

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL CALLAO

Facultad de Ingeniería Química
Escuela Profesional de Ingeniería Química



Evaluación de los hidrolizados de *Hordeum vulgare* (Cebada),
Chenopodium quinoa wildnow (Quinoa) y *Glycine max* (Soya)
como sustrato favorable para la elaboración de un producto
nutracéutico a base de *Lactobacillus acidophilus*.

TESIS

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE INGENIERO
QUÍMICO

PRESENTADO POR :TAIPE CASTRO, FREDY ANDRÉS

ASESOR :ING. CARLOS E. ANGELES QUEIROLO

BELLAVISTA – CALLAO

2012



PRÓLOGO DE JURADO

La tesis fue sustentada por el bachiller **Fredy Andrés Taipe Castro**, ante el **JURADO DE SUSTENTACIÓN DE TESIS** conformado por los siguientes docentes:

Mg. ZOILA MARGARITA, DIAZ CORDOVA : Presidente

Mg. MARIA ESTELA, TOLEDO PALOMINO : Secretaria

Mg. VIORICA, STANCIUC STANCIUC : Vocal

Ing. CARLOS ERNESTO, ANGELES QUEIROLO : Asesor

Tal como está sentado en el libro de actas de sustentación de tesis: **LIBRO 2 FOLIO N°52 ACTA N° 235** con fecha veinticinco del mes de junio de dos mil doce.

DEDICATORIA:

A Dios

Por mostrarnos día a día que con humildad, paciencia y sabiduría todo es posible.

A mi madre Lucia M. Castro Y.

Por darme la vida, quererme mucho, creer en mi y porque siempre me apoyaste.

A mi padre Eladio P. Taipe R.

Por sus consejos y ser ejemplo de perseverancia y constancia que lo caracterizan y que me ha infundado siempre, por el valor mostrado para salir adelante.

AGRADECIMIENTOS:

Agradecimiento especial al Lic. Edgar Zarate por toda su orientación y conocimientos impartido en cada momento del desarrollo de la tesis.

Al Ing. José. R. Cáceres, por brindarme las instalaciones del centro de investigación experimental tecnológico de la universidad nacional del callao para la realización del trabajo de investigación y su constante preocupación.

A mis amigos Ana Rosa, María del Pilar, Luis, Manuel, Martín, Olinda, Julia y Julio; que siempre estuvieron al lado mío para ayudarme, escucharme, aconsejarme y muchas veces guiarme. GRACIAS.

A mis hermanas Eliana y Lily que en cada momento de la tesis me brindaron todo su apoyo y ser un ejemplo de desarrollo profesional; a mis hermanos Deny, Cesar y sus esposas Liliana, Marly, por escucharme y aconsejarme en los momentos de dificultad. GRACIAS.

INDICE	Pág.
PRÓLOGO	2
RESUMEN	3
INTRODUCCIÓN	4
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	6
FORMULACIÓN DEL PROBLEMA	7
OBJETIVOS GENERALES OBJETIVOS ESPECIFICOS	7
HIPÓTESIS	8
FUNDAMENTOS DE CINÉTICA DE CRECIMIENTO BACTERIANO Y SUSTRATOS FAVORABLES PARA LA ELABORACIÓN DE ALIMENTOS FUNCIONALES.	
ANTECEDENTES	9
BACTERIAS LÁCTICAS	19
PROBIÓTICOS Y EFECTOS NUTRACEUTICOS	28
CEBADA, QUINUA Y SOYA	35
CINÉTICA DE CRECIMIENTO BACTERIANO	41
METODOLOGÍA	
MATERIALES	45
METODOS DE ANALISIS	48
DISEÑO EXPERIMENTAL	50
RESULTADOS	58
ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	69
CONCLUSIONES	76
RECOMENDACIONES	77
REFERENCIAS	78
ANEXO	

PRÓLOGO

La demanda del mercado nacional e internacional ha impulsado en los últimos años una nueva línea de alimentos funcionales probióticos, productos alimenticios que, además de su valor nutritivo intrínseco, ayudan a mantener el estado de salud general del organismo y a la vez pueden tener un efecto benéfico adicional, terapéutico o preventivo en el huésped. El concepto de alimentos funcionales tiene su origen en una relación existente entre alimentación y salud y la posibilidad de contar con reguladores biológicos (donde las bacterias lácticas juegan un papel protagónico) que disminuyen el riesgo de prevenir enfermedades.

Los microorganismos comúnmente empleados como probióticos se encuentran disponibles a través de laboratorios o industrias alimenticias a nivel internacional así como en colecciones de cultivos. Sin embargo, muchos de ellos con propiedades particulares. La mayoría de los probióticos recomendados son las especies de *Lactobacillus* incluyendo *Lb. acidophilus*, *Lb. plantarum*, *Lb. casei* y *Lactis*, etc. Además adicionar probióticos a los alimentos proporciona varios beneficios a la salud reduciendo el nivel de colesterol en el suero sanguíneo, mejora la función gastrointestinal, mejora el sistema inmune y reduce el riesgo de cáncer de colon. (Taranto M. y Col.).¹

¹ TARANTO M., MEDICI M. y FONT G.; Alimentos funcionales probióticos; Revista Química Viva, número 1, año 4, 2005

RESUMEN

El presente trabajo consiste en evaluar los hidrolizados de soya, quinua y cebada por separado como sustrato más favorable para la viabilidad del crecimiento de un microorganismo probiótico *Lb. acidophilus* en aerobiosis, en consecuencia se obtuvo un producto nutracéutico. Para lo cual se cultivó dicho microorganismo en tres medios: hidrolizado de soya, hidrolizado de quinua, hidrolizado de cebada y caldo MRS, este último como control de comparación.

Los microorganismos se cultivaron a 38.5°C, durante 57 horas. La capacidad como sustrato favorable de los hidrolizados de soya, quinua y cebada se evaluó a través de los parámetros de cinética de crecimiento del *Lactobacillus acidophilus* que corresponden al tiempo de latencia, velocidad máxima de crecimiento, tiempo de generación, teniendo en cuenta la viabilidad del microorganismo por sobre 10⁷UFC/mL. Los resultados mostraron que *Lb. acidophilus* en hidrolizado de soya tuvo menor tiempo de latencia (5.03h), mayor velocidad máxima de crecimiento (0.40UFC/h) y mejor tiempo de generación (1.71), que los obtenidos en hidrolizados de quinua; tiempo de latencia (6.08h) velocidad de crecimiento (0.37UFC/h) tiempo de generación (1.84) e hidrolizado de cebada; tiempo de latencia (7.02h) velocidad de crecimiento (0.33UFC/h) tiempo de generación (2.08).

Alcanzando en el hidrolizado de soya una población máxima de 10¹⁰UFC/mL, bajo las condiciones de la experiencia.

I. INTRODUCCIÓN

En la actualidad los consumidores han desarrollado conciencia por el cuidado de su salud, dando importancia al consumo de alimentos nutritivos y saludables. Por tanto la industria procesadora de alimentos se encuentra en búsqueda permanente de fuentes alimenticias que además de nutrir ayuden a prevenir y curar enfermedades, características que llevan consigo los productos nutracéuticos.

La soya, quinua y cebada son altamente recomendables por sus principios digestivos contribuyendo así en un balance muy adecuado en la alimentación humana, además son una valiosa fuente de proteínas, vitaminas, minerales y grasas, necesarias para una buena nutrición y cuidado de la salud.

El *Lactobacillus acidophilus*, es una bacteria reconocida desde hace décadas por sus efectos positivos en el tratamiento de desórdenes intestinales. Evidencia que este microorganismo puede implantarse en el intestino del hombre, y ser valioso en la terapia de estreñimiento, diarrea y colitis. Efectos antagónicos del *Lactobacillus acidophilus*, contra varias bacterias patógenas (*E. coli* y *shigella*), se le han atribuido, ya con cierta evidencia científica, efectos positivos sobre la estimulación del sistema inmunológico.

Los hidrolizados de soya, quinua y cebada postulan como buenos sustratos en la búsqueda de medios que permitan la supervivencia del *Lactobacillus acidophilus*, ofreciendo a la población humana beneficios a la salud y prevención de enfermedades en base al desarrollo de nuevos productos funcionales derivados de las mismas, con la finalidad de proveer nuevos conceptos, considerando el bajo costo del procesamiento.

Para lograrlo se plantea evaluar la supervivencia del *Lactobacillus acidophilus* en tres sustratos como son soya, quinua y cebada las cuales presentan nutrientes valiosos para la obtención un producto nutracéutico.

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Europa, Estados Unidos y Japón, han desarrollado alimentos a base de probióticos, entre los cuales se encuentran los derivados de la leche y los cereales. El mercado de los probióticos se ha desarrollado básicamente en los productos lácteos.

En el mercado nacional encontramos una diversidad de productos (cereales, pseudocereales, leguminosas, etc.), las cuales presentan en su estructura fisiológica elementos que permitan abastecer de nutrientes y así actúen como medios de supervivencia y vehículo para transportar a la bacteria probiótico *Lactobacillus acidophilus*. Estos alimentos mejoran la digestibilidad de las proteínas y favorece su absorción intestinal. Comparando con la proteína de partida, también puede actuar como potenciales reguladores fisiológicos del metabolismo durante el proceso de absorción intestinal, otorgándole propiedades funcionales.

Investigando la viabilidad del microorganismo en sustratos manejables y consumo cotidiano, como son la soya, quinua y cebada; podemos potenciar los beneficios de estos sustratos; de este modo se busca comparar la capacidad de estos hidrolizados de soya, quinua y cebada respectivamente, como sustrato para la viabilidad del *Lactobacillus Acidophilus* obteniéndose finalmente materias primas para el desarrollo de nutracéuticos.

II.1. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

¿Cuál de los hidrolizados de *Hordeum vulgare* (cebada), *Chenopodium quinoa wildnow* (quinua) y *Glycine max* (soya) es favorable como sustrato para la obtención de un producto nutracéutico a base de *Lactobacillus Acidophilus*?

II.2. OBJETIVOS GENERALES

Determinar el hidrolizado de *Hordeum vulgare* (cebada), *Chenopodium quinoa wildnow* (quinua) y *Glycine max* (soya) favorable como sustrato para la obtención de un producto nutracéutico a base de *Lactobacillus acidophilus*.

II.3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obtener la cantidad proteica de los hidrolizados a base de soya, quinua y cebada en (%N) requeridos por el *Lactobacillus acidophilus*.
- Determinar las curvas de cinética de crecimiento del *Lactobacillus acidophilus* (UFC/mL) en los hidrolizados de cebada, quinua y soya respectivamente.
- Determinar los parámetros de crecimiento: μ_{max} , T_{lag} , T_g ; mediante modelamiento del *Lactobacillus acidophilus* en los sustratos de hidrolizados de cebada, quinua y soya respectivamente.
- Comparar los parámetros de crecimiento de *Lactobacillus acidophilus* en sustratos de hidrolizado de cebada, quinua y soya respectivamente.

II.4. HIPÓTESIS.

Si el hidrolizado de soya presenta mejor cantidad protéica (%N) que el hidrolizado de quinua y cebada, entonces es el mejor sustrato para la supervivencia del *Lactobacillus Acidophilus* por lo tanto se obtendrá un producto nutracéutico a base del probiótico.

III. FUNDAMENTOS DE CINÉTICA DE CRECIMIENTO BACTERIANO Y SUSTRATOS FAVORABLES PARA LA ELABORACIÓN DE ALIMENTOS FUNCIONALES.

III.1. ANTECEDENTES

III.1.1. LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS

A. BARRÓN, M. y col. (2006)². Estudio el efecto de 1, 10, 20 y 100 mg/mL de liofilizados de medios condicionados con probióticos (*Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* y *Lactococcus lactis*) sobre el crecimiento axénico in vitro de *E. histolytica*. Las concentraciones ensayadas mostraron diferencia estadística significativa (ANOVA $p=0.05$) como inhibidores del crecimiento in vitro de *Entamoeba histolytica*. Estos resultados ofrecen posibilidad de contar con una alternativa nutricional para la prevención y tratamiento de la amibiasis sin presentar efectos secundarios indeseables.

B. BARRÓN, M. y col. (2008)³. Estudiaron el control de la amibiasis y sus múltiples manifestaciones clínicas, la droga de elección es el metronidazol; sin embargo, esta droga ocasiona diversos efectos

²BARRÓN, M. Acción inhibitoria de probióticos sobre el crecimiento axénico in vitro de *Entamoeba histolytica*. Revista salud pública y nutrición, 2006, 7.

³BARRÓN M. SERRANO G. VILLAREAL L. VERDUZCO J. MORALES M. MATA B., Inhibición del crecimiento axénico in vitro de *entamoeba histolytica* por acción de probióticos. Cuenca UANL, 2008, 11: 235-290.

secundarios indeseables en los pacientes, y recientemente se ha reportado resistencia de algunas cepas de *E. histolytica* al metronidazol. En este trabajo se reporta la inhibición del crecimiento de trofozoitos de *E. histolytica* por acción de los liofilizados de medios condicionados con *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus acidophilus*, probióticos que pueden considerarse como alternativa de prevención o tratamiento contra la amibiasis.

C. NOBRE L. y col. (2001)⁴, estudiaron la capacidad de *Lactobacillus acidophilus* antagonizar a *Salmonella enterica* subsp. enterica ser. *Typhimurium* y para reducir las consecuencias patológicas para el anfitrión, fue determinar el uso de animales convencionales y gnotobióticos. Convencionales ratones NIH (National Institute of Health) recibidas diariamente por sonda de 0,1 ml de suspensión conteniendo cerca de 10^8 UFC de *Lb. acidophilus* y animales germfree recibido una sola dosis de 0,1 ml. Los grupos de gnotobióticos y convencionales fueron infectados por vía oral con 10^2 y 10^5 UFC de *Subsp. typhimurium*, respectivamente, los 7 días después del inicio del tratamiento. Los grupos control fueron tratados con solución salina estéril en lugar de *Lactobacillus*. Los datos de supervivencia mostró un efecto protector contra las bacterias patógenas en *Lactobacillus* tanto convencionales como

⁴NOBRE L. NEUMANN E. QUERCIA L. NICOLI J., Protection by *Lactobacillus acidophilus* ufv-h2b20 against experimental oral infection with salmonella enterica subsp. Enterica ser. Typhimurium in gnotobiotic and conventional mice, Brazilian Journal of Microbiology, vol.32.

gnotobióticos ratones tratados. *Lb. acidophilus* colonizado el tracto digestivo de los ratones gnotobióticos y el número de células viables varió desde 10^9 hasta 10^{10} UFC/g de heces. En tanto experimental como el control de los animales gnotobióticos, *Subsp. Typhimurium* se convirtió rápidamente se estableció a un nivel que van desde 10^8 hasta 10^{10} UFC/g de heces y se mantuvo en niveles elevados. En conclusión, el tratamiento previo de los ratones con *Lb. Acidophilus* protege a los animales contra la infección experimental con *Subsp. typhimurium*, pero esta protección no se debió a la reducción de las poblaciones de patógenos en los intestinos.

D. SAMANIEGO, L. y col. (2000)⁵. Describen que la nutrición y condiciones de crecimiento de los *Lactobacillus* presentan particularidades para cada especie respecto a los requerimientos nutricionales compleja para los aminoácidos, péptida, derivados de ácidos nucleídos, vitaminas, sales, ácidos grasos o esteres de ácidos grasos y carbohidratos fermentables. Requieren no sólo carbohidratos como fuentes de carbono y energía, sino también: aminoácidos, vitaminas y nucleótidos.

⁵SAMANIEGO LUZ MARÍA Y SOSA DEL CASTILLOS, MARYLA. *Lactobacillus spp.*: Importantes promotores de actividad pro biótica, antimicrobiana y bioconservadora. La habana. Primera edición Editorial UNIV MES, 2000. pp. 5-6

III.1.2. HIDROLIZADOS DE SOYA, QUINUA Y CEBADA

A. **ANCASI, V., (1992)⁶**; en alimentos a base de cebada hidrolizada, kiwicha y leche entera en polvo; trabajo un hidrolizado de cereales en dos etapas diferenciadas una primera que buscó hidrolizar la harina de cebada, usando malta como fuente de enzimas y la segunda que consistió en la utilización de hidrolizado de la harina de cebada más kiwicha y leche en polvo en formulaciones hidrolizadas, con el fin de obtener mezclas óptimas para el consumo humano. Para la hidrólisis de la harina de cebada se empleó una temperatura de gelatinización de 86 °C por 1 minuto y una concentración de sustrato al 20 %. Con una relación de malta/harina base seca (bs) de 10% en 15 minutos se sacarificación se logró altos niveles de degradación (ED = 68%); ED (digestibilidad promedio), pero para efectos del trabajo se buscó una hidrólisis parcial por lo tanto tomo como parámetros de la misma una relación malta/harina (bs) de 1% con un tiempo de 5 minutos. Para formular las mezclas se utilizó el método de computo químico, las de mayor representatividad fueron deshidratadas y se les realizó pruebas físico-químicas; las cuales fueron: M3 que mostro un 11.65% en contenido protéico, aporte calórico de 365.5kCal/100g. y un ED de 30; M14 con 14.02% de contenido protéico, aporte calórico de 373 Kcal/100g y 26.6 de ED.

⁶ANCASI,V. "Alimentos a base de cebada hidrolizada, kiwicha y leche entera en polvo". Tesis. Lima:Perú.UNAL.1992.

B. **BENÍTEZ, R y col. (2008)**⁷; en hidrolizados de proteína: procesos y aplicaciones; resume que en la hidrólisis de proteínas hasta péptidos o aminoácidos, por acción de enzimas proteolíticas, la composición final, por lo tanto, el uso de los hidrolizados dependerá principalmente de la fuente protéica, del tipo de proteasa usada, de las condiciones de hidrólisis y del grado de hidrólisis alcanzado en la reacción. Los hidrolizados se utilizan ampliamente en la tecnología alimentaria por sus propiedades nutricionales o funcionales (solubilidad, poder emulsificante, capacidad espumante).

C. **BRAVO, B. (1997)**⁸; en estudio de la hidrólisis enzimática de la harina de quinua (*Chenopodium quinoa wild*); realizó el estudio de la hidrólisis enzimática de la harina de quinua utilización de las siguientes enzimas comerciales: α -amilasa "FUNGAMYL 1600S", celulasa "CELLUCLAST 1.5L", pectinasa "ULTRASYM 100G", aminoglucosidasa "AMG 400L", complejo de proteasa/peptidasa "FLAVOURZYME" y endoproteasa "ALCALASE 2.4L" y "NEUTRASE 1.5 mg". En este estudio combinó enzimas con lo cual obtuvo hidrolizados de mayor recuperación de sólidos, mayor

⁷BENITEZ, R. y col.; hidrolizados de proteína: procesos y aplicaciones

Disponible en: en <http://www.scielo.org.ar>; consultada el 16 de setiembre del 2009

⁸BRAVO, B.; Estudio de la hidrólisis enzimática de la harina de quinua (*Chenopodium quinoa Wild*); tesis para optar título de ingeniero de Industrias Alimentarias, Universidad Nacional Agraria Lima; 1997.; pp.3-4.

