Utilizando el método API 50 CHL se aislaron tres tipos de bacterias acidolácticas en los fermentos 1 y 2 (BAL), *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus plantarum* y *Lactococcus lactis lactis*.

Se lograron identificar tres tipos de levaduras en ambos fermentos utilizando el método API 20 AUX, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata* y *Cryptococcus laurenti*.

El fermento 2 realizado con leche procedente de Cundinamarca presentó mejores características fisicoquímicas y microbiológicas durante el proceso fermentativo de la elaboración del suero costeño, en comparación con el fermento realizado con leche procedente de Sucre, dado que este último presentó mayor carga contaminante y una acidez muy alta.

La concentración del 25% de mezcla de microorganismos fue la más adecuada, para que la producción del fermento se diera bajo condiciones aceptables desde el punto de vista microbiológico y fisicoquímico.

RECOMENDACIONES

Se recomienda para futuras investigaciones realizar mayores repeticiones en la preparación de las muestras para obtener datos más exactos, que nos permitan escoger las cepas adecuadas para el proceso fermentativo.

Ampliar la investigación de este proyecto, en cuanto a la determinación de los microorganismos causantes de la fermentación, siendo este el punto de partida existente en muchas especies presentes y solo pudimos identificar tres especies de BAL y tres especies de levaduras. Por esta razón se considera que este proyecto es un preliminar para la realización de nuevos proyectos donde pueden investigar a fondo el comportamiento de las BAL, desde su estructura bioquímica hasta su estructura molecular.

BIBLIOGRAFIA

Benítez Ahrendts, M.R. and Carrillo, L. Levaduras inhibidoras de Penicillium. Rev. Argent. Microbiol., Dic 2004, vol.36, no.4, p.182-186.

CHAMIE, Ana. Y GARCIA, Paola. Caracterización fisicoquímica del "Suero costeño". Chía, 1999, 216p. Trabajo de grado (Ingeniero de Producción Agroindustrial). Universidad de La Sabana Colombia. Facultad de Ingeniería.

FERNADEZ, A., REVIRIEGO, L., FERNANDEZ, L. y RODRIGUEZ, J. Cultivos iniciadores funcionales. Revista Alimentación Equipos y Tecnología No 194, p. 94-97. Octubre de 2004.

FRAZIER, J. 1994. Ficha técnica de API 50 CHL, 50 CHL Médium y API 20 AUX. Biomerieux.

ICMSF. Internacional Comisión on Microbiological Specifications for Foods. Ecología microbiana de los alimentos. Productos Alimenticios. Vol. 2. Zaragoza: Acribia S.A., 1983.

ICTA, INSTITUTO DE CIENCIA Y TECNOLOGIA DE ALIMENTOS Universidad Nacional, Manual de elaboración de productos lácteos fermentados, junio de 1988.

JAY, JAMES. Microbiología moderna de los alimentos. Conservación de alimentos. Zaragoza: Acribia S.A., 2002. 615p.

JAMES, ALBERT. Microbiología aplicada, Bogotá editorial 1996.

LALAURETTE, SEBASTIAN. El Kéfir hongo curativo noviembre, 2002.

LEVEAU, Y. y BOUIX, M. Microbiología industrial. Microorganismos de interés industrial. Zaragoza: Acribia S.A., 2000. 595p.

ORGANIZACIÓN DE NACIONES UNIDAS PARA LA AGRICULTURA Y LA ALIMENTACION. Oficina Regional de la FAO para América Latina y El Caribe. Tabla de Composición de Alimentos. (on line) Colombia 2005.

<http://www.rlc.fao.org/bases/alimento/print.asp?dd=3489>

PUMAROLA A, RODRIGUEZ A, GARCIA JA, Piedrola G. Microbiología y parasitología médica. Barcelona, Salvat Editores S.A., 2ª ed., 1982,

Sánchez-Ortega, I., Zúñiga-Estrada, A., Clavel-Maqueda, M., Ortiz-Balderas, M. y Ramírez –Hernández, S., Román-Gutiérrez, A. y Santos-López, E 2004.

SERPA FAJARDO, JOSE GABRIEL. Efecto del suero costeño como mejórate de calidad de una harina de trigo comercial. Chía, 1998, 91p. Trabajo de grado (Ingeniero de producción agroindustrial). Universidad de La Sabana Colombia. Facultad de Ingeniería.