ED y más estables; luego se estudió la hidrólisis sucesivas del almidón y de la proteína. Se hidrolizó el almidón de la harina de acuerdo a los parámetros de concentración de enzima y tiempo seleccionados. La mezcla hidrolizada se acondicionó para la hidrólisis de la proteína y sin inactivar previamente la α -amilasa, se evaluó la hidrólisis en función de la concentración de enzimas y del tiempo. Encontró que la hidrólisis con "ALCALASE" o "FLAVOURZYME", produjeron hidrolizados de mayor contenido protéico (1.79% y 1.68% respectivamente) que los obtenidos con NEUTRASE" (0.99%). Asimismo los hidrolizados obtenidos con "FLAVOURZYME" tuvieron mayor grado de hidrólisis protéica.

D. **GUADIX, A. y col. (2000)**⁹; en procesos tecnológicos y métodos de control en la hidrólisis de proteínas; (4) afirman que una de las aplicaciones más importantes de los hidrolizados de proteínas es sus utilización como fuente de nitrógeno en la formulación de dietas enterales con destino a la alimentación infantil y/o de adultos enfermos. Estas dietas entéricas se diseñan para ser esenciales en el tratamiento de pacientes con desordenes estomacales o problemas de la mucosa intestinal, así como en lactantes con síndrome de mal absorción – mal nutrición, con cuadros alérgicos en la mayoría de los casos.

⁹ GUADIX, A. Procesos tecnológicos y métodos de control en la hidrólisis de proteínas. Departamento de Ingeniería Química. Universidad de Granada. 2000, 81-82.

E. **TAPIA, M. y col. (2009)¹⁰**; en LOS CEREALES ANDINOS; afirman que la proteína de los granos andinos es una rica fuente de aminoácidos esenciales que puede ser complementada adecuadamente con otros productos de origen vegetal como el tarwi, haba, frijol, maíz, cebada, etc. Además, los tubérculos y las raíces constituyen excelente fuentes de energía. La quinua, la cañihua y el amaranto (kiwicha) son tres granos de pequeño tamaño, con un embrión bastante desarrollado (25% del total del grano en la quinua), en el cual se concentra una importante cantidad de proteínas. El contenido de proteínas y grasas de estos granos es más alto al de cereales.

F. **ZONABRIA, S. (2003)¹¹**. Obtuvo una bebida a base de quinua (*Chenopodium quinoa Willd*) hidrolizada, que consistió en la obtención de un hidrolizado enzimático, la formulación de la bebida y la determinación de la composición del producto final. En este caso se utiliza una quinua de variedad Kancolla proveniente de la zona agroecológica del altiplano de Puno – Perú, con 13.84% de proteína y 71.97% de almidón (bs); y las enzimas comerciales α -amilasa "THERMAMYL TYPE LS" de *Bacillus licheniformis*,

¹⁰TAPIA, M. y col.; Los cereales andinos.

Disponible en: <http://www.musclecoop.com>; consultado el 20 de setiembre de 2009

¹¹ZONABRIA GALVEZ, SONIA JACKELINE. "Obtención de una bebida a partir de quinua (*Chenopodium quinoa Willd*) hidrolizada". Lima: Perú.UNAL. 2003.

proteasa "FLAVOVOURZYME" de *Aspergillus oryzae*, pectinasa "ULTRAZYM" de *Aspergillus niger* y otra proteasa "NEUTRASE" de *Bacillus subtilis*. En la hidrólisis de la harina y a menores tamaños de partículas, se obtuvo mayor recuperación de sólidos con respecto al grano (húmedo), cocido, licuado y molido coloidalmente; la adición de una proteasa bacteriana no incrementó la recuperación de sólidos y los sobrenadantes presentaron una alta opacidad y sabor amargo. Por ello llegó a un flujo final las cuales constan de molienda y tamizado de los granos a 125µm, al 98% de extracción, cocción – hidrólisis con α -amilasa, acondicionamiento de temperatura, complementación hidrolítica con pectinasa y proteasa fungal, centrifugación, lixiviación de la torta residual, concentración, formulación, tratamiento térmico y envasado; se obtuvo: recuperación de sólidos, 78.21 %, ED 63 :43; retención de almidón 11.3%, recuperación de proteínas, 77.33% contenido de proteína, 1.7%. Las Kcal (58.5) y cantidad de minerales cumplen con las recomendaciones para bebidas funcionales, del mismo modo los aminoácidos esenciales para niños de edad pre-escolar.

III.1.3.ALIMENTOS FUNCIONALES

A. **ROBINSON, D. (1991)**¹²; en bioquímica y valor nutritivo de los alimentos; señala que en muchas proteínas de los alimentos, incluidos las de huevo, la carne y las semillas, el calentamiento y la desnaturalización posterior incrementan su digestibilidad. La desnaturalización de la proteína expone a los aminoácidos y enlaces peptídico más internos y por lo tanto permite la hidrólisis generalizada por las enzimas. En los cereales y legumbres, el calentamiento también produce la desnaturalización de muchos de los inhibidores de proteínasas que contienen, mejorando así su valor biológico.

B. **CHEL GUERRERO, L. y col. 2008**¹³. Estudian un nuevo concepto de nutrición alimentaria que incluye a aquellos alimentos que presentan una potencialidad en el mejoramiento de la salud y disminuyen los riesgos de enfermedades en el cuerpo humano. Por esto varias industrias alimentarias como DanoneMR, NestléMR, PolevaMR, etc., han incluido en sus productos ciertos nutrientes y componentes bioactivos extraídos de fuentes animales y vegetales, capaces de ofrecer beneficios en la salud de los consumidores. Por lo tanto, el interés de la industria de los alimentos en encontrar

¹²ROBINSON, D.; Bioquímica y valor nutritivo de los alimentos; Zaragoza; Ed. ACRIBIA S.A.; 1991; p. 144.

¹³CHEL-GUERRERO, L. Biopeptidos alimenticios: nuevos promotores de la salud. Revista salud publica y nutrición, 9,2008

materias primas naturales que presenten altos contenidos en proteínas de las cuales se pueden producir ciertos péptidos bioactivos con efectos benéficos en el organismo. Los péptidos bioactivos son secuencias de tamaño pequeño de aminoácidos, generalmente entre 2 y 15 residuos, los cuales se encuentran inactivos dentro de la proteína intacta pero que pueden ser liberados durante la digestión del alimento o por un proceso previo del mismo, como por ejemplo mediante hidrólisis enzimática. Las funciones de los péptidos bioactivos como antihipertensivos, antioxidantes, antimicrobianos, anticariogénicos, antiulcerativos y antitrombóticos, por mencionar algunas, permiten su utilización como ingredientes en la elaboración de alimentos funcionales y con ello obtener un efecto beneficioso para alguna función corporal del individuo produciendo una mejora en su salud o reduciendo el riesgo de padecer alguna enfermedad.

- C. **TISSIER H., (1906)¹⁴**. Observó que los niños con diarrea tenían en sus heces un escaso número de bacterias caracterizadas por una morfología peculiar en forma de Y. Estas bacterias "bífidas" eran, por el contrario, abundantes en los niños sanos. Sugirió la posibilidad de administrar estas bacterias a pacientes con diarrea para facilitar el restablecimiento de una flora intestinal sana.

¹⁴ TISSIER H: Traitement des infections intestinales par la méthode de la flore bactérienne de l'intestin. CR.Soc Biol, 60: 359-361. 1906.

III.2. BACTERIAS LÁCTICAS

III.2.1. DEFINICIÓN:

El grupo de las bacterias lácticas o bacterias del ácido láctico ha sido definido por (Orla-Jensen, 1919)¹⁵ y reúne varios géneros caracterizado por su capacidad de fermentar los glúcidos produciendo ácido láctico.

III.2.2. LOS DIFERENTES GÉNEROS DE BACTERIAS LÁCTICAS

Al tratarse de un grupo heterogéneo, las bacterias lácticas están representadas por varios géneros de importancia por lo demás diferente. Sus células son bien cocos: es el caso de *Streptococcus*, pero también de *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, bien bacilos: *Lactobacillus*. Se distinguen además por su tipo de fermentación: homoláctica o heteroláctica. A estos géneros ha sido recientemente añadido el género *Bifidobacterium* (Kandler y Weiss, 1986a)¹⁶

III.2.3. EL GÉNERO LACTOBACILLUS

Las especies de *Lactobacillus* se caracterizan por células en forma de bastoncillos a menudo agrupadas en cadenas, una gran exigencia de factores de crecimiento.

¹⁵ ORLA-JENSEN S. The lactic acid bacteria. Copenhagen, I Komision Hos Ejnar Munksgaard. 1919.

¹⁶ KANDLER O. Y WEISS N., Regular non-sporing Gram-positive rods. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 2, 1208-1209, 1986a.

A. GRUPO I.

Los *Lactobacillus* homofermentativo obligatorios, que incluye las especies del grupo *Thermobacterium* y otras especies nuevas descritas. Son incapaces de fermentar las pentosas y el gluconato (Kandler y Weiss, 1986b)¹⁷. Sus células son largas, rectas, a menudo en empalizadas (Botazzi, 1988)¹⁸.

B. GRUPO II.

Los *Lactobacillus* homofermentativos facultativos, formado por el grupo *Streptobacterium* y especies nuevas. La fermentación de las hexosas es homofermentativa (pero puede ser heterofermentativa en algunos casos), la de las pentosas y el gluconato es heterofermentativa con producción de ácido láctico y ácido acético (Kandler y Weiss, 1986b). Sus células son cortas, a menudo ordenadas en filamentos (Botazzi, 1988).

C. GRUPO III.

Los *Lactobacillus* heterofermentativos obligatorios, que incluye los *Betabacterium*. La fermentación de la hexosas produce ácido láctico, ácido acético (o etanol) y CO₂ en la relación de 1:1:1 la de

¹⁷ KANDLER o., WEISS N., Genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, 212^{AL}. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 2, 1209-1234, 1986b.

¹⁸ BOTAZZI V., An introduction to rodshaped lactic-acid bacteria. *Biochimie*, 70: 303-315. 1988

las pentosas, ácido láctico y ácido acético (Kandler y Weiss, 1986b). Las células son cortas, rectas y separadas (Botazzi, 1988).

III.2.4. LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS

A. TAXONOMÍA

CUADRO 1 CLASIFICACIÓN CIENTÍFICA DEL *LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS*

CLASIFICACIÓN CIENTÍFICA	
Reino:	Bacteria
División:	Firmicutes
Clase:	Bacilli
Orden:	Lactobacillales
Familia:	Lactobacillaceae
Género:	<i>Lactobacillus</i>
Especie:	<i>L. acidophilus</i>
Nombre binomial	
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	

Fuente: http://es.wikipedia.org/wiki/Lactobacillus_acidophilus¹⁹

¹⁹ Disponible en: http://es.wikipedia.org/wiki/Lactobacillus_acidophilus; consultado el 01 de febrero de 2010

FIGURA N°1.



Fuente: Baeza M. 2008²⁰
L. Acidophilus(a). Observados en el microscopio (100x) tomado de:
Baeza M. 2008.

B. MORFOLOGÍA

El *Lactobacillus Acidophilus* es una bacteria no móvil, un bacilo Gram (+) con extremos redondeados, generalmente con dimensiones de 0.6 μm de ancho por 1.5 a 6 μm de largo. Se presenta como células individuales, en pares, y en cadenas cortas.

Es homofermentativo y produce los isómeros L (Levógiro) y D (Dextrógiro) del ácido láctico, por fermentación de la lactosa. Presenta un crecimiento óptimo en leche entre 35 y 38°C, pero se

²⁰BAEZA VALLEJO M.A. Determinación del efecto prebiótico de la harina de semilla de linaza (*Linum usitatissimum* L.), evaluado a través de dos microorganismos probióticos, *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus Acidophilus* en aerobiosis. Tesis. Chile. Universidad Austral de Chile. 2008

multiplica bien aun a 48°C; por debajo de 15°C, cesa su crecimiento (Group E104 – IDF. 1995)²¹.

Crecen bien en medios ligeramente ácidos (pH 6.4-4.5). Su crecimiento cesa cuando el pH alcanza valores desde 4 hasta 3.6. Son capaces de disminuir el pH del sustrato por debajo del valor 4 mediante la formación de ácido láctico. (Bergey, 1992)²².

C. HABITAT

Es un habitante normal del tracto intestinal, de la boca y la vagina de los humanos. (Heller, 2001)²³.

En el tubo digestivo del hombre y de los animales (Botazzi, 1988).

D. PRODUCCIÓN DE COMPUESTO ANTAGÓNICOS.

Lactacin B, producida por *L. Acidophilus*, que es termoestable (100°C, 30 minutos) y activa contra *Lactobacillus* estrechamente relacionados, incluyendo a *L. delbrueckii* subsp. *lactis* (Barefoot,

²¹ Group E104 –IDF. Detection and enumeration of *Lactobacillus Acidophilus* (culture media). Bulletin of the IDF N° 306. 1995

²²BERGEY'S.Manual of determinate Bacteriology.U.S.A. Tenth Edition. The Williams Wilkings Co. Baltimore, 1992

²³ Heller K. Probiotic bacteria in fermented foods: product characteristics and starters organisms. Am J. Clin.Nutr. Vol.73: 374-379. 2001

Ying-Ru Chen, Hughes; Bodine, Dhearer y Hughes; 1994)²⁴, la cual se detecta solamente en cultivos mantenidos a pH entre 5 y 6 y se produce óptimamente a pH 6 (Barefoot y Klaenhammer, 1984)²⁵.

La buena producción de ácido láctico, peróxido de hidrogeno y bacteriocinas, estas últimas son producidas por ribosomas como proteínas o poli péptidos precursores que, en su forma activa, ejercen un efecto antibacterial contra un espectro limitado de bacterias estrechamente relacionados (Jack, Tagg y Ray; 1995)²⁶

III.2.5. FISIOLÓGÍA DE CRECIMIENTO.

A. NUTRICIÓN NITROGENADA

Sólo pueden crecer fácilmente en medios ricos en vitaminas, bases nitrogenadas y fuentes de carbono y nitrógeno; ciertas vitaminas no son exigidas pero tienen un efecto estimulante sobre el crecimiento (Desmazeaud, 1983)²⁷.

²⁴BAREFOOT, S. F.; YING-RU CHEN; HUGHES, T. A; BODINE, A. B; SHEARER, M. Y AND HUGHES, M. D..Identification and purification of a protein that induces production of the Lactobacillus acidophilus bacteriocin lactacin B. *Aplied and Environmental Microbiology*. Vol 60. No 10: 3522-3528. 1994

²⁵BAREFOOT, S. F. and KLAENHAMMER, T.R.Detection and activity of lactain B, a bacteriocin produced by Lactobacillus acidophilus. *Appl. Environm. Microbiol*.vol 45: 1808-1815. 1984

²⁶JACK, R. W; TAGG, J. R. AND RAY, B. Bacteriocins of gram positive bacteria.*Microbiol*. Vol. 59: 171-200. 1995

²⁷DESMAZEAUD M. L'état des connaissances en métier de nutrition des bactéries lactiques. *Vol. 63: 267-316*. 1983

- UTILIZACIÓN DE AMINOACIDOS LIBRES

El crecimiento de las bacterias puede estar limitado por su concentración demasiado baja de aminoácidos libres.

- UTILIZACIÓN DE PEPTIDOS

La utilización de los péptidos libres de la leche por las células de las bacterias lácteas es una necesidad, ya que la concentración de los aminoácidos libres en la leche no puede asegurar el crecimiento de estas bacterias (Law, 1978)²⁸.

La permeación de los di o tripeptidos exige energía aportada por un azúcar, la energía necesaria podría ser proporcionada en forma de ATP (Van boven y Konings, 1986)²⁹.

Dado el pequeño tamaño de los péptidos capaces de penetrar en estas células y de servir de fuente de aminoácidos, las bacterias lácticas deben disponer de peptidasas superficiales capaces de acortar los péptidos de tamaño superior (Exterkate, 1981³⁰; Thomas y Mills, 1981³¹)

²⁸ LAW B.A., Peptide utilization by group N streptococci. *J. Gen. Microbiol.*, Vol. 105: 113-118. 1978

²⁹ VAN BOVEN A., KONINGS W.N..The uptake of peptides by microorganisms.*Neth. Milk Dairy J.*, Vol. 40:117-127. 1986

³⁰ EXTERKATE F.A.,Membrane-bound peptidases in *Streptococcus cremoris*.*Neth. Milk Dairy J.*, Vol. 35: 328-332. 1981

³¹ THOMAS T.D., MILLS O.E.,Proteolytic enzymes of starter bacteria.*Neth. Milk DairyJ.*, Vol. 35:255-273. 1981

- UTILIZACIÓN DE PROTEÍNAS Y POLIPEPTIDOS

Debido a su carga y a su tamaño, las proteínas y los oligopéptidos de la leche no pueden atravesar la membrana citoplasmática de las bacterias: su hidrólisis necesita la presencia de proteasas y de peptidasas bacterianas extracelulares o ligadas a la envoltura bacteriana.

La actividad proteolítica global de las bacterias lácticas es considerada débil comparada con al de otros géneros bacterianos como *Bacillus* o *Pseudomonas*. Pero su equipo enzimático es complejo por la diversidad y la naturaleza de las enzimas detectadas y por su localización intra- o extracelular (Law y Kolstad, 1983)³².

El sistema proteolítico de las bacterias lácticas esta constituido por dos tipos de enzimas distintas: las proteasas capaces de hidrolizar proteínas nativas, por ejemplo la caseínas o sus derivados, y las peptidasas caracterizadas por la hidrólisis de péptidos provenientes de la degradación de las proteínas (Law y Kolstad, 1983).

³²LAW B.A. KOLSTAD j. Proteolytic systems in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek J. Microbiol. Serol.* Vol. 49: 225-245. 1983

B. METABOLISMO DE LOS AZUCARES

Los azúcares utilizados por las bacterias lácticas propiamente dichas son fermentadas esencialmente hasta ácido láctico. Cuando la fermentación es homoláctica, la producción de lactato pasa por la vía de Embden-Meyerhof-Parnas (EMP).

- FERMENTACIÓN HOMOLÁCTICA

Las bacterias homofermentativas producen, prácticamente, lactato como único producto de la fermentación de la glucosa. Siguen la glucolítica VIA DE EMBDEN-MEYERMOF-PARNAS (EMP).

Por medio de la molécula de glucosa de seis carbonos, antes de ser escindida por el enzima aldolasa, es fosforilada e isomerizada a gliceraldehido-3-fosfato. A continuación, este es convertido en piruvato, durante cuya conversión se produce ATP por fosforilación a nivel del sustrato en dos sitios para dar un producto total de dos moléculas de ATP (adenosíntrifosfato) por cada molécula de glucosa fermentada. Con el fin de regenerar el NAD⁺ (Glicerol-3-fosfato deshidrogenasa) consumido en la oxidación del gliceraldehido-3-fosfato, el piruvato es reducido a lactato utilizando NADH(Nicotinamida adenina dinucleótido reducido).

C. METABOLISMO AEROBIO

La relación de las bacterias lácticas con el oxígeno es compleja; por su incapacidad de sintetizar las porfirinas hémicas, estas bacterias poseen un metabolismo fermentativo y son así pues consideradas como anaerobias. Sin embargo su sensibilidad al oxígeno puede ser muy variable según las cepas: desde anaerobia estricta a aerotolerante hasta insensible (Condon, 1987)³³.

D. METABOLISMO Y LOS MINERALES

LEDESMA Y COL. (1977)³⁴ subrayan la necesidad de Mn^{2+} y/o de Fe^{2+} para un buen medio de crecimiento. La necesidad de los iones en el metabolismo se explica en primer lugar por su función de cofactor para numerosas enzimas.

III.3. PROBIÓTICOS Y EFECTOS NUTRACÉUTICOS

III.3.1. DEFINICIÓN PROBIÓTICOS

El término probiótico es una palabra relativamente nueva que significa "a favor de la vida" y actualmente se utiliza para designar las bacterias

³³ CONDON S., Responses of lactic acid bacteria to oxygen. FEMS Microbiol. Vol., 46: 269-280. 1987

³⁴ LEDESMA O. V., DE RUIZ HOLGADO A. A synthetic médium for comparative studies of lactobacilli. *J. Appl. Bacteriol.* Vol.42: 123-133. 1977

que tienen efectos beneficiosos para los seres humanos y los animales. La observación original de la función positiva desempeñada por algunas bacterias se atribuye a Eli Metchnikoff, ruso galardonado con el premio Nobel por sus trabajos en el Instituto Pasteur a comienzos del siglo pasado, que afirmó que "la dependencia de los microbios intestinales con respecto a los alimentos hace posible adoptar medidas para modificar la flora de nuestro organismo y sustituir los microbios nocivos por microbios útiles" (Metchnikoff, 1907)³⁵.

Se considera alimento probiótico aquel que contiene bacterias vivas que permanecen activas en el intestino, que no causa enfermedades y ejercen importantes efectos fisiológicos ya que al ser ingeridos en cantidades suficientes, tienen efecto muy beneficioso, contribuyendo al equilibrio de la flora intestinal y a potenciar el sistema inmunológico (Schrezenmeir *et al.*, 2001³⁶ y Collins *et al.*, 1999³⁷).

III.3.2. EFECTOS NUTRICIONALES EN ALIMENTACIÓN HUMANA

Los probióticos tendrían efectos nutricionales en el organismo (Goldin, 1989)³⁸. Si bien las bacterias del yogurt parecen aumentar la

³⁵ METCHNIKOFF E. Lactic acid as inhibiting intestinal putrefaction. In: *The prolongation of life: Optimistic studies*. W. Heinemann, J. London. Vol 1.: 161-183. 1907

³⁶ SCHREZENMEIR, J. y De VRESE, M. Probiotics, prebiotics, and synbiotics – approaching a definition. *Journal Clinical of Nutrition*. Vol. 73 (2): 361-364. 2001

³⁷ COLLINS, D. y GIBSON, G. Probiotics, prebiotics, and synbiotics: approaches for modulating the microbial ecology of the gut. *American Journal Clinical Nutrition*. Vol. 69 (5): 1052 – 1057. 1999

³⁸ GOLDIN B.R.. Lactic acid bacteria: implication for health. In: *Syndifrais, Les laits fermentés*. Actualité de la recherche, pp. 95-104, John Libbey Eurotext, Paris. 1989

concentración de las vitaminas del grupo B, empobrecen globalmente la leche en vitaminas (Terré, 1986)³⁹. El crecimiento de *L. Acidophilus* en la leche aumenta la concentración de numerosas vitaminas (Welch, 1987)⁴⁰.

Estas bacterias, por acidificación del medio, a través de la producción de ácido láctico y por su actividad lipolítica y proteolítica estimularían la digestión de los alimentos (Rasic y Kurmann, 1978)⁴¹. La hidrólisis de las proteínas enriquece el medio de aminoácidos libres (Terré, 1986).

La ingestión de leche que contiene *Lb. acidophilus* en personas intolerantes a la lactosa mejoraría la digestión en estos individuos (Alm, 1982)⁴².

³⁹ TERRÉ S.,. Propriétés technologiques nutritionnelles et physiologiques de *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus*. *Technique Laitière et Marketing*, Vol.8: 26-39. 1986

⁴⁰ WELCH C..Nutritional and therapeutic aspects of *Lactobacillus acidophilus* in dairy products. *Cult Dairy Prod. J.* Vol.22: 23-24, 26. 1987

⁴¹ RASIC J.L., KURMANN J.A., *Yoghurt*, Scientific grounds, technology, manufacture and preparations. Technical Dairy Publ. House, Denmark.Vol.1. 1978.

⁴² ALM L..Effect of fermentation on lactose, glucose, and galactose content in milk products for lactose intolerant individuals.*J. Dairy Sci.*, Vol. 65: 346-352. 1982

III.3.3. LOS EFECTOS TERAPÉUTICOS EN LA ESPECIE HUMANA

A. SOBRE EL TRANSITO INTESTINAL

El consumo de Leche con *Lb. acidophilus* vivo facilitaría el tránsito intestinal y combatiría el estreñimiento; estimularía la mucosa intestinal que a su vez excitaría la capa muscular subyacente (Nahasi, 1986)⁴³. Los trastornos causados por los antibióticos en la flora intestinal podrían combatirse mediante la ingestión regular de leche o de yogurt con *Lb. acidophilus* ayudando a restaurar el equilibrio de la flora intestinal (Nahasi, 1986). La ingestión de *Lb. acidophilus* permitiría la colonización del intestino por parte de estas cepas y la modificación de la flora intestinal, en particular por la disminución de los *Clostridium* (Sarra y Dellaglio, 1984)⁴⁴.

B. SOBRE EL EQUILIBRIO DE LA FLORA INTESTINAL

El efecto mas documentado trata de la inhibición de un cierto número de bacterias entre ellas patógenas mediante la producción de antibióticos (*Lb. Acidophilus*, *Lb. delbrueckii subsp. bulgaricus*, *Lb. brevis*, *Lb. plantarum*) activos in vitro frente a bacterias Gram-positivas (*Bacillus*, *Staphylococcus*,

⁴³ NAHAISI M.H..*Lactobacillus Acidophilus*: therapeutic properties, products and enumeration. In: *Developments in Food Microbiology-2*, R. K. ROBINSON, ed., Ch. 6, pp. 153-178, Elsevier Appl. Sci., London. 1986

⁴⁴ SARRA P.G., DELLAGLIO F. Colonization of a human intestine by four different genotypes of *Lactobacillus acidophilus*. *Microbiological*, Vol.7:331-339. 1984

Streptococcus, Sarcina) o Gram negativas (*Pseudomonas, Escherichia, Shigella, Salmonella, Serratia, Proteus, Vibrio*) (Reddy y Shahani, 1971⁴⁵; Nahaisi, 1986).

Lb. acidophilus, pero no *Lb. casei*, sería capaz de desconjugar sales biliares: el ácido biliar resultante actuaría entonces de una manera mas eficaz sobre el crecimiento de las bacterias patógenas (Gilliland y Speck, 1977⁴⁶; Nahaisi, 1986; Hannotiaux, 1984⁴⁷).

C. SOBRE LA DEFENSA INMUNITARIA

In vivo, la administración oral de diversas bacterias lácticas a ratones activa la respuesta inmunitaria (Perdigón y col., 1986⁴⁸, 1987⁴⁹). Pueden servir de producto preventivo contra las

⁴⁵ REDDY M.S., SHAHANI K.M., 1971. Isolation of an antibiotic from *Lactobacillus bulgaricus*. *J. Dairy Sci.*, Vol. 54:748. 1971

⁴⁶ GILLIAND S.E., SPECK M.L., 1977. Deconjugation of bile acids by intestinal Lactobacilli. *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 54: 989-902. 1977

⁴⁷ HANNOTIAUX L.. Le lait maternel: ses avantages; en particulier son role antidiarréique dans l'alimentation du nourisson. Thèse de l'Université de Lille.1984

⁴⁸ PERDIGÓN G., NADER DE MACÍAS M.E., ÁLVAREZ S., OLIVER G., PESCE DE RUÍZ HOLGADO A.,Effect of perorally administered lactobacilli and macrophage activation in mice.*Infection Immunity*, Vol. 53: 404-410. 1986

⁴⁹ PERDIGÓN G., NADER DE MACÍAS M.E., ÁLVAREZ S., OLIVER G., PESCE DE RUÍZ HOLGADO A.,Enhancement of immune response in mice fed with *Streptococcus Thermophilus* and *Lactobacillus acidophilus*. *J. Dairy Sci.*, Vol. 70: 919-926. 1987

diarreas por *Salmonella* y *E. coli* (Perdigon y col., 1989)⁵⁰, además los probióticos estimularían la producción de inmunoglobulinas (Ig). La adición de yogurt a cultivos de linfocitos provoca la síntesis de interferón gamma (De Simone y col., 1986)⁵¹.

D. SOBRE LA FORMACIÓN DEL COLESTEROL

La ingestión de *Lb. acidophilus* disminuye la tasa de colesterol en el suero sanguíneo de ratas (Rao y col., 1981⁵²; Grunewald, 1982⁵³); ciertas cepas podrían asimilar el colesterol durante su crecimiento en anaerobiosis y en presencia de sales biliares (Gilliland y col., 1987)⁵⁴. La acción podría también ser indirecta: el aumento del contenido en ácidos biliares libres aceleraría el metabolismo del colesterol (Welch, 1987).

⁵⁰ PERDIGÓN G., NADER DE MACÍAS M.E., MEDICI M. Effect of lactic acid bacteria orally administered and of yogurt on the immune system. In: *Syndifrais, Les laits fermentés. Actualité de la recherche*, pp. 77-84, John Libbey Eurotext, Paris. 1989

⁵¹ DE SIMONE C., BIANCHI SALVATORI B., NEGRI R., FERRAZZI M., BALDINELLI L., VESELY R. The adjuvant effect of yogurt on production of gamma-interferon by Con-A stimulated human peripheral blood lymphocytes. *Nutr. Reports Int.*, Vol. 3: 419-431. 1986

⁵² RAO D.M., CHAWAN C.B., PULUSANI S.R., Influence of milk and Thermophilus milk on plasma cholesterol levels and hepatic cholesterogenesis. *J. Food Sci.* Vol. 46: 1339-1341. 1981

⁵³ GRUNEWALD K.K., Serum cholesterol levels in rats fed with skim milk fermented by *Lactobacillus Acidophilus*. *J. Food Sci.*, Vol. 47:2078-2079. 1982

⁵⁴ GILLILAND S.E., NELSON C.R., MAXWELL C. Assimilation of cholesterol by *Lactobacillus acidophilus* used as a dietary adjunct. *J. Dairy Sci.*, Vol. 67: 3045-3051. 1987

E. SOBRE LA CANCEROGÉNESIS

Ratas alimentadas con leche con *Lb. acidophilus* tienen menos enzimas fecales (β -glucosidasa, β -glucuronidasa) capaces de convertir sustancias pro cancerígenas en cancerígenas (NAHAISI, 1986; GORBACH, 1989⁵⁵). Hombres alimentados con estas mismas leches presentan menos enzimas fecales (β -glucuronidasa, nitrato reductasa, azoreductasa) durante el período de ingestión (Goldin y Gorbach, 1984)⁵⁶. Así *Lb. acidophilus* podría ser responsable de una resistencia a la aparición del cáncer de colon (Goldin y Gorbach, 1980)⁵⁷.

III.3.4. LOS PROBIÓTICOS EN ALIMENTACIÓN ANIMAL

Se utilizan con dos objetivos: mejorar el crecimiento evitando el empleo de los antibióticos y aumentar la higiene alimentaria; los animales involucrados son sobre todo el ternero de carnicería, el cochinito y las aves de corral (Wolter y Henry, 1988)⁵⁸.

⁵⁵ GORBACH S.L.,. Metabolism of carcinogens and drugs by the intestinal flora: effects of *Lactobacillus*. In: *Syndifrais, Les laits fermentés*. Actualité de la recherche, pp. 85-94, John Libbey Eurotext, Paris. 1989

⁵⁶ GOLDIN B.R., GORBACH S.L.,. The effect of milk and *Lactobacillus* feeding on human intestinal bacterial enzyme activity. *Am. J. Clin. Nutr.*, Vol. 39: 756-761. 1984

⁵⁷ GOLDIN B.R., GORBACH S.L. Effect of milk and *Lactobacillus acidophilus* dietary supplementation on 1,2-dimethylhydrazine dihydrochloride- induced intestinal cancer in rat. *J. Natl. Cancer Inst.*, Vol.64: 263-265. 1980

⁵⁸ WOLTER R., HENRY N. Bactéries lactiques en alimentation animale. G.T.V. 88-6-TE-073, Vol. 19-29. 1988

En el ternero, la adición de *Lb. acidophilus* es recomendada contra las enteritis del ternero recién nacido permite un mejor crecimiento del animal de corral (Wolter y col., 1987)⁵⁹.

Lactobacillus acidophilus sería capaz de proteger a los pollitos de infecciones por *E. coli*, *Salmonella typhimurium* y *Staphylococcus aureus* (Watkins y col., 1982⁶⁰; Watkins y Miller, 1983⁶¹).

III.4. CEBADA, QUINUA Y SOYA.

III.4.1. HORDEUM VULGARE (CEBADA)

Botánicamente, la cebada pertenece a la familia de las gramíneas, plantas herbáceas con flores, que en los antiguos sistemas naturales de clasificación se situaron en la sub-clase *Glumaceae* ó *Glumiflorae*. Las cebadas se incluyen en el género *Hordeum*, del que existen varias especies, siendo *H. vulgare* y *H. distichon* las especies más importantes (Horney, 2003)⁶².

Características generales:

⁵⁹WOLTERR., HENRY N., JACQUOTL., BRIEND G., BLANCHET M., DELESPAUL G., DHOMS P.,. Probiotiques en alimentation animale. Étude experimentale de leur efficacité chez le rat et chez le veau de boucherie. Rec. Méd. Vét., Vol. 163:1131-1138. 1987

⁶⁰WATKINS B.D., MILLER B.F. NEIL D.H.,.In vivo inhibitory effects of *Lactobacillus acidophilus* against pathogens *Escherichia coli* in gnotobiotic chicks. *Poult. Sci.*, Vol. 61: 1298-1308. 1982

⁶¹ WATKINS B.D., MILLER B.F. Competitive gut exclusión of avian pathogens by *Lactobacillus Acidophilus* in gnotobiotic chicks. *Poult. Sci. Vo.*, 62: 1772-1779. 1983

⁶² HORNEY, I.S. Elaboración de cerveza: microbiología, bioquímica y tecnología. Editorial Acribia S. A. Zaragoza, España. 2003

El uso predominante de la cebada para la elaboración de malta se basa en una serie de factores tales como ser tradicionalmente el cereal de elección; crece en una variedad de ambientes, con una germinación rápida y uniforme; el 60% del peso seco total del grano es almidón; contiene proteínas, generalmente en cantidades necesarias para proporcionar los aminoácidos necesarios para el crecimiento de la levadura; y posee una dotación enzimática satisfactoria (Hough, 1990)⁶³.

En el proceso de elaboración de bebidas, se emplea como materia prima esencial cebada que se caracteriza por tener carbohidratos fermentables, proteínas, minerales, sin embargo estas características también favorecen el desarrollo de microorganismos capaces de producir diferentes metabolitos y enzimas que pueden modificar las propiedades de productos finales de la cebada (Beltran, y Maldonado, 2002)⁶⁴.

⁶³ HOUGH, J.S. Biotecnología de la cerveza y de la malta. Editorial acribia, S.A. Zaragoza, España. 1990

⁶⁴ BELTRAN, P. Z., Y MALDONADO, P K. Caracterización microbiológica de cebada malteada y arroz y determinación de actividad enzimática amilolítica microbiana en el proceso de elaboración de mosto cervecero. Requisito parcial para optar el título de Microbiólogo Industrial. Pontificia Universidad Javeria. Facultad de ciencias. Departamento de microbiología. Bogota, Colombia. 2002

CUADRO 2 COMPONENTES ALIMENTICIOS DE *HORDEUM VULGARE* (CEBADA)

COMPONENTES	MASA EN GRAMOS
Proteínas	8.4
Materia grasa	2
Hidratos de carbono	77.5
fibra cruda	7.3
Ceniza	2.4
agua	9.7

Composición por 100g de alimento

Fuente: MINSA. Tabla peruana de composición de alimentos. Perú. 2008⁶⁵

III.4.2. *CHENOPODIUM QUINUA WILDNOW* (QUINUA)

El nombre botánico de la quinua es *Chenopodium quinua wildnow*, cuya familia es *Chenopodiaceae* (Nacional reseach council, 1989)⁶⁶

Características generales:

La semilla de quinua tiene un alto valor nutritivo, tanto por su composición química, como por la cantidad y calidad de sus proteínas, que fluctúa entre un 12 y 22%. Es así como, la calidad de las proteínas de quinua es considerada tan buena o mejor que la caseína, esto, debido al buen balance de los aminoácidos esenciales, sobresaliendo el triptófano, la cisteína y la metionina. Sin embargo, la mayor importancia radica en su alto contenido de lisina,

⁶⁵ MINSA. Tabla peruana de composición de alimentos. Perú. 2008.

⁶⁶ NATIONAL RESEARCH COUNCIL. LOST CROPS OF THE INCAS: Little-know plants of the Andes with promise for worldwide cultivation. National academy press, Washington D.C., Estados Unidos, 1989.

un aminoácido deficitario en la mayoría de los vegetales, especialmente en el trigo (Albarran, 1993)⁶⁷.

Por otro lado, la semilla de quinua presenta un alto contenido de vitaminas del complejo B, C y E. Pero también, es importante su composición de sales minerales tales como: hierro, fósforo, potasio y calcio. Este último se encuentra en la misma concentración que en la leche descremada, mientras que el fósforo es cuatro veces más concentrado que el de ésta (Albarran, 1993).

CUADRO 3 COMPONENTES ALIMENTICIOS DE *CHENOPODIUM QUINUA WILDNOW* (QUINUA)

COMPONENTES	MASA EN GRAMOS
Proteínas	13.6
Materia grasa	5.8
Hidratos de carbono	66.6
fibra cruda	1.9
ceniza	2.5
agua	11.5

Composición en 100g de alimento

Fuente: MINSA. Tabla peruana de composición de alimentos. Perú. 2008

III.4.3. GLYCINE MAX (SOYA)

El género *Glycine* Wild. Se divide en dos subgéneros: *Glycine* y *Soya*. El subgénero *SoyaMoench* incluye la soya cultivada, *G. max*.

La soya es una excelente fuente de proteína de alta calidad que tiene muchos usos como alimento de consumo humano (Liu, 1997,

⁶⁷ ALBARRAN C. R. Estudio de algunos componentes químicos, caracteres morfoanatomicos y patrones proteicos en semillas de dos ecotipos de quinua (*Chenopodium quinua willd*). Concepción, Chile. Universidad de Concepción, 1993.

citado por CHUMCHUERE *et al.*, 2000)⁶⁸. En Asia, por ejemplo, la soya ha sido consumida por siglos, aunque se utiliza para hacer harina y fracciones similares (Lusas y Riaz, 1995)⁶⁹.

Además contiene más proteínas que la carne y el pescado y tres veces más que el huevo. Sus semillas tienen alto contenido en fibra, un bajo índice calórico, no contienen colesterol y prácticamente tampoco grasas saturadas. La grasa presente es rica en lecitina, un fosfolípido vital para las membranas celulares, el cerebro y el sistema nervioso (IESN, 2001)⁷⁰.

CUADRO 4 COMPONENTES ALIMENTICIOS DE GLYCINE MAX(SOYA)

COMPONENTES	MASA EN GRAMOS
Proteínas	28.2
Materia grasa	18.9
Hidratos de carbono	35.7
fibra cruda	4.6
ceniza	5.5
agua	11.7

Composición en 100g de alimento

Fuente: MINSA. Tabla peruana de composición de alimentos. Perú. 2008

⁶⁸CHUMCHUERE, S., MACDOUGALL, D.B. y ROBINSON, R.K. Production and properties of a semi-hard cheese made from soya milk. *International Journal of Food Science and Technology*. Vol. 6: 577-581. 2000

⁶⁹LUSAS, K. y RIAZ, M. Soy protein product: processing and U.S.A. *Journal of Nutrition*. Vol.2 : 151-156. 1995

⁷⁰ INSTITUTO DE ESTUDIOS SALUD NATURAL DE CHILE. Soya.