TOGO. Chamunorwa., FERESU, Sara. y MUTUKUMIRA, Anthony. Identification of Lactic Acid Bacteria isolated from Opaque beer (*Chibuku*) for potential use as a starter culture. The all of food technology in Africa. Vol 7, No. 3, p. 93-97. 2002.

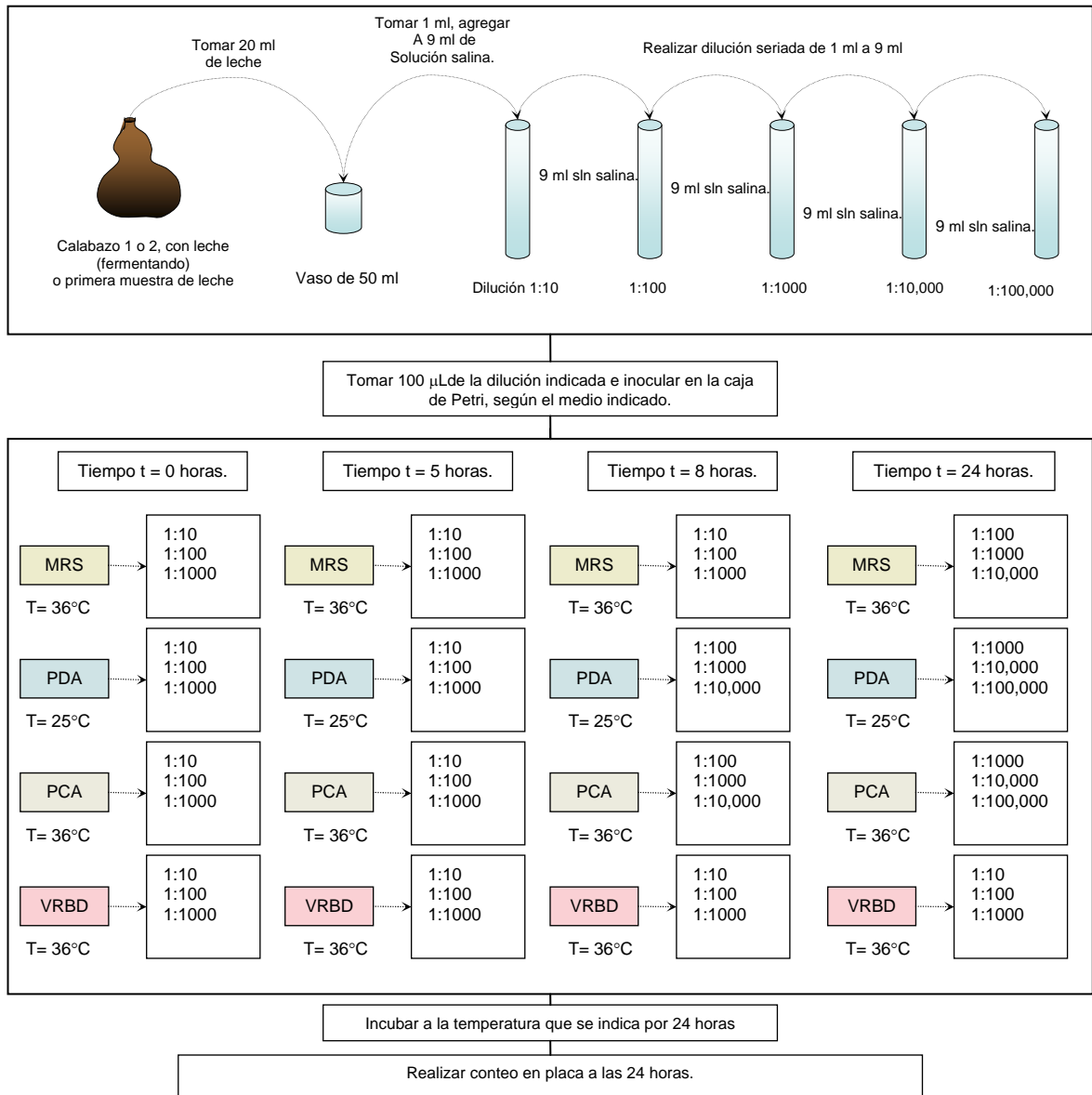
VEISSEYRE, Roguer. Lactología Técnica. Elementos biológicos de la leche. Edición en español. Zaragoza: Acribia S.A., 1988, 629p.

VILLEGAS, RAFAEL. Selección y conservación de levaduras para procesos de bioconservación septiembre, 2000.