Disponible en: <http://www.geocities.com/iesnchile>. Consultado el 25 de octubre de 2010.

III.4.4. HIDROLIZADOS

La hidrólisis consiste en descomponer las proteínas en sus aminoácidos constituidos, los que pueden, como ya se mencionó, ser incorporados al organismo por medio del torrente sanguíneo y desde allí ser distribuidas al lugar en que sean útiles. El agua es uno de los compuestos reaccionantes. Las descomposiciones directas por agua son raras y requieren altas temperaturas y presiones, por lo que normalmente la hidrólisis se efectúa en presencia de ácidos minerales fuertes o bases fuertes como catalizadores, o bajo la acción catalítica de determinadas enzimas, es decir, que no intervienen estequiométricamente en la reacción, y solo la aceleran. (Knights R.J. 1985)⁷¹.

Las proteínas pueden ser hidrolizadas, produciendo pequeñas cadenas de aminoácidos denominadas péptidos. Diversos estudios han mostrado que los hidrolizados de proteínas que contienen mayormente di y tripéptidos son absorbidos más rápidamente que los aminoácidos libres y mucho más rápido que las proteínas intactas. Además, recientemente se ha presentado evidencia de que la ingesta de hidrolizados de proteínas tiene un fuerte efecto insulínico. Por lo tanto, las bebidas utilizadas en la recuperación

⁷¹ KNIGHTS R.J. .Processing and evaluation of the antigenicity of protein hydrolysates. Nutrition for station needs in infance protein hydrolysates. Ed. Fina Lisshlpz, Cap. 8, pp.105-115. 1985

deportiva que contienen hidrolizados de proteínas pueden ser de gran valor ergogénico (Anssi H.M. 2004)⁷².

III.5. CINÉTICA DE CRECIMIENTO BACTERIANO

III.5.1. TIEMPO DE LATENCIA

Un fenómeno inherente a la cinética microbiana es la latencia, la cual es típicamente observada como la respuesta retardada de la población microbiana ante un (repentino) cambio en el ambiente. La fase de latencia puede producirse en ambos procesos, de crecimiento y de inactivación (Swinem y col., 2004)⁷³.

En el caso de las condiciones de crecimiento, la fase de latencia es el período de ajuste durante el cual las células bacterianas se modifican por sí mismas con el objetivo de sacar ventaja del nuevo ambiente e iniciar el crecimiento exponencial (Buchanan y Klawiter, 1991)⁷⁴. Por tanto, durante la fase de latencia las células se adaptan a su nuevo entorno induciendo o reprimiendo la síntesis y actividad de determinadas enzimas, iniciando la

⁷² ANSSI H. MANNINEN. Protein Hydrolysates In Sports And Exercise: A Brief Review. Journal of Sports Science and Medicine vol. 3: 60-63.2004

⁷³ SWINNEN, I.A.M., BERNAERTS, K., DENS, E. J. J., GEERAERD, A. H., AND VAN IMPE, J. F. Predictive modeling on the microbial lag phase: a review. International Journal of Food Microbiology vol. 94:137-159. 2004

⁷⁴BUCHANAN, R. L. AND KLAWITTER, L.A. Effect of temperature history on the growth of *Listeria monocytogenes* Scott A at refrigeration temperatures. International Journal of Food Microbiology vol. 12:235-246. 1991

replicación de su material genético, y en el caso de las esporas, diferenciándose en células vegetativas (Montville, 2000)⁷⁵.

La fase de latencia del crecimiento microbiano fue definida en 1914 por Penfold como el intervalo entre la inoculación del cultivo bacteriano y el tiempo del comienzo de su velocidad máxima de crecimiento. Y suele ser convencionalmente medido como el punto en el cual la pendiente de la fase exponencial de crecimiento intercepta la línea horizontal trazada desde la concentración celular inicial (Robinson y col., 1998)⁷⁶.

III.5.2. TIEMPO DE GENERACIÓN

El tiempo de generación es el tiempo necesario para duplicar la población bacteriana. Se define como el tiempo requerido para que todos los componentes del cultivo aumenten en un factor de 2 (Stainer y col. 1989)⁷⁷. Durante este periodo de generación el número de células y la masa celular se duplica. El tiempo de generación varía entre los distintos microorganismos. Muchas bacterias tienen tiempos de generación de 1-3 horas, conociéndose pocos microorganismos que crezcan muy rápidamente dividiéndose en menos de 10 minutos. Otras tienen tiempos de generación de varias horas o incluso días. El tiempo de generación es

⁷⁵ MONTVILLE, T J. Principios que influyen en el crecimiento, la supervivencia y la muerte microbiana en los alimentos. In: Doyle, M. P.; Beuchat, L.R; and Montville, T. J. Microbiología de los Alimentos. Fundamentos and Fronteras. Editorial Acribia, S.A. España. 13-30. 2000

⁷⁶ ROBINSON, T. P., OCIO, M. J., KALOTI, A., MACKAY, B. M. The effect of growth environment on the lag phase of *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology* vol. 44:83-92. 1998

⁷⁷ STANIER, R. Y., INGRAHAM, J. L., WHEELIS, M. L. AND PAINTER, P. R. *Microbiología* 2 Ed, Ed. Reverte. pp. 195-209. 1989

útil como indicador del estado fisiológico de una población celular, y es usado con frecuencia para comprobar el efecto negativo o positivo de un determinado tratamiento sobre un cultivo bacteriano (Madigan y col., 1997)⁷⁸.

III.5.3. VELOCIDAD DE CRECIMIENTO

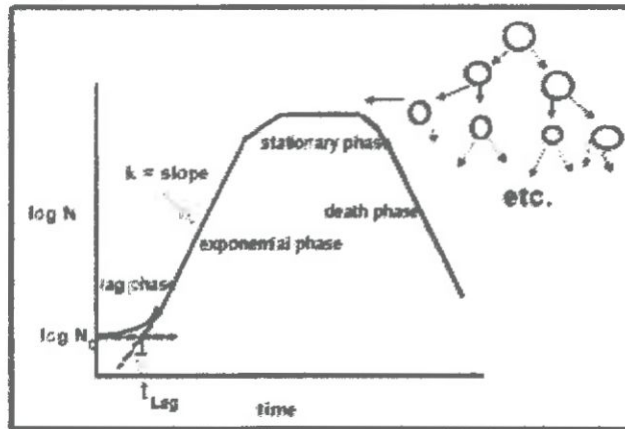
Como ya se ha indicado anteriormente, el crecimiento se define con un incremento en el número de células microbianas en una población, lo cual también puede ser medido como un incremento en masa microbiana. En este contexto, la velocidad de crecimiento se define como el cambio en número de células o masa celular por unidad de tiempo (Madigan y col., 1999)⁷⁹.

Un cultivo microbiano creciendo en equilibrio imita una reacción auto catalítica de primer orden, es decir la velocidad del aumento de bacteria en un tiempo dado es proporcional al número o masa de bacterias presentes durante este tiempo (Stanier y col., 1989).

⁷⁸MANDINGAN, M. T. MARTINKO, J. M., AND PARKER, J. Brock biology de los microorganismos. Ed. Prentice Hall International, Inc. pp. 149-177. 1997

⁷⁹MANDINGAN, M. T. MARTINKO, J. M., AND PARKER, J. Brock biology de los microorganismos. Ed. Prentice Hall Iberia, 8ª Ed. Revisada, Inc. pp. 149-177. 1997

FIGURA N°2.



Fuente: Labuza, T., 2004⁸⁰
CURVA DE CINETICA DE CRECIMIENTO BACTERIANO

III.5.4. MICROBIOLOGÍA PREDICTIVA

El término Microbiología Predictiva surgió al aplicar una serie de técnicas matemáticas y estadísticas a la Microbiología que permitían predecir la respuesta de una población microbiana a partir de observaciones previas. Whiting (1995)⁸¹ la describe como el campo de estudio que combina elementos de microbiología, matemáticas y estadística para desarrollar modelos que describan y predigan matemáticamente el crecimiento o muerte de microorganismos, cuando se les somete a condiciones ambientales específicas.

⁸⁰Labuza, t. Predictive microbiology principles. Department of food science and nutrition. University of minnesota, 2004, pp. 12.

⁸¹whiting, r. C. Microbial modeling in foods. Critical reviews in food science and nutrition vol. 35:467-494. 1995

IV. METODOLOGÍA

IV.1. MATERIALES

IV.1.1.EQUIPOS

- Agitador magnético
- Autoclave fabricado V. Miranda de 20°C a 300 °C. y 0 a 30Lb/in.
- Balanza analítica digital GR-200 20.
- Bomba al vacío Neuberger 68103.
- Cámara de refrigeración FaedaCaravelle.
- Centrifuga Engelsdorfmlw T-30.
- Cronómetro
- Cubeta de baño maría memmert.
- Cuenta colonias Dr. N Gerber& Co. 1143-04.
- Destilador de agua kottermann 1032.
- Equipo kjeldahl con digestor velp científica DK6.
- Estufa esterilizadora marca Memmert 20°C a 250°C.
- Estufa incubadora marca Memmert 20°C a 50°C.
- Micro pipeta 1-1000µL
- Muflatipo OH63.
- Mechero bunsen
- Potenciómetro modelo 8025 vwr scientific products.
- Refrigeradora congeladora infrisa.
- Selladora.

IV.1.2.OTROS MATERIALES

Material de vidrios: matraces, matraces aforados, embudos, vasos de precipitado, pipetas, baguetas, buretas, probeta, crisoles, placas petri, tubos kjeldahl para la digestión, tubos de ensayo, gradillas, pro pipeta, puntas para micro pipeta, luna de reloj, asa de siembra, pinzas y otros materiales de laboratorio para los análisis físico-químicos requeridos por los métodos.

Recipientes de acero inoxidable, cucharas, envases de vidrio de 1L, papel aluminio, papel craft, papel filtro, marcador de vidrio, piseta, termómetros y otros.

IV.1.3.REACTIVOS

- Ácido clorhídrico (Merck)
- Ácido sulfúrico (Merck)
- Agar plate count (Merck)
- Agua destilada
- Agar MRS (Merck).
- Agua peptonada
- Buffer pH 4, 7 y 10 (Merck)
- Caldo MRS (Merck)

- Cloruro de bario (Merck)
- Cloruro de sodio (Merck)
- Formol 40% (Merck)
- Hidróxido de sodio (Merck)
- Indicadores fenolftaleína, rojo de metileno y azul de metileno (Merck).
- Peptona de caseína (Merck)
- Sulfato de cobre y sulfato de potasio (Merck)
- Petrifilm™ para recuento de Aerobios.
- Petrifilm™ para recuento de Coliformes.

IV.1.4.MATERIAL EXPERIMENTAL

- Harina de grano de *Hordeum vulgare* (Cebada).
- Harina de grano de *Chenopodium quinoa willd* (Quinoa).
- Harina de grano de *Glycine max* (Soya).
- *Lactobacillus acidophilus* liofilizado (ATTC 4356-02).

IV.1.5.IMPLEMENTOS DE PROTECCIÓN

- Bata color blanco manga larga.
- Gafas.
- Gorro o toca.
- Guantes.
- Pantalón Largo.

- Tapa bocas.
- Zapato cerrado.

IV.2. METODOS DE ANÁLISIS

IV.2.1. ANÁLISIS FÍSICO-QUÍMICOS Y MICROBIOLÓGICO DE LAS HARINAS DE CEBADA, QUINUA Y SOYA.

- A. **ÁCIDEZ TOTAL:** Se basa en la neutralización de la acidez de la muestra, mediante titulación con una solución de hidróxido de sodio (NTP 205.039).
- B. **CENIZA:** La muestra se incinera a 600°C para quemar todo el material orgánico (NTP 205.038).
- C. **HUMEDAD:** Se basa en la pérdida de peso que sufre una muestra por calentamiento, hasta obtener peso constante (NTP 205.037).
- D. **pH:** Se determinó utilizando el potenciómetro.
- E. **PROTEÍNAS TOTALES:** Determinación de proteínas en cereales. AOAC, método 945.18-B.

IV.2.2. ANÁLISIS PROTEÍCO DEL HIDROLIZADO DE CEBADA, QUINUA Y SOYA.

- A. **DETERMINACIÓN DE NITRÓGENO TOTAL:** Determinación de proteínas en cereales. AOAC, método 945.18-B.

B. DETERMINACIÓN DE NITRÓGENO ASIMILABLE:

Determinación de nitrógeno ASIMILABLE por método de Sorensen; el útil para medir el nitrógeno orgánico como aminoácidos libres, polipéptidos en muestras líquidas o extractos.

Neutralizar 10 mL de muestra con NaOH 0.1N usando fenolftaleína como indicador. Detenerse en el punto que aparece una coloración rosada que persiste por 30seg.

Agregar 10mL de formol neutralizado recientemente con fenolftaleína y titular la acidez liberada con NaOH 0.1N hasta el punto final. Tomar este último valor para el cálculo de Nitrógeno asimilable y el primero para el cálculo de la acidez.

El cálculo:

$$g\%N_{asimilable} = \frac{V_{NaOH} \times N_{NaOH} \times 0.014 \times 100}{V_m}$$

V_m: volumen de la muestra en mL

V_{NaOH}: volumen de gastode NaOH mL

C. DETERMINACIÓN DEL GRADO DE HIDRÓLISIS (%G. H)

El grado de hidrólisis se definió como el porcentaje de nitrógeno asimilable en los hidrolizados con respecto al nitrógeno total (método de Kjeldahl) de las mismas.

$$\%G. H = \frac{\%N_{asimilable}}{\%N_{total}} \times 100$$

IV.3. DISEÑO EXPERIMENTAL

IV.3.1. PREPARACIÓN DE HIDROLIZADO DE CEBADA, QUINUA Y SOYA.

- A. Se identificó la materia prima y se realizaron los análisis de acidez total, ceniza, humedad, proteínas totales y sus respectivos análisis microbiológicos de las harinas de cebada, quinua y soya.

- B. Luego se pesó 80gr de las harinas de cebada, quinua y soya respectivamente.

- C. Se trasladó las harinas de cebada, quinua y soya respectivamente en un envase de 1L con ayuda de un embudo de vidrio y una bagueta estéril.

- D. Se mantuvo siempre tapados los envases una vez vertido las harinas de cebada, quinua y soya respectivamente, manteniéndose en ambiente estéril a temperatura ambiente.

- E. Se dosificó y adicionó 1000mL de agua destilada con ayuda de una probeta estéril a cada uno de los envases.

- F. Se agitó vigorosamente por un espacio de 3 min aproximadamente o hasta obtener una mezcla homogénea.
- G. Inmediatamente se auto clave a 120°C y 120lb/in² por un espacio de 20min.
- H. Después del tratamiento térmico se retiraron los hidrolizados del auto clave dejándose reposar y enfriar aproximadamente por un espacio de 3 horas en un ambiente estéril y a temperatura ambiente.
- I. Se trasvasó el sobrenadante a recipientes estériles para luego filtrarlos.
- J. Se tomaron tres muestras de 100mL cada una, del sobrenadante previamente filtrado, del hidrolizado de soya, quinua y cebada.
- K. Hidrolizados de cebada, quinua y soya respectivamente; se almacenó en refrigeración y ambiente estéril.

FIGURA N°3.



Hidrolizados de soya, quinua y cebada respectivamente

IV.3.2.ACTIVACIÓN Y OBTENCIÓN DEL INOCULO DE LACTOBACILLUS ACIDOPHILLUS

- A. Una vez activado el *Lactobacillus Acidophilus* en Caldo MRS por 24 horas a Temperatura de 38.5°C y en aerobiosis se observó una turbidez blanquecina.
- B. Tomándose una muestra de *Lb. Acidophilus* activado se sembró por la técnica de estrías en Agar MRS.
- C. Se rótulo: Nombre del microorganismo, nombre del Agar, nombre del responsable o analista, fecha y hora.

D. Dentro del tiempo de incubación (48 horas) se observó formación de colonias del *Lb. Acidophilus*.

E. Luego con uso del patrón de Mac Farland se obtuvo una concentración de *Lb. Acidophilus* de 10^7 aproximadamente en agua peptonada.

FIGURA N°4



Obtención del inculo de *Lactobacillus Acidophilus*

IV.3.3. INOCULACIÓN DEL *LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS* EN LOS HIDROLIZADOS DE SOYA, QUINUA Y CEBADA RESPECTIVAMENTE.

A. Las tres muestras de 100mL de hidrolizados son llevados a pasteurización a 70°C por 15min.

B. Una vez temperada entre 20 y 25°C, se realizó el cultivo de *Lb. Acidophilus* según las especificaciones en el CUADRO 5, el cual se realizó por triplicado para cada uno de los hidrolizados de soya, quinua, cebada y un control (Caldo MRS).

CUADRO 5 INOCULACIÓN DEL LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS EN LOS HIDROLIZADOS DE SOYA, QUINUA Y CEBADA RESPECTIVAMENTE

	Volumen de MEDIO	MO	volumen DE INOCULO	INCUBACION	TIEMPO DE INCUBACIÓN
Hidrolizado de Soya (R1,R2,R3)	100mL+1mL complejo B (20%)	L. Acidophilus	1 mL (cultivo madre a 10 ⁷ UFC)	38.5 °C	0 a 57 horas
Hidrolizado de Quinua (R1,R2,R3)	100mL+1mL complejo B (20%)	L. Acidophilus	1 mL (cultivo madre a 10 ⁷ UFC)	38.5 °C	0 a 57 horas
Hidrolizado de Cebada (R1,R2,R3)	100mL+1mL complejo B (20%)	L. Acidophilus	1 mL (cultivo madre a 10 ⁷ UFC)	38.5 °C	0 a 57 horas
Caldo MRS (R1)	100mL+1mL complejo B (20%)	L. Acidophilus	1 mL (cultivo madre a 10 ⁷ UFC)	38.5 °C	0 a 57 horas

Fuente: Elaboración propia

FIGURA N°5.



Hidrolizados de soya, quinua y cebada respectivamente inoculados con *Lactobacillus Acidophilus*

IV.3.4. INCUBACION Y SEMBRADO DEL LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS EN HIDROLIZADO DE SOYA, QUINUA Y CEBADA RESPECTIVAMENTE

A. Se procede a incubar las muestras de hidrolizados con *Lb. Acidophilus*.

B. Para la determinación de recuentos cuantificables se realizaron diluciones. La cantidad de diluciones a realizar fueron las necesarias para cuantificar el crecimiento de los microorganismos a través de la siembra de dichas diluciones. Lo anterior se describe en el CUADRO 6.

CUADRO 6 DILUCIONES DE MUESTRA PARA EL SEMBRADO

MEDIO	DILUCION 10^{-3}	DILUCION 10^{-4}	DILUCION 10^{-5}	DILUCION 10^{-n}
Hidrolizado + L. <i>Acidophilus</i>	9mL agua peptonada/1mL de medio	9mL agua peptonada/1mL de dilución 10^{-3}	9mL agua peptonada/1mL de dilución 10^{-4}	9mL agua peptonada/1mL de dilución 10^{-n+1}

Fuente: Elaboración propia

La siembra se realizó según el cuadro anterior y por duplicado en su mejor dilución.