ANEXOS

ANEXO A

Diluciones seriadas y siembra para conteo en placa según el tiempo de fermentación del suero



Interpretación de resultados

Tras la incubación de las placas, se cuenta en número de colonias en cada placa y los resultados se organizan en la siguiente fórmula.

$$UFC/ml = C * D / V$$

Donde:

C = Colonias contadas en placa

D = Factor de dilución

V = Volumen de siembra en placa (0,1 ml o 1 ml)

Los datos son expresados también como logaritmo en base 10. *Log (UFC/ml)*

.

ANEXO B

SISTEMA CRYOBANK

CRYOBANK™

Sistema de fácil manipulación diseñado para almacenar en forma congelada muestras de cepas o cultivos bacterianos con rápida y eficiente recuperación.

MODO DE USO



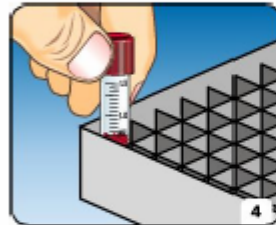
De una placa que contenga un cultivo fresco (de no más de 18 horas), retire una muestra concentrada y disuélvala en el medio que contiene el tubo de CRYOBANK™.



Agite hasta incorporar completamente la muestra al medio invirtiendo el tubo, esto permitirá que las bacterias se adhieran a las perlas.

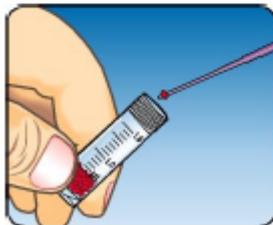


Con una pipeta estéril remueva del tubo el medio de cultivo de CRYOBANK™.

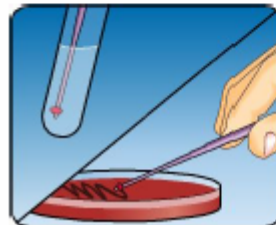


Inmediatamente después almacene el tubo de CRYOBANK™ a -70°C o en nitrógeno líquido.

RECUPERACIÓN (Activación)



Remueva el tubo de CRYOBANK™ del congelador o contenedor de nitrógeno líquido. Remueva la tapa del tubo de CRYOBANK™. Remueva una perla usando pinza o una alsa de aguja para inoculación.



Pase la perla sobre la superficie de una placa que contenga un medio de cultivo apropiado o deposítela en un caldo nutritivo.

De inmediato regrese el tubo de CRYOBANK™ con las perlas sobrantes al congelador o contenedor de nitrógeno líquido para prevenir que se descongelen.

ALMACENAMIENTO DE TUBOS CRYOBANK ESTERILES

Los tubos estériles CRYOBANK pueden ser almacenados en cuartos fríos y refrigeradores protegidos de la luz.

Antes de usar los tubos se debe chequear que el líquido crioprotector no este turbio, si se presente este caso descartar el tubo.

Fuente: <http://www.copaninnovation.com>

ANEXO C

MODELOS DE FERMENTACIONES UTILIZADAS

FERMENTACIONES		1	2	4	5	6	7
MEDIO	TIEMPO	Sincelejo 1	Sincelejo 2	Nemocón 1	Nemocón 2	UHT 1	UHT 2
MRS BAL	0	4,85	5,03	3,80	5,34	1,26	1,26
	5	4,92	4,77	5,21	4,40	5,84	4,65
	8	6,21	6,21	6,27	6,27	6,11	6,41
	24	7,31	8,00	6,97	7,42	6,98	8,36
PDA Levaduras	0	4,92	5,26	4,48	5,22	3,41	3,41
	5	4,56	5,81	4,44	4,17	5,68	5,15
	8	5,01	5,01	5,36	5,36	6,15	6,30
	24	6,36	7,63	6,92	7,73	7,10	7,74
PCA Mesófilos	0	5,22	5,29	4,69	5,44	3,35	3,35
	5	5,22	5,95	4,09	5,06	5,53	5,12
	8	5,06	5,06	6,05	6,05	6,24	6,58
	24	6,57	7,17	6,82	7,63	6,69	7,54
VRBD Enterobacterias	0	5,93	4,97	4,46	5,07	3,43	3,43
	5	3,89	5,81	4,64	4,71	0,00	3,44
	8	5,97	5,97	5,16	5,16	0,00	4,97
	24	4,00	7,60	4,11	7,47	3,49	6,65