CUADRO 7 EJEMPLO DE SIEMBRA PARA RECuento DE MICROORGANISMOS.

	MEDIO	VOLUMEN INOCULACIÓN	TEMPERATURA	TIEMPO DE INOCULACIÓN	RECuento
SIEMBRA	Agar MRS	0.1mL dilución 10^{-n}	38.5 °C	72 horas	$10^{-(n+1)}$

Fuente: Elaboración propia

A continuación se muestra un diagrama de flujo de la experiencia. FIGURA N°6

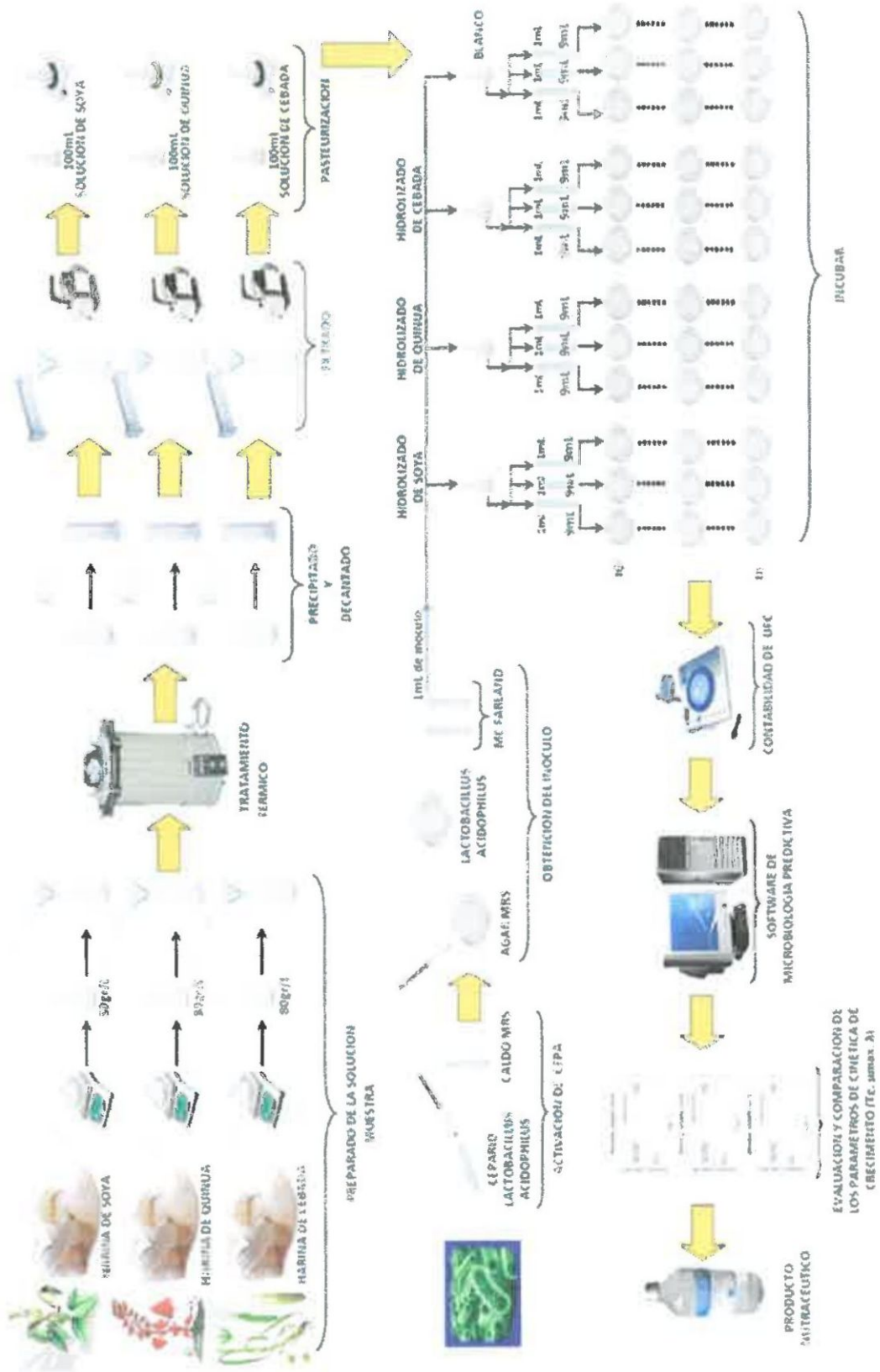
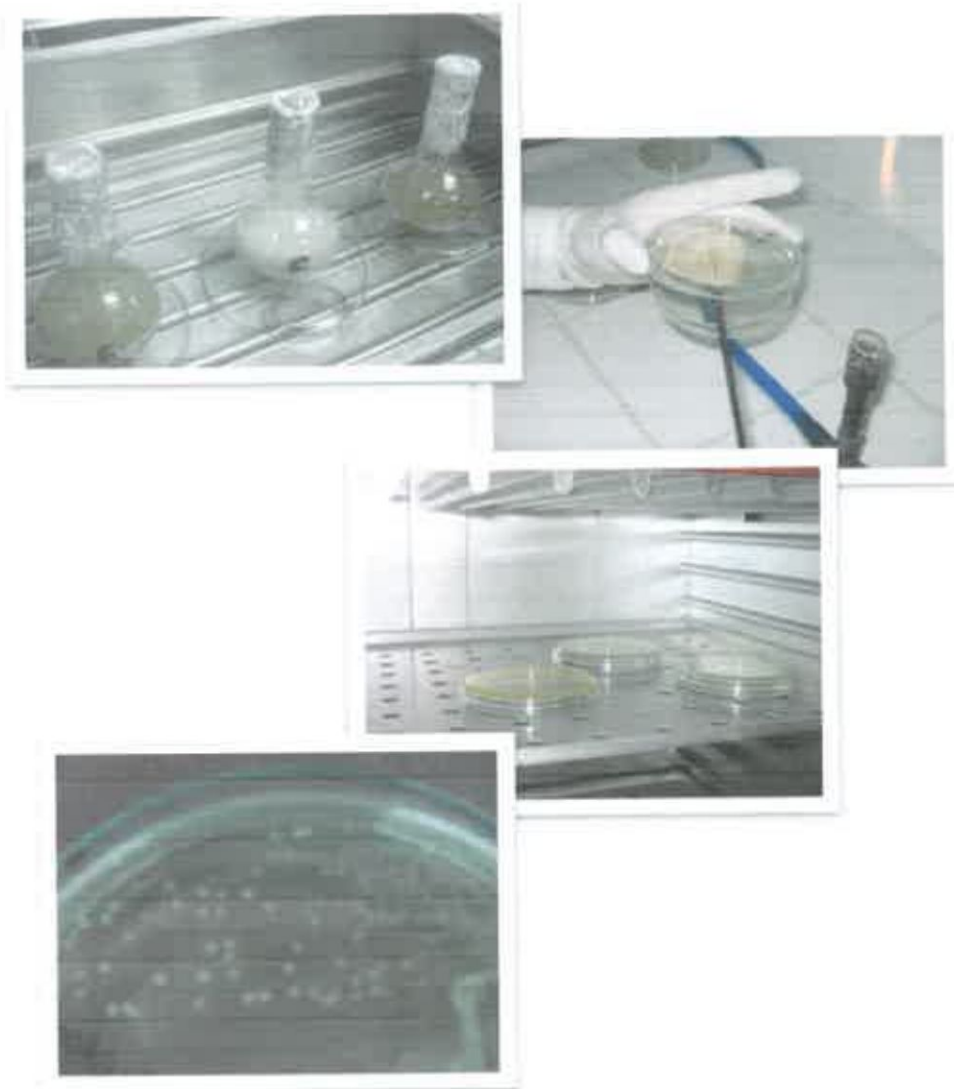


FIGURA N°6

FIGURA N°7



Siembra, incubación y obtención de colonias de *Lactobacillus Acidophilus* en Hidrolizados de soya, quinua y cebada respectivamente

Diseño experimental: Del diseño experimental resultaron 3 combinaciones las cuales se realizaron en triplicado, obteniendo finalmente 9 ensayos, evaluados en los 13 niveles de la covariable. Las variables de respuesta fueron: curva de crecimiento, viabilidad del microorganismo sobre 10^7 , los cuales en conjunto definen el mejor sustrato para la supervivencia del *Lb. Acidophilus*.

Para el análisis de los datos se utilizó el programa estadístico SPSS STATISTICS 17.0

V. RESULTADOS

V.1. ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICOS DE LAS HARINAS DE SOYA, QUINUA Y CEBADA.

Se procede a exponer los resultados experimentales de cada análisis realizadas a las respectivas harinas con la finalidad de tener un control de calidad de la materia prima.

V.1.1. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE HUMEDAD:

CUADRO 8 HUMEDAD PROMEDIO Y DESVIACION ESTANDAR DE LAS HARINAS DE SOYA, QUINUA Y CEBADA.

	HUMEDAD	
	PROMEDIO	S
HARINA DE SOYA	10.30%	0.22
HARINA DE QUINUA	7.23%	0.03
HARINA DE CEBADA	7.54%	0.02

Fuente: Elaboración propia

En el CUADRO 8 se establece los contenidos de humedad promedio obteniéndose para la harina de soya 10.30% con una desviación estándar de 0.22, para la harina de quinua 7.23% con una desviación estándar de 0.03 y para la harina de cebada 7.54% con una desviación estándar de 0.02.

V.1.2. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE PROTEINAS

CUADRO 9 PROTEINAS TOTALES PROMEDIO EN BASE HUMEDA (BH) Y PROTEINAS TOTALES PROMEDIO EN BASE SECA (BS) DE LAS HARINAS DE SOYA, QUINUA Y CEBADA.

	PROTEINAS TOTALES		
	PROMEDIO(BH)	PROMEDIO(BS)	S
HARINA DE SOYA	34.98 %	38.99%	0.86
HARINA DE QUINUA	12.36 %	13.32%	0.30
HARINA DE CEBADA	7.58 %	8.19%	0.12

Fuente: Elaboración propia

En el CUADRO 9 se establece el contenido de proteínas obteniéndose para la harina de soya 34.98% en base húmeda y 38.99% en base seca, con una desviación con una desviación estándar de 0.86, para la harina de quinua 12.36% en base húmeda y 13.32% en base seca con una desviación estándar de 0.3 y para la harina de cebada 7.58% en base húmeda y 8.19% en base seca con una desviación estándar de 0.12.

V.1.3. DETERMINACION DE CENIZA

CUADRO 10 CANTIDAD DE CENIZA PROMEDIO Y DESVIACION ESTANDAR DE LAS HARINAS DE SOYA, QUINUA Y CEBADA.

	CENIZA	
	PROMEDIO	S
HARINA DE SOYA	2.44%	0.04
HARINA DE QUINUA	2.40%	0.09
HARINA DE CEBADA	2.68%	0.01

Fuente: Elaboración propia

En el CUADRO 10 se establece los contenidos de ceniza obteniéndose para la harina de soya 2.44% con una desviación estándar de 0.04, para la harina de quinua 2.40% con una desviación estándar de 0.09 y para la harina de cebada 2.68% con una desviación estándar de 0.01

V.1.4. DETERMINACIÓN DE ACIDEZ TOTAL

CUADRO 11 CANTIDAD DE ACIDEZ TOTAL PROMEDIO Y DESVIACIÓN ESTANDAR DE LAS HARINAS DE SOYA, QUINUA Y CEBADA.

	ACIDEZ TOTAL	
	PROMEDIO	S
HARINA DE SOYA	0.79%	0.00
HARINA DE QUINUA	0.26%	0.00
HARINA DE CEBADA	0.19%	0.00

Fuente: Elaboración propia

En el CUADRO 11 se establece los contenidos de acidez total obteniéndose para la harina de soya 0.79% con una desviación estándar de 0.00, para la harina de quinua 0.26% con una desviación estándar de 0.00 y para la harina de cebada 0.19% con una desviación estándar de 0.00.

V.2.DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE NITRÓGENO TOTAL (%N), NITRÓGENO ASIMILABLE (%N), pH Y ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE CALIDAD SANITARIA EN LOS HIDROLIZADOS DE SOYA, QUINUA Y CEBADA RESPECTIVAMENTE.

CUADRO 12PORCENTAJE DE NITRÓGENO TOTAL EN BASE SECA Y BASE HUMEDAD RESPECTIVAMENTE

	N TOTAL (BS)	N TOTAL(BH)	S
HIDROLIZADO SOYA	6.78%	0.23%	0.097
HIDROLIZADO QUINUA	2.58%	0.09%	0.039
HIDROLIZADO CEBADA	1.07%	0.04%	0.082

Fuente: Elaboración propia

En el CUADRO 12, se presenta la cantidad de nitrógeno total expresado en porcentaje; para el hidrolizado de soya equivalente a 6.78% con una desviación estándar de 0.604, para el hidrolizado de quinua equivalente a 2.58% con una

desviación estándar de 0.039 y para el hidrolizado de cebada equivalente a 1.07% con una desviación estándar de 0.082.

CUADRO 13 PORCENTAJE DE NITRÓGENO ASIMILABLE EN LOS HIDROLIZADOS DE SOYA, QUINUA Y CEBADA.

	N ASIMILABLE	S
HIDROLIZADO SOYA	0.19%	0.007
HIDROLIZADO QUINUA	0.06%	0.058
HIDROLIZADO CEBADA	0.02%	0.016

Fuente: Elaboración propia

En el CUADRO 13, se presenta la cantidad de nitrógeno asimilable expresado en porcentaje; para el hidrolizado de soya equivalente a 0.19% con una desviación estándar de 0.007, para el hidrolizado de quinua equivalente a 0.06% con una desviación estándar de 0.058 y para el hidrolizado de cebada equivalente a 0.02% con una desviación estándar de 0.016.

CUADRO 14 POTENCIAL DE HIDROGENIONES (pH) EN LOS HIDROLIZADOS DE SOYA, QUINUA Y CEBADA RESPECTIVAMENTE.

	pH	S
HIDROLIZADO DE SOYA	6.5	0.019
HIDROLIZADO DE QUINUA	6.0	0.015
HIDROLIZADO CEBADA	5.6	0.020

Fuente: Elaboración propia

En el CUADRO 14, se presenta los valores de pH para el hidrolizado de soya 6.5, para el hidrolizado de quinua 6.0 para el hidrolizado de cebada 5.6.

CUADRO 15 ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE CALIDAD SANITARIA E INOCUIDAD DE LOS HIDROLIZADOS DE SOYA, QUINUA Y CEBADA

MICROORGANISMOS	Hidrolizado de Soya	Hidrolizado de Quinoa	Hidrolizado de Cebada
	Ufc/mL	Ufc/mL	Ufc/mL
AEROBIOS MESOFILOS	<1	<1	<1
COLIFORMES TOTALES	<1	<1	<1

Fuente: Elaboración propia

V.3.CURVAS DE CRECIMIENTO DEL LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS EN LOS HIDROLIZADOS DE SOYA, QUINUA Y CEBADA RESPECTIVAMENTE.

CUADRO 16 CURVA DE CRECIMIENTO DEL LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS EN HIDROLIZADO DE SOYA

SUSTRATO	HIDROLIZADO DE SOYA		
	Tratamiento 1		
Repeticiones	1	2	3
Tiempos (horas)	Log(UFC/mL)	Log(UFC/mL)	Log(UFC/mL)
0	7.201	7.208	7.160
3	7.280	7.255	7.273
6	7.579	7.547	7.657
8	7.770	7.716	7.919
10	8.100	8.114	7.961
20	9.580	9.602	9.810
24	9.752	9.848	9.826
27	9.854	9.903	9.929
30	9.989	9.980	10.004
33	10.011	9.996	10.031
50	10.002	9.998	10.051
54	10.053	9.993	10.068
57	10.055	10.041	9.993
pendiente	0.38	0.41	0.43
Desv. Estándar	0.025166115		

Fuente: Elaboración propia

CUADRO 17 CURVA DE CRECIMIENTO DEL LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS EN HIDROLIZADO DE QUINUA

SUSTRATO	HIDROLIZADO DE QUINUA		
	Tratamiento 2		
Repeticiones	1	2	3
Tiempos (horas)	Log(UFC/mL)	Log(UFC/mL)	Log(UFC/mL)
0	7.114	7.112	7.138
3	7.157	7.175	7.161
6	7.453	7.325	7.343
8	7.556	7.565	7.525
10	7.789	7.890	7.861
20	9.362	9.217	9.230
24	9.597	9.562	9.613
27	9.756	9.782	9.792
30	9.785	9.848	9.810
33	9.799	9.854	9.816
50	9.872	9.845	9.842
54	9.848	9.857	9.875
57	9.889	9.810	9.785
pendiente	0.39	0.36	0.38
Desv. Estándar	0.015275252		

Fuente: Elaboración propia

CUADRO 18 CURVA DE CRECIMIENTO DEL LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS EN HIDROLIZADO DE CEBADA

SUSTRATO	HIDROLIZADO DE CEBADA		
	Tratamiento 3		
Repeticiones	1	2	3
Tiempos (horas)	Log(UFC/mL)	Log(UFC/mL)	Log(UFC/mL)
0	7.223	7.216	7.233
3	7.239	7.243	7.249
6	7.433	7.376	7.401
8	7.566	7.546	7.565
10	7.740	7.733	7.745
20	8.699	8.716	8.708
24	8.851	8.839	8.866
27	8.875	8.842	8.872
30	8.842	8.929	8.906
33	8.932	8.949	8.947
50	8.954	8.929	8.906
54	8.959	8.906	8.898
57	8.961	8.932	8.987
pendiente	0.32	0.34	0.34
Desv. Estándar	0.011547005		

Fuente: Elaboración propia

CUADRO 19 CURVA DE CRECIMIENTO DEL LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS EN EL CONTROL (caldo MRS)

SUSTRATO	Caldo MRS
	Control
Repeticiones	1
Tiempos (horas)	Log(UFC/mL)
0	7.293
3	7.301
6	7.802
8	8.002
10	8.257
20	10.112
24	10.356
27	10.378
30	10.522
33	10.472
50	10.512
54	10.520
57	10.490
Pendiente	0.45
Desv. Estándar	0

Fuente: Elaboración propia

V.4.DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS DE CINÉTICA DE CRECIMIENTO

La determinación de los parámetros de cinética de crecimiento se obtuvo a partir de las curvas de crecimiento y aplicando el software microfit ver. 1.0.

**V.4.1. PARÁMETROS DE CRECIMIENTO DEL LACTOBACILLUS
ACIDOPHILUS EN HIDROLIZADO DE SOYA.**

CUADRO 20 TIEMPO DE LATENCIA DEL *LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS* EN HIDROLIZADO DE SOYA.

SUSTRATO	HIDROLIZADO DE SOYA		
	Tratamiento 1		
Repeticiones	1	2	3
Tiempo de latencia (λ)	4.72	5.32	5.06
Promedio	5.033333333		
Desv. Stand.	0.300887576		

Fuente: Elaboración propia

CUADRO 21 VELOCIDAD MÁXIMA DE CRECIMIENTO DEL *LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS* EN HIDROLIZADO DE SOYA.

SUSTRATO	HIDROLIZADO DE SOYA		
	Tratamiento 1		
Repeticiones	1	2	3
Velocidad máxima (μ_{max})	0.38	0.41	0.43
Promedio	0.406666667		
Desv. Stand.	0.025166115		

Fuente: Elaboración propia

CUADRO 22 TIEMPO DE GENERACIÓN DEL *LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS* EN HIDROLIZADO DE SOYA.

SUSTRATO	HIDROLIZADO DE SOYA		
	Tratamiento 1		
Repeticiones	1	2	3
Tiempo de generación (tg)	1.85	1.69	1.61
Promedio	1.716666667		
Desv. Stand.	0.122202019		

Fuente: Elaboración propia

De los CUADROS 20, 21, 22, se presentan los parámetros de cinética de crecimiento del *Lactobacillus Acidophilus* en el hidrolizado de soya. Obteniéndose un tiempo de latencia (T_{lag}) equivalente a 5.033, una velocidad máxima de crecimiento (μ_{max}) de 0.333, y un tiempo de duplicación o generación (T_g) de 1.717

**V.4.2. PARÁMETROS DE CRECIMIENTO DEL LACTOBACILLUS
ACIDOPHILUS EN HIDROLIZADO DE QUINUA.**

CUADRO 23 TIEMPO DE LATENCIA DEL LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS EN HIDROLIZADO DE QUINUA.

SUSTRATO	HIDROLIZADO DE QUINUA		
	Tratamiento 2		
Repeticiones	1	2	3
Tiempo de latencia (λ)	6.21	5.76	6.29
Promedio	6.086666667		
Desv. Stand.	0.285715476		

Fuente: Elaboración propia

CUADRO 24 VELOCIDAD MÁXIMA DE CRECIMIENTO DEL LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS EN HIDROLIZADO DE QUINUA.

SUSTRATO	HIDROLIZADO DE QUINUA		
	Tratamiento 2		
Repeticiones	1	2	3
Velocidad máxima (μ_{max})	0.39	0.36	0.38
Promedio	0.376666667		
Desv. Stand.	0.015275252		

Fuente: Elaboración propia

CUADRO 25 TIEMPO DE GENERACIÓN DEL LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS EN HIDROLIZADO DE QUINUA.

SUSTRATO	HIDROLIZADO DE QUINUA		
	Tratamiento 2		
Repeticiones	1	2	3
Tiempo de generación (tg)	1.78	1.91	1.82
Promedio	1.836666667		
Desv. Stand.	0.066583281		

Fuente: Elaboración propia

De los CUADROS 23, 24, 25, se presentan los parámetros de cinética de crecimiento del *Lactobacillus Acidophilus* en el hidrolizado de quinua. Obteniéndose un tiempo de latencia (T_{lag}) equivalente a 6.0867, una velocidad máxima de crecimiento (μ_{max}) de 0.377, y un tiempo de duplicación o generación (T_g) de 1.837

**V.4.3. PARÁMETROS DE CRECIMIENTO DEL LACTOBACILLUS
ACIDOPHILUS EN HIDROLIZADO DE CEBADA.**

CUADRO 26 TIEMPO DE LATENCIA DEL LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS EN HIDROLIZADO DE CEBADA.

SUSTRATO	HIDROLIZADO DE CEBADA		
	Tratamiento 3		
Repeticiones	1	2	3
Tiempo de latencia (λ)	6.78	7.16	7.11
Promedio	7.016666667		
Desv. Stand.	0.206478409		

Fuente: Elaboración propia

CUADRO 27 VELOCIDAD MÁXIMA DE CRECIMIENTO DEL LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS EN HIDROLIZADO DE CEBADA.

SUSTRATO	HIDROLIZADO DE CEBADA		
	Tratamiento 3		
Repeticiones	1	2	3
Velocidad máxima (μ_{max})	0.32	0.34	0.34
Promedio	0.333333333		
Desv. Stand.	0.011547005		

Fuente: Elaboración propia

CUADRO 28 TIEMPO DE GENERACIÓN DE CRECIMIENTO DEL LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS EN HIDROLIZADO DE CEBADA.

SUSTRATO	HIDROLIZADO DE CEBADA		
	Tratamiento 3		
Repeticiones	1	2	3
Tiempo de generación (tg)	2.17	2.03	2.05
Promedio	2.083333333		
Desv. Stand.	0.075718778		

Fuente: Elaboración propia

De los CUADROS 26, 27, 28, se presentan los parámetros de cinética de crecimiento del *Lactobacillus Acidophilus* en el hidrolizado de cebada. Obteniéndose un tiempo de latencia (T_{lag}) equivalente a 7.017, una velocidad máxima de crecimiento (μ_{max}) de 0.407, y un tiempo de duplicación o generación (T_g) de 2.083.

V.5.PARÁMETROS DE CINÉTICA DE CRECIMIENTO

Los parámetros de cinética de crecimiento se determinaron mediante el uso de software denominado Microfit 1.0.⁸² Obteniendo los siguientes resultados que se describen en el cuadro siguiente:

CUADRO 29 RESUMEN DE LOS PARÁMETROS DE CRECIMIENTO DEL LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS EN HIDROLIZADO DE SOYA, QUINUA Y CEBADA RESPECTIVAMENTE.

SUSTRATO	HIDROLIZADO DE SOYA			HIDROLIZADO DE QUINUA			HIDROLIZADO DE CEBADA			Caldo MRS
	Tratamiento 1			Tratamiento 2			Tratamiento 3			Control
Repeticiones	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1
μ_{max}	0.38	0.41	0.43	0.39	0.36	0.38	0.32	0.34	0.34	0.45
Promedio	0.406666667			0.376666667			0.333333333			0.45
Desv. Stand.	0.025166115			0.015275252			0.011547005			0
t-lag	4.72	5.32	5.06	6.21	5.76	6.29	6.78	7.16	7.11	4.68
Promedio	5.033333333			6.086666667			7.016666667			4.68
Desv. Stand.	0.300887576			0.285715476			0.206478409			0
t-g	1.85	1.69	1.61	1.78	1.91	1.82	2.17	2.03	2.05	1.53
Promedio	1.716666667			1.836666667			2.083333333			1.53
Desv. Stand.	0.122202019			0.066583281			0.075718778			0
Nmin	7.18	7.18	7.18	7.11	7.09	7.11	7.2	7.2	7.21	7.26
Nmax	10.01	9.99	10.02	9.84	9.85	9.84	8.93	8.92	8.93	10.49

$\mu_{max}(h)$: velocidad de crecimiento

t-lag(h): tiempo de latencia

t-g(1/h): tiempo de generación

Fuente: Elaboración propia

Nmin: población inicial

Nmax: población máxima

⁸²MicroFit fue desarrollado con el apoyo financiero de:

Reino Unido Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (avanzado y

Alimentación higiene Programa de fabricación LINK), y los socios industriales siguientes:

- Unigate European Foods
- Sainsbury's Supermarkets
- DuPont Cereals Innovation Centre
- United Biscuits

Como IFR ofrece MicroFit © como freeware.

Por favor, póngase en contacto con el Dr. Peter Wilson en IFR (PeterDG.Wilson @bbsrc.ac.uk).

VI. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

VI.1. PROTEÍNAS, HUMEDAD, CENIZA EN HARINAS.

CUADRO 30 PROTEÍNAS, HUMEDAD Y CENIZAS EN HARINAS DE SOYA QUINUA Y CEBADA

	PROTEINAS	HUMEDAD	CENIZA
HARINA DE SOYA	38.99	10.30	2.44
HARINA DE QUINUA	13.32	7.23	2.40
HARINA DE CEBADA	8.19	7.54	2.68

Fuente: Elaboración propia

Los resultados respecto a las cantidades de proteínas, humedad y cenizas en las harinas de soya, quinua y cebada, es consistente a lo dispuesto por el Ministerio de salud (MINSA) en las peruanas de composición de alimentos. 2008.

VI.2. GRADO DE HIDROLISIS (%N)

CUADRO 31 GRADO DE HIDROLISIS DE LOS HIDROLIZADOS DE SOYA, QUINUA Y CEBADA.

	Grado de Hidrolisis
HIDROLIZADO SOYA	80%
HIDROLIZADO QUINUA	65%
HIDROLIZADO CEBADA	50%

Fuente: Elaboración propia

Por lo tanto el hidrolizado de soya presenta mejor disposición de material protéico (enzimas y poli péptidos), las cuales son favorables para la adaptabilidad y crecimiento del *Lactobacillus Acidophilus*. Según (Law, 1978), Es importante la presencia de péptidos y aminoácidos libres para asegurar el crecimiento del microorganismo. Además tener en cuenta a los hidrolizados de quinua y hidrolizado de cebada que también presentan un importante aporte protéico menores pero importante.

VI.3. pH

CUADRO 32 pH DE LOS HIDROLIZADOS DE SOYA, QUINUA Y CEBADA.

	pH
HIDROLIZADO DE SOYA	6.5
HIDROLIZADO DE QUINUA	6.0
HIDROLIZADO DE CEBADA	5.6

Fuente: Elaboración propia

El pH de los hidrolizados de soya, quinua y cebada respectivamente favorecen para el crecimiento y supervivencia de *Lactobacillus Acidophilus* según, Bergey, 1992.

VI.4. ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO

CUADRO 34ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE LOS HIDROLIZADOS DE SOYA, QUINUA Y CEBADA.

MICROORGANISMOS	Hidrolizado de Soya Ufc/mL	Hidrolizado de Quinoa Ufc/mL	Hidrolizado de Cebada Ufc/mL
AEROBIOS MESOFILOS	<1	<1	<1
COLIFORMES TOTALES	<1	<1	<1

Fuente: Elaboración propia

Se realizó el análisis microbiológico, para evaluar la inocuidad del Hidrolizado de soya, quinua y cebada respectivamente, se comparó con la norma sanitaria que establece los criterios microbiológicos de calidad sanitaria e inocuidad para los alimentos y bebidas de consumo humano (MINSA/DIGESA) ver ANEXO 14. Cumpliendo los criterios citados garantizan la inocuidad de los hidrolizados.

VI.5. CURVAS DE CRECIMIENTO

Del anexo 1, 2, 3, 4 se ve claramente la viabilidad de *Lactobacillus Acidophilus* en los hidrolizados de soya, quinua y cebada respectivamente por encima de 10^8 ufc/mL, por lo que queda en manifiesto que el *Lactobacillus Acidophilus* para las condiciones de este ensayo se comporta como probiótico en los hidrolizados de soya, quinua y cebada respectivamente, además Shah(2001) sostiene que si bien se han realizado estudios con distintos concentraciones de *Lactobacillus Acidophilus*, es dudoso que concentraciones menores a 10^6 ufc/mL puedan presentar beneficios probióticos. Por lo tanto se puede decir que el hidrolizado de soya, quinua y cebada, respectivamente son buenos sustratos (prebióticos) para *Lactobacillus Acidophilus*.

VI.6. PARÁMETROS DE CRECIMIENTO:

VI.6.1. TIEMPO DE LATENCIA DEL LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS EN LOS HIDROLIZADOS DE SOYA, QUINUA Y CEBADA.

Del anexo 5 mediante el uso del estadístico ANOVA y TUCKEY con un nivel de significancia ($p=0.05$) se determinó que los valores del parámetro de tiempo de latencia del *Lactobacillus Acidophilus* en los hidrolizados de soya, quinua y cebada, son distintas obteniéndose un valor de Sig = 0.00 la cual es menor al valor de significancia ($p=0.05$).

Además se obtuvo que el *Lactobacillus Acidophilus* en el hidrolizado de soya se adapte en 5 horas mientras que en el hidrolizado de quinua e hidrolizado de cebada 6 y 7 horas respectivamente. Por lo tanto el *Lactobacillus Acidophilus* se adapta mas rápidamente en el hidrolizado de soya, debido que en la fase de

latencia las células se adaptan a su nuevo entorno induciendo o reprimiendo la síntesis y actividad de determinadas enzimas, iniciando la replicación de su material genético (Montville, 2000). Debido a que el hidrolizado de soya le otorga mayor disponibilidad de nitrógeno asimilable ver CUADRO13, el microorganismo puede adaptarse en menor tiempo.

FIGURA N°8



Tiempo de latencia del *Lactobacillus Acidophilus* en Hidrolizados de soya, quinua y cebada respectivamente

VI.6.2.VELOCIDAD MÁXIMA DE CRECIMIENTO DEL LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS EN LOS HIDROLIZADOS DE SOYA, QUINUA Y CEBADA.

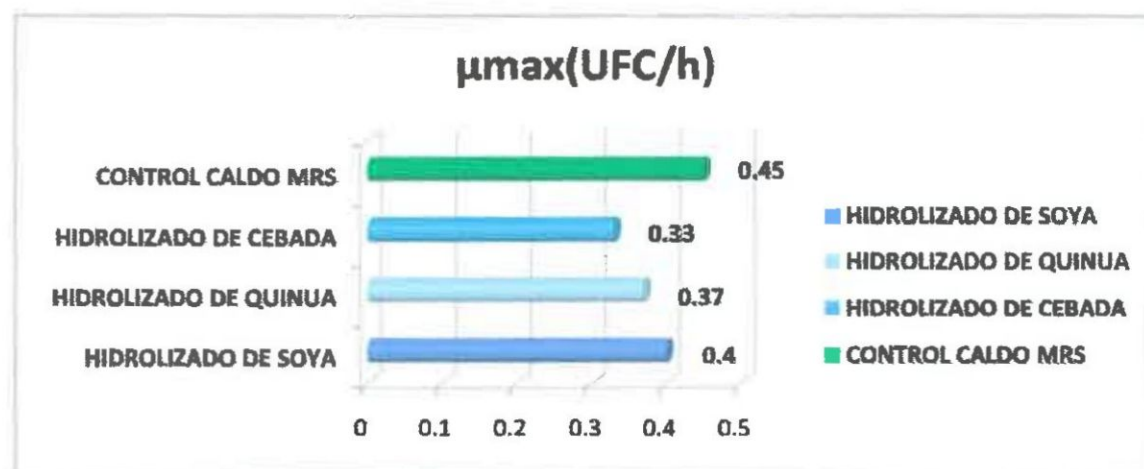
Del anexo 6 mediante el uso del estadístico ANOVA y TUCKEY con un nivel de significancia ($p=0.05$) se determinó, que las velocidades de crecimiento del *Lactobacillus acidophilus* en hidrolizado de quinua y cebada son similares ($\text{sig} = 0.061$) mayor a $p = 0.05$ (nivel de significancia) al igual comparamos la velocidad de crecimiento del *Lactobacillus acidophilus* en hidrolizado de quinua y soya también son similares ($\text{sig} = 0.190$),mayora $p = 0.05$ (nivel de significancia); no obstante las velocidades de crecimiento entre *Lactobacillus acidophilus* en

hidrolizado de cebada y soya son distintas (sig = 0.008) menor a $p = 0.05$ (nivel de significancia).

Comparando grupos se obtuvo: la velocidad máxima de crecimiento del *Lactobacillus acidophilus* en hidrolizado de soya presento mayor rapidez equivalente a 0.4 ufc/horas (24 ufc/minutos). Mientras que para el hidrolizado de quinua e hidrolizado de cebada presenta 0.37 ufc/horas (22 ufc/minutos) y 0.33 ufc/horas (19 ufc/minutos). Por lo tanto es mas favorable el hidrolizado de soya para el crecimiento del *Lactobacillus acidophilus*.

Además estas velocidades máxima de crecimiento, es análogo al obtenido por LOMAS y col. de 0.36 ufc/horas; de *Lactobacillus acidophilus* en suero de leche de cabra.

FIGURA N°9



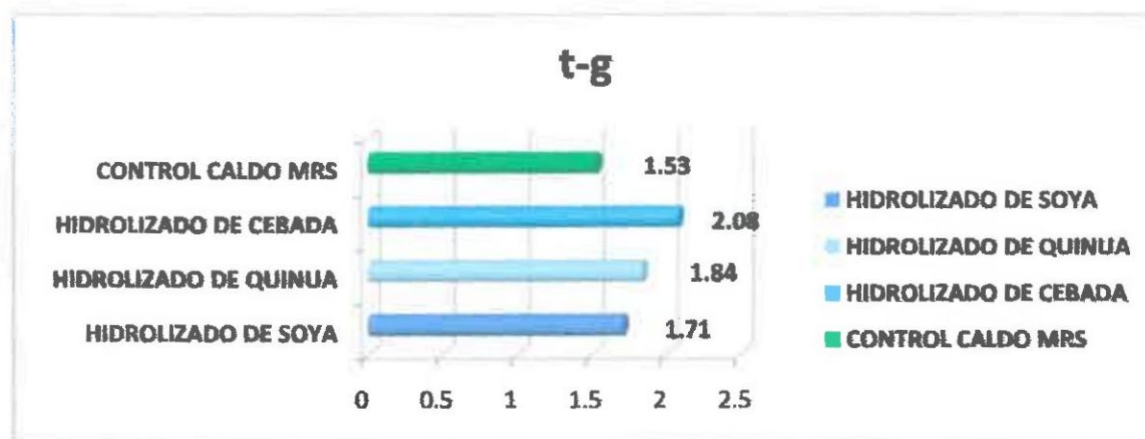
Velocidad máxima de crecimiento del *Lactobacillus Acidophilus* en Hidrolizados de soya, quinua y cebada respectivamente

VI.6.3. TIEMPO DE GENERACIÓN DEL LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS EN LOS HIDROLIZADOS DE SOYA, QUINUA Y CEBADA.

Del anexo 7 mediante el uso del estadístico ANOVA y TUCKEY con un nivel de significancia ($p=0.05$) se determinó que los tiempos de generación del *Lactobacillus acidophilus* en los hidrolizados de soya y quinua son similares ($\text{sig}=0.313$) mayor a $p=0.05$ (nivel de significancia), no obstante el tiempo de duplicación del *Lactobacillus acidophilus* en el hidrolizado de cebada es diferente con respecto al hidrolizado de quinua y soya ($\text{sig} = 0.007$) menor a ($p=0.05$).

Además, según Madigan y col. (1997) el tiempo de generación es útil como indicador del estado fisiológico de una población celular y es usado para comprobar efecto negativo o positivo de un determinado tratamiento, muchas bacterias tienen tiempos de generación de 1-3 horas. La cual es consistente con los valores obtenidos para el *Lactobacillus acidophilus* en hidrolizado de soya ($t-g = 1.71$), *Lactobacillus acidophilus* en hidrolizado de quinua ($t-g = 1.84$) y *Lactobacillus acidophilus* en hidrolizado de cebada ($t-g = 2.08$).

FIGURA N°10



Tiempo de generación del *Lactobacillus Acidophilus* en Hidrolizados de soya, quinua y cebada respectivamente

CUADRO 35 Resumen de los parámetros de cinética de crecimiento del *Lactobacillus acidophilus* en los hidrolizados de soya, quinua y cebada respectivamente.

PARAMETROS DE CINETICA	HIDROLIZADO DE SOYA	HIDROLIZADO DE QUINUA	HIDROLIZADO DE CEBADA
t-lag	5.03	6.08	7.02
μ_{max}	0.40	0.37	0.33
t-g	1.71	1.84	2.08

$\mu_{max}(ufc/h)$: velocidad de crecimiento

t-lag(h): tiempo de latencia

t-g(1/h): tiempo de generación

Fuente: Elaboración propia

VII. CONCLUSIONES

- A. Se obtuvieron productos nutracéuticos, tanto con el hidrolizado de Soya, hidrolizado de quinua y hidrolizado de Cebada, las cuales presentan las condiciones necesarias para la supervivencia del *Lactobacillus acidophilus* pues se encontró viable con una población mayor a 1×10^8 UFC/mL garantizando así la supervivencia del microorganismo.
- B. Además se observó mejor desarrollo de *Lb. Acidophilus* en el hidrolizado de soya, debido a que presenta mayor velocidad máxima de crecimiento y se adaptó en el menor tiempo (tiempo de latencia), aprovechando oportunamente el sustrato, y presentando mejor tiempo de generación, garantizando el estado fisiológico de la población de *Lactobacillus acidophilus*.
- C. Finalmente se concluye que el hidrolizado de soya presenta mejor capacidad como sustrato para el desarrollo del *Lactobacillus acidophilus* y por lo tanto permite la obtención de un producto nutracéutico, que ofrece muchos beneficios a la salud de hombre.

VIII. RECOMENDACIONES

- A. Se recomienda continuar el estudio de otras bacterias probióticas en sustratos derivados de las leguminosas y cereales, debido a su alto aporte en nutrientes.
- B. Aplicar la técnica de liofilización bacteriana, para poder aislar probióticos a partir de cultivos en sustratos económicamente rentables como son los cereales.
- C. Elaborar vacunas orales a partir de la mezcla del hidrolizado de soya, quinua y cebada con *Lactobacillus acidophilus*.

IX. REFERENCIAS

- BARRON, M. Acción inhibitoria de probióticos sobre el crecimiento axénico in vitro de *Entamoeba histolytica*. Revista salud pública y nutrición, 2006, 7.
- BARRÓN M. SERRANO G. VILLAREAL L. VERDUZCO J. MORALES M. MATA B., Inhibición del crecimiento axénico in vitro de *entamoeba histolytica* por acción de probióticos. Ciencia UANL, 2008, 11: 235-290.
- NOBRE L. NEUMANN E. QUERCIA L. NICOLI J., Protection by *Lactobacillus acidophilus* ufv-h2b20 against experimental oral infection with *salmonella enterica* subsp. *Enterica* ser. Typhimurium in gnotobiotic and conventional mice, *Brazilian Journal of Microbiology*, vol.32.
- SAMANIEGO LUZ MARÍA Y SOSA DEL CASTILLOS, MARYLA. *Lactobacillus spp.*: Importantes promotores de actividad pro biótica, antimicrobiana y bioconservadora. La habana. Primera edición Editorial UNIV MES, 2000. pp. 5-6
- ANCASI, V. "Alimentos a base de cebada hidrolizada, kiwicha y leche entera en polvo". Tesis. Lima: Perú.UNAL.1992.
- BENITEZ, R. y col.; hidrolizados de proteína: procesos y aplicaciones
Disponible en: en <http://www.scielo.org.ar>; consultada el 16 de setiembre del 2009
- BRAVO, B.; Estudio de la hidrólisis enzimática de la harina de quinua (*Chenopodium quinoa Wild*); tesis para optar título de ingeniero de industrias Alimentarias, Universidad Nacional Agraria Lima; 1997.; pp.3-4.
- GUADIX, A. Procesos tecnológicos y métodos de control en la hidrólisis de proteínas. Departamento de Ingeniería Química. Universidad de Granada. 2000, 81-82.

- TAPIA, M. y col.; Los cereales andinos.
Disponible en: <http://www.musclecoop.com>; consultado el 20 de setiembre de 2009
- ZONABRIA GALVEZ, SONIA JACKELINE. "Obtención de una bebida a partir de quinua (*Chenopodium quinoa Willd*) hidrolizada". Lima: Perú. UNAL. 2003.
- ROBINSON, D.; Bioquímica y valor nutritivo de los alimentos; Zaragoza; Ed. ACRIBIA S.A.; 1991; p. 144.
- CHEL-GUERRERO, L. Biopeptidos alimenticios: nuevos promotores de la salud. *Revista salud publica y nutrición*, 9. 2008
- TISSIER H: Traitement des infections intestinales par la méthode de la flore bactérienne de l'intestin. *CR.Soc Biol*, 60: 359-361. 1906.
- ORLA-JENSEN S. The lactic acid bacteria. Copenhagen, I Komision Hos Ejnar Munksgaard. 1919
- KANDLER O. y WEISS N., Regular non-sporing Gram-positive rods. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 2, 1208-1209, 1986a.
- KANDLER o., WEISS N.,. Genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, 212^{AL}. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 2, 1209-1234, 1986b.
- BOTAZZI V., An introduction to rodshaped lactic-acid bacteria. *Biochimie*, 70: 303-315. 1988.
- Group E104 –IDF. Detection and enumeration of *Lactobacillus Acidophilus* (culture media). Bulletin of the IDF N° 306. 1995.
- BERGEY'S. Manual of determinate Bacteriology. U.S.A. Tenth Edition. The Williams Wilkings Co. Baltimore, 1992

- Heller K. Probiotic bacteria in fermented foods: product characteristics and starters organisms. *Am J. Clin. Nutr.* Vol.73: 374-379. 2001
- BAREFOOT, S. F; YING-RU CHEN; HUGHES, T. A; BODINE, A. B; SHEARER, M. Y AND HUGHES, M. D.. Identification and purification of a protein that induces production of the *Lactobacillus acidophilus* bacteriocin lactacin B. *Applied and Environmental Microbiology.* Vol 60. No 10: 3522-3528. 1994
- BAREFOOT, S. F. and KLAENHAMMER, T.R. Detection and activity of lactacin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. *Appl. Environm. Microbiol.* vol 45: 1808-1815. 1984
- JACK, R. W; TAGG, J. R. AND RAY, B. Bacteriocins of gram positive bacteria. *Microbiol.* Vol. 59: 171-200. 1995.
- DESMAZEAUD M. L'état des connaissances en métier de nutrition des bactéries lactiques. *Vol. 63: 267-316.* 1983
- LAW B.A., Peptide utilization by group N streptococci. *J. Gen. Microbiol.,* Vol. 105: 113-118. 1978
- VAN BOVEN A., KONINGS W.N. The uptake of peptides by microorganisms. *Neth. Milk Dairy J.,* Vol. 40:117-127. 1986
- EXTERKATE F.A.,. Membrane-bound peptidases in *Streptococcus cremoris.* *Neth. Milk Dairy J.,* Vol. 35: 328-332. 1981
- THOMAS T.D., MILLS O.E.,. Proteolytic enzymes of starter bacteria. *Neth. Milk DairyJ.,* Vol. 35:255-273. 1981
- LAW B.A. KOLSTAD J. Proteolytic systems in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek J. Microbiol. Serol.* Vol. 49: 225-245. 1983

- CONDON S. Responses of lactic acid bacteria to oxygen. *FEMS Microbiol. Vol.*, 46: 269-280. 1987
- LEDESMA O. V., DE RUIZ HOLGADO A. A synthetic médium for comparative studies of lactobacilli. *J.Appl. Bacteriol. Vol.42*: 123-133. 1977
- Metchnikoff E. Lactic acid as inhibiting intestinal putrefaction. In: *The prolongation of life: Optimistic studies*. W. Heinemann, J. London. Vol 1.: 161-183. 1907
- SCHREZENMEIR, J. y De VRESE, M..Probiotics, prebiotics, and synbiotics – approaching a definition. *Journal Clinical of Nutrition. Vol. 73 (2)*: 361-364. 2001
- COLLINS, D. y GIBSON, G. Probiotics, prebiotics, and synbiotics: approaches for modulating the microbial ecology of the gut. *American Journal Clinical Nutrition. Vol. 69 (5)*: 1052 – 1057. 1999
- GOLDIN B.R.. Lactic acid bacteria: implication for health. In: *Syndifrais, Les laits fermentés. Actualité de la recherché*, pp. 95-104, John Libbey Eurotext, Paris. 1989
- TERRÉ S.,. Propriétés technologiques nutritionnelles et physiologiques de *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus*. *Technique Laitière et Marketing, Vol.8*: 26-39. 1986
- WELCH C.. Nutritional and therapeutic aspects of *Lactobacillus acidophilus* in dairy products. *Cult Dairy Prod. J. Vol.22*: 23-24, 26. 1987
- RASIC J.L., KURMANN J.A., *Yoghurt, Scientific grounds, technology, manufacture and preparations*. Technical Dairy Publ. House, Denmark. Vol.1.1978.

- ALM L.. Effect of fermentation on lactose, glucose, and galactose content in milk products for lactose intolerant individuals. *J. Dairy Sci.*, Vol. 65: 346-352. 1982
- NAHAISI M.H..*Lactobacillus Acidophilus*: therapeutic properties, products and enumeration. In: *Developments in Food Microbiology-2*, R. K. ROBINSON, ed., Ch. 6, pp. 153-178, Elsevier *Appl. Sci., London*. 1986
- SARRA P.G., DELLAGLIO F. Colonization of a human intestine by four different genotypes of *Lactobacillus acidophilus*. *Microbiological*, Vol.7:331-339. 1984
- REDDY M.S., SHAHANI K.M., 1971. Isolation of an antibiotic from *Lactobacillus bulgaricus*. *J. Dairy Sci.*, Vol. 54:748. 1971
- GILLIAND S.E., SPECK M.L, 1977. Deconjugation of bile acids by intestinal *Lactobacilli*. *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 54: 989-902. 1977
- HANNOTIAUX L.. Le lait maternel: ses avantages; en particulier son role antidiarréique dans l'alimentation du nourisson. Thèse de l'Université de Lille. 1984
- PERDIGÓN G., NADER DE MACÍAS M.E., ÁLVAREZ S., OLIVER G., PESCE DE RUÍZ HOLGADO A.,Effect of perorally administered lactobacilli and macrophage activation in mice. *Infection Immunity*, Vol. 53: 404-410. 1986
- PERDIGÓN G., NADER DE MACÍAS M.E., ÁLVAREZ S., OLIVER G., PESCE DE RUÍZ HOLGADO A.,Enhancement of immune response in mice fed with *Streptococcus Thermophilus* and *Lactobacillus acidophilus*. *J. Dairy Sci.*, Vol. 70: 919-926. 1987

- PERDIGÓN G., NADER DE MACÍAS M.E., MEDICI M. Effect of lactic acid bacteria orally administered and of yogurt on the immune system. *In: Syndifrais, Les laits fermentés. Actualité de la recherche*, pp. 77-84, John Libbey Eurotext, Paris. 1989
- DE SIMONE C., BIANCHI SALVATORI B., NEGRI R., FERRAZZI M., BALDINELLI L., VESELY R. The adjuvant effect of yogurt on production of gamma-interferon by Con-A stimulated human peripheral blood lymphocytes. *Nutr. Reports Int.*, Vol. 3: 419-431. 1986
- RAO D.M., CHAWAN C.B., PULUSANI S.R.,. Influence of milk and Thermophilus milk on plasma cholesterol levels and hepatic cholesterogenesis. *J. Food Sci. Vol. 46: 1339-1341. 1981*
- GRUNEWALD K.K.,. Serum cholesterol levels in rats fed with skim milk fermented by *Lactobacillus Acidophilus*. *J.Food Sci.*, Vol. 47:2078-2079. 1982
- GILLILAND S.E., NELSON C.R., MAXWELL C. Assimilation of cholesterol by *Lactobacillus acidophilus* used as a dietary adjunct. *J. Dairy Sci*, Vol. 67: 3045-3051. 1987
- GORBACH S.L.,. Metabolism of carcinogens and drugs by the intestinal flora: effects of *Lactobacillus*. *In: Syndifrais, Les laits fermentés. Actualité de la recherche*, pp. 85-94, John Libbey Eurotext, Paris. 1989
- GOLDIN B.R., GORBACH S.L.,. The effect of milk and *Lactobacillus* feeding on human intestinal bacterial enzyme activity. *Am. J. Clin. Nutr.*, Vol. 39: 756-761. 1984

- GOLDIN B.R., GORBACH S.L. Effect of milk and *Lactobacillus acidophilus* dietary supplementation on 1,2-dimethylhydrazine dihydrochloride- induced intestinal cancer in rat. *J. Natl. Cancer Inst.*, Vol.64: 263-265. 1980
- WOLTER R., HENRY N. Bactéries lactiques en alimentation animale. G.T.V. 88-6-TE-073, Vol. 19-29. 1988
- WOLTERR., HENRY N., JACQUOTL., BRIEND G., BLANCHET M., DELESPAUL G., DHOMS P.,. Probiotiques en alimentation animale. Étude expérimentale de leur efficacité chez le rat et chez le veau de boucherie. *Rec. Méd. Vét.*, Vol. 163:1131-1138. 1987
- WATKINS B.D., MILLER B.F. NEIL D.H.,. In vivo inhibitory effects of *Lactobacillus acidophilus* against pathogens *Escherichia coli* in gnotobiotic chicks. *Poult. Sci.*,Vol. 61: 1298-1308. 1982
- WATKINS B.D., MILLER B.F. Competitive gut exclusion of avian pathogens by *Lactobacillus Acidophilus* in gnotobiotic chicks. *Poult. Sci. Vo.*, 62: 1772-1779. 1983
- HORNEY, I.S. Elaboración de cerveza: microbiología, bioquímica y tecnología. Editorial Acribia S. A. Zaragoza, España. 2003
- HOUGH, J.S. Biotecnología de la cerveza y de la malta. Editorial acribia, S.A. Zaragoza, España. 1990
- BELTRAN, P. Z., Y MALDONADO, P K. Caracterización microbiológica de cebada malteada y arroz y determinación de actividad enzimática amilolítica microbiana en el proceso de elaboración de mosto cervecero. Requisito parcial para optar el título de Microbiólogo Industrial. Pontificia Universidad Javería. Facultad de ciencias. Departamento de microbiología. Bogota, Colombia. 2002

- NATIONAL RESEARCH COUNCIL. LOST CROPS OF THE INCAS: Little-know plants of the Andes with promise for worldwide cultivation. National academy press, Washington D.C., Estados Unidos, 1989.
- ALBARRAN C. R. Estudio de algunos componentes químicos, caracteres morfoanatomicos y patrones proteicos en semillas de dos ecotipos de quinua (*Chenopodium quinua willd*). Concepción, Chile. Universidad de Concepción, 1993.
- CHUMCHUERE, S., MACDOUGALL, D.B. y ROBINSON, R.K. Production and properties of a semi-hard cheese made from soya milk. *International Journal of Food Science and Technology*. Vol. 6: 577-581. 2000
- LUSAS, K. y RIAZ, M. Soy protein product: processing and U.S.A. *Journal of Nutrition*. Vol.2 : 151-156. 1995
- INSTITUTO DE ESTUDIOS SALUD NATURAL DE CHILE. Soya. Disponible en: <http://www.geocities.com/iesnchile>. Consultado el 25 de octubre de 2010.
- KNIGHTS R.J. . Processing and evaluation of the antigenicity of protein hydrolysates. *Nutrition for station needs in infance protein hydrolysates*. Ed. Fina Lisshlpz, Cap. 8, pp.105-115. 1985
- ANSSI H. MANNINEN. Protein Hydrolysates In Sports And Exercise: A Brief Review. *Journal of Sports Science and Medicine* vol. 3: 60-63.2004
- SWINNEN, I.A.M., BERNAERTS, K., DENS, E. J. J., GEERAERD, A. H., AND VAN IMPE, J. F. Predictive modeling oh the microbial lag phase: a review. *International Journal of Food Microbiology* vol. 94:137-159. 2004
- BUCHANAN, R. L. AND KLAWITTER, L.A. Effect of temperature history on the growth of *Listeria monocytogenes* Scott A at refrigeration temperatures. *International Journal of Food Microbiology* vol. 12:235-246. 1991

- MONTVILLE, T. J. Principios que influyen en el crecimiento, la supervivencia y la muerte microbiana en los alimentos. In: Doyle, M. P.; Beuchat, L.R; and Montville, T. J. Microbiología de los Alimentos. Fundamentos and Fronteras. Editorial Acribia, S.A. España.13-30. 2000
- ROBINSON, T. P., OCIO, M. J., KALOTI, A., MACKEY, B. M. The effect of growth environment on the lag phase of *Listeria monocytogenes*. International Journal of Food Microbiology vol. 44:83-92. 1998
- STANIER, R. Y., INGRAHAM, J. L., WHEELIS, M. L. AND PAINTER, P. R. Microbiología 2 Ed, Ed. Reverte. pp. 195-209. 1989
- MANDINGAN, M. T. MARTINKO, J. M., AND PARKER, J. Brock biology de los microorganismos. Ed. Prentice Hall International, Inc. pp. 149-177. 1997
- MANDINGAN, M. T. MARTINKO, J. M., AND PARKER, J. Brock biology de los microorganismos. Ed. Prentice Hall Iberia, 8ª Ed. Revisada, Inc. pp. 149-177. 1997.
- WHITING, R. C. Microbial modeling in foods. Critical Reviews in Food Science and Nutrition Vol. 35:467-494. 1995.
- YAJAIRA GABRIELA LOMAS DE LEÓN Y CECILIA ROJAS DE GANTE. Aprovechamiento de suero de cabra como sustrato para el desarrollo de producto Fermentado Prebiótico con *Bifidobacterium bifidum* y *Lactobacillus Acidophilus*.

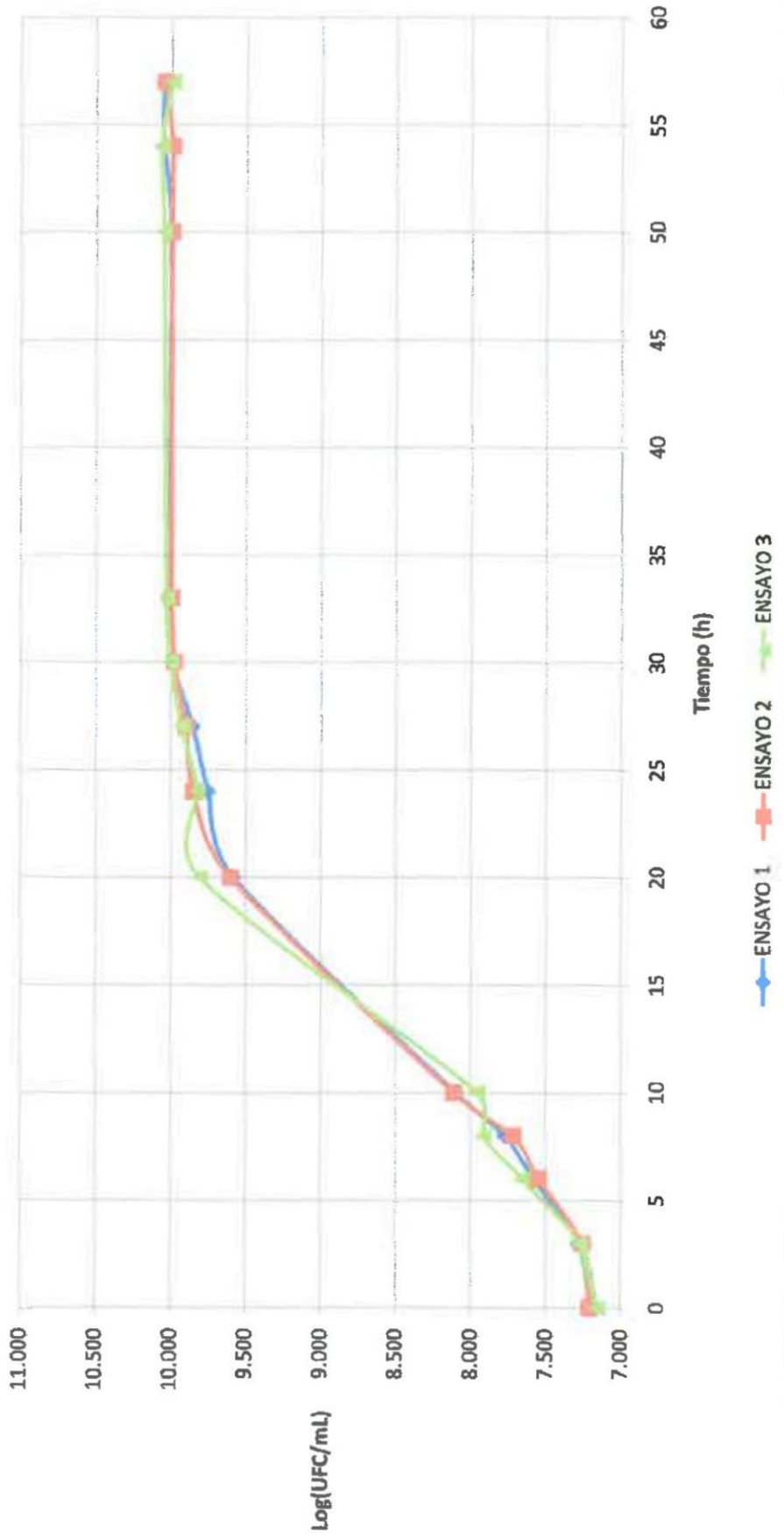
Disponible en: <http://www.respyn.uanl.mx/especiales/2005/ee-13-2005/index.html> ; consultado el 14 de abril de 2010

- SHAH, N. Funcional Food from Probiotics and Prebiotics. Food technology.vol11: 46-52. 2001

ANEXOS

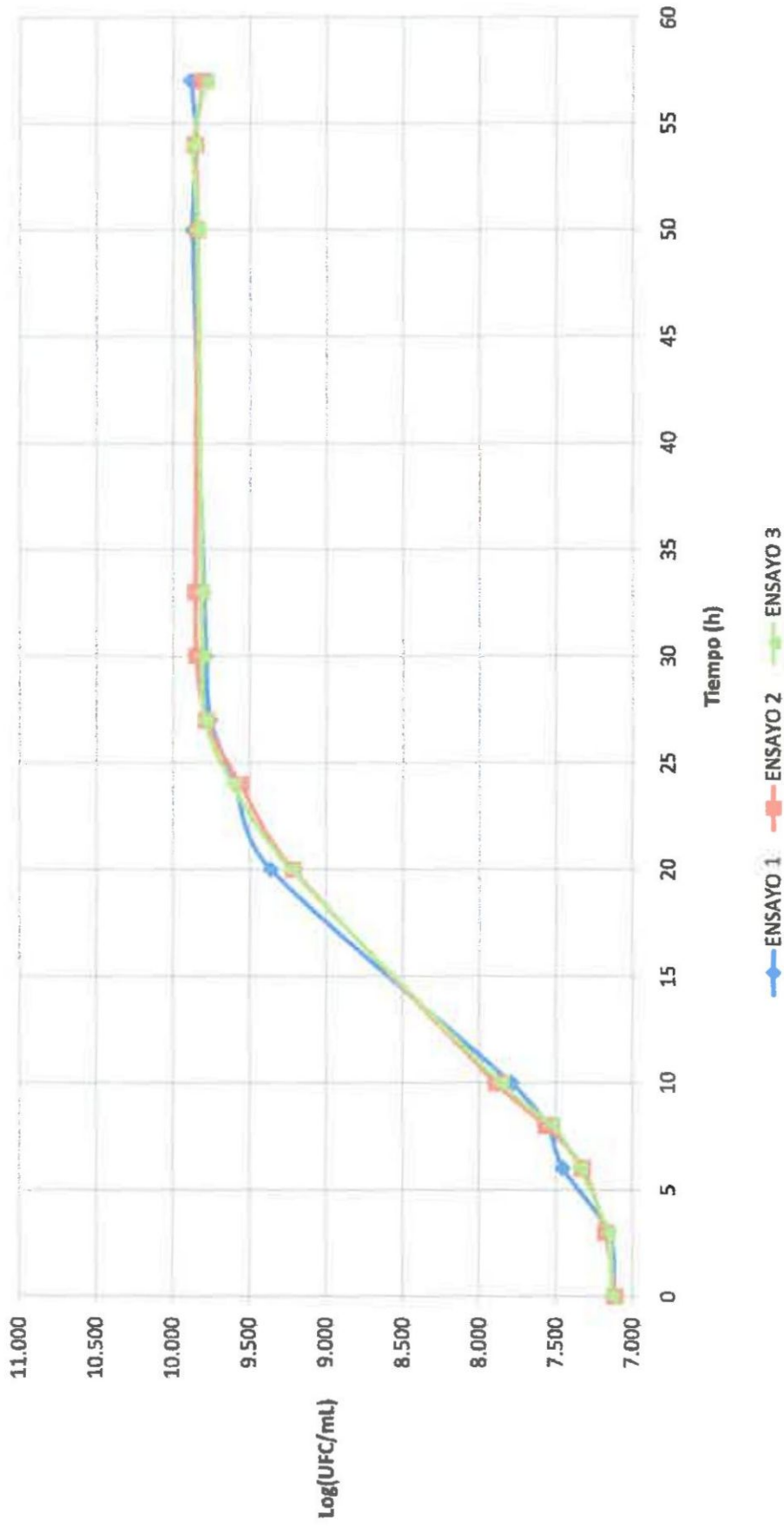
ANEXO 1

CURVA DE CRECIMIENTO DEL LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS EN HIDROLIZADO DE SOJA

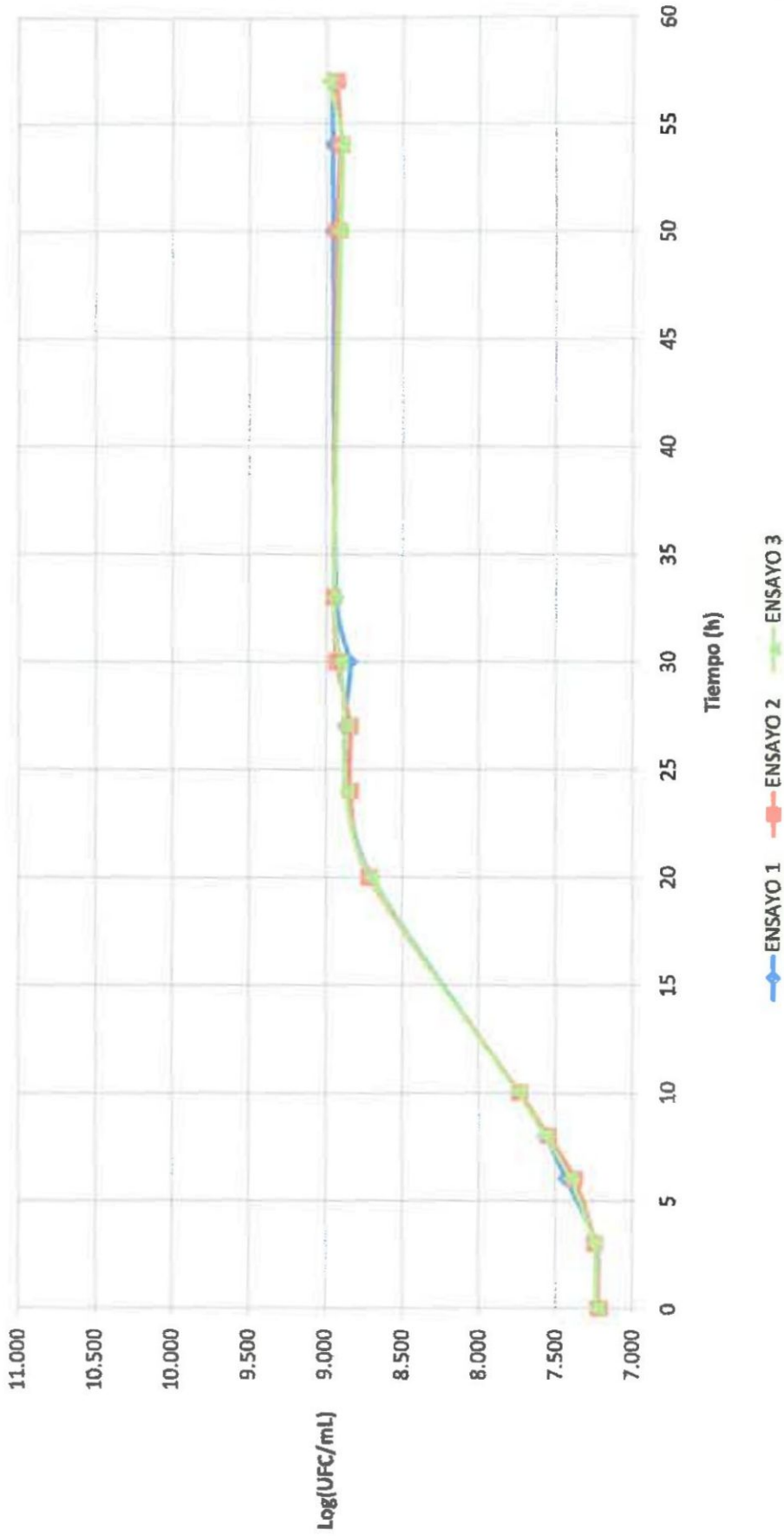


ANEXO 2

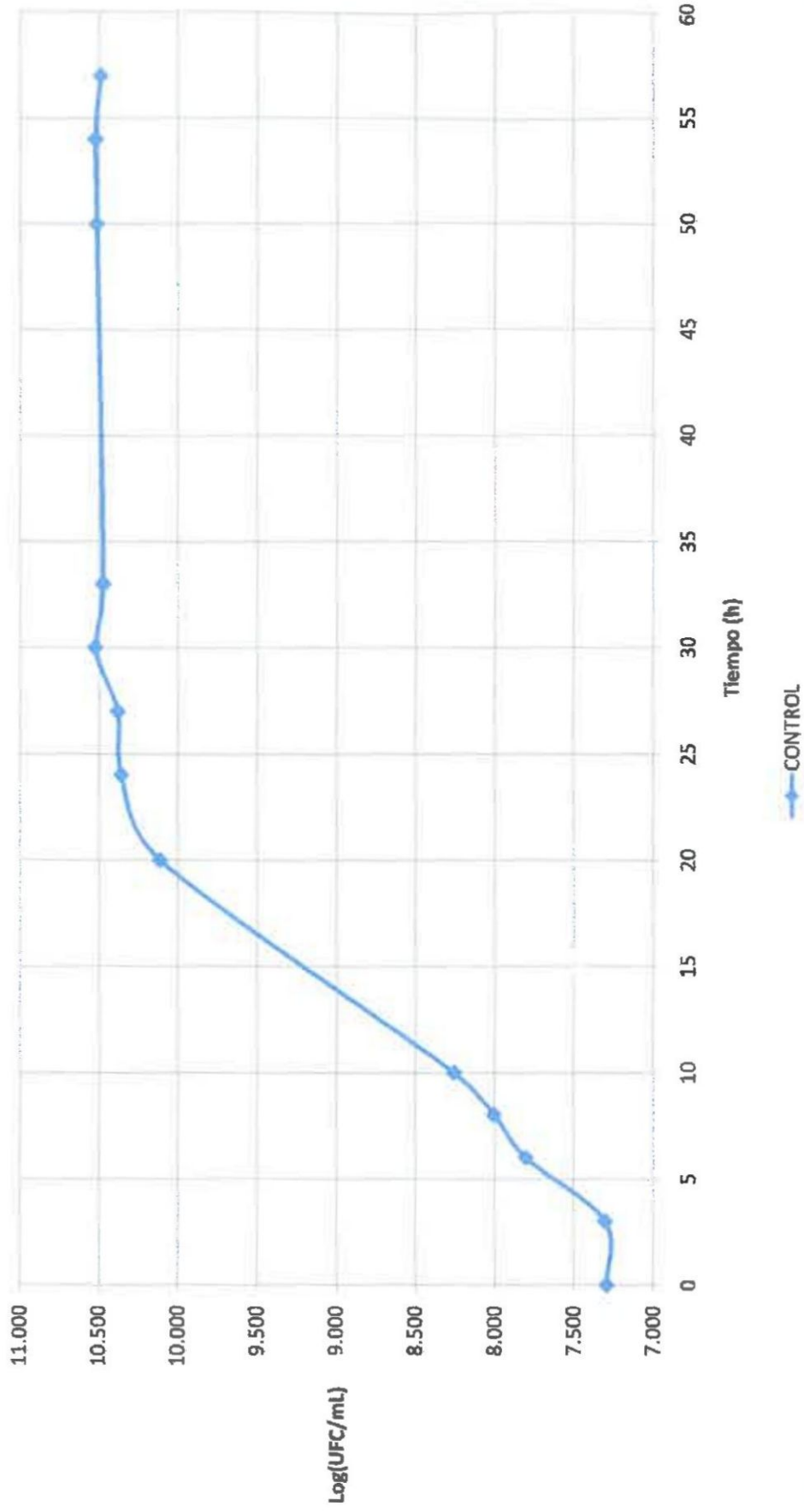
CURVA DE CRECIMIENTO DEL LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS EN HIDROLIZADO DE QUINUA



CURVA DE CRECIMIENTO DE LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS EN HIDROLIZADO DE CEBADA



CURVA DE CRECIMIENTO DE LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS EN CALDO MRS



ANEXO 5

TIEMPO DE LATENCIA

TIEMPO DE LATENCIA						
HIDROLIZADO	N	Media	Desv. tıp.	Mínimo	Máximo	Error tıp. de la media
Soya	3	5,0333	0,30089	4,72	5,32	0,17372
Quinoa	3	6,0867	0,28572	5,76	6,29	0,16496
Cebada	3	7,0167	0,20648	6,78	7,16	0,11921
Total	9	6,0456	0,89006	4,72	7,16	0,29669

ANOVA						
TIEMPO DE LATENCIA						
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.	
Inter-grupos	5,908	2	2,954	41,257	0,000	
Intra-grupos	0,430	6	0,072			
Total	6,338	8				

Comparaciones múltiples						
TIEMPO DE LATENCIA						
HSD de Tukey						
(I) HIDROLIZADO	(J) HIDROLIZADO	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
Soya	Quinoa	-1,05333	0,21848	0,007	-1,7237	-0,3830
	Cebada	-1,98333	0,21848	0,000	-2,6537	-1,3130
Quinoa	Soya	1,05333	0,21848	0,007	0,3830	1,7237
	Cebada	-0,93000	0,21848	0,013	-1,6004	-0,2596
Cebada	Soya	1,98333	0,21848	0,000	1,3130	2,6537
	Quinoa	0,93000	0,21848	0,013	0,2596	1,6004

*. La diferencia de medias es significativa al nivel 0.05.

TIEMPO DE LATENCIA				
HSD de Tukey ^a				
HIDROLIZADO	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
Soya	3	5,0333		
Quinoa	3		6,0867	
Cebada	3			7,0167
Sig.		1,000	1,000	1,000

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.
a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3.000.

ANEXO 6

VELOCIDAD MÁXIMA DE CRECIMIENTO

Informe						
VELOCIDAD MAX						
HIDROLIZADO	N	Media	Desv. típ.	Mínimo	Máximo	Error típ. de la media
Soya	3	0,4067	0,02517	0,38	0,43	0,01453
Quinoa	3	0,3767	0,01528	0,36	0,39	0,00882
Cebada	3	0,3333	0,01155	0,32	0,34	0,00667
Total	9	0,3722	0,03563	0,32	0,43	0,01188

ANOVA					
VELOCIDAD MAX					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	0,008	2	0,004	12,233	0,008
Intra-grupos	0,002	6	0,000		
Total	0,010	8			

Comparaciones múltiples						
VELOCIDAD MAX						
HSD de Tukey						
(I) HIDROLIZADO	(J) HIDROLIZADO	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
Soya	Quinoa	0,03000	0,01491	0,190	-0,0157	0,0757
	Cebada	0,07333	0,01491	0,006	0,0276	0,1191
Quinoa	Soya	-0,03000	0,01491	0,190	-0,0757	0,0157
	Cebada	0,04333	0,01491	0,061	-0,0024	0,0891
Cebada	Soya	-0,07333	0,01491	0,006	-0,1191	-0,0276
	Quinoa	-0,04333	0,01491	0,061	-0,0891	0,0024

*. La diferencia de medias es significativa al nivel 0.05.

VELOCIDAD MAX			
HSD de Tukey ^a			
HIDROLIZADO	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
Cebada	3	0,3333	
Quinoa	3	0,3767	0,3767
Soya	3		0,4067
Sig.		0,061	0,190

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.
a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3.000.

ANEXO 7

TIEMPO DE GENERACIÓN

Informe						
TIEMPO DE GENERACION						
HIDROLIZADO	N	Media	Desv. típ.	Mínimo	Máximo	Error típ. de la media
Soya	3	1,7167	0,12220	1,61	1,85	0,07055
Quinoa	3	1,8367	0,06658	1,78	1,91	0,03844
Cebada	3	2,0833	0,07572	2,03	2,17	0,04372
Total	9	1,8789	0,18024	1,61	2,17	0,06008

ANOVA					
TIEMPO DE GENERACION					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	0,210	2	0,105	12,531	0,007
Intra-grupos	0,050	6	0,008		
Total	0,260	8			

Comparaciones múltiples						
TIEMPO DE GENERACION						
HSD de Tukey						
(I) HIDROLIZADO	(J) HIDROLIZADO	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
Soya	Quinoa	-0,12000	0,07468	0,313	-0,3492	0,1092
	Cebada	-0,36667	0,07468	0,006	-0,5958	-0,1375
Quinoa	Soya	0,12000	0,07468	0,313	-0,1092	0,3492
	Cebada	-0,24667	0,07468	0,038	-0,4758	-0,0175
Cebada	Soya	0,36667	0,07468	0,006	0,1375	0,5958
	Quinoa	0,24667	0,07468	0,038	0,0175	0,4758

*. La diferencia de medias es significativa al nivel 0.05.

TIEMPO DE GENERACION			
HSD de Tukey ^a			
HIDROLIZADO	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
Soya	3	1,7167	
Quinoa	3	1,8367	
Cebada	3		2,0833
Sig.		0,313	1,000

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.
a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3.000.

ANEXO 8



TABLAS PERUANAS DE COMPOSICIÓN DE ALIMENTOS 2008

A - CEREALES Y DERIVADOS

Composición en 100 g de alimento

Código	Nombre del Alimento	Energía <EMER> <Calor C> kJ	Agua <WATE> g	Proteína <PROT> g	Grasa total <FAT> g	Carbohidratos total <CHOCDF> g	Carbohidratos disponibles <CHOAVL> g	Fibra dietaria <FIBD> g	Fibra total <FIBT> g	Cenizas <ASH> g	Calcio <CA> mg	Fósforo <P> mg	Zinc <ZN> mg	Hierro <FE> mg	Caroteno equivalente en unidades internacionales	Retinol equivalente en unidades internacionales	Vitamina A equivalente en unidades <VITA> mg	Tiamina <THA> mg	Riboflavina <RIBF> mg	Niacina <NIA> mg	Vitamina B-6 <VITB6> mg	Ácido ascórbico <ASC> mg	
A 51	Arroz blanco, cocido	147	11.0	2.5	0.2	80.2	79.8	0.4	0.4	0.3	0.5	0.3	0.2	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
A 52	Arroz blanco, cocido con leche	152	11.1	2.5	0.1	80.2	79.8	0.4	0.4	0.3	0.5	0.3	0.2	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
A 53	Arroz blanco, cocido con leche y azúcar	158	11.2	2.5	0.1	80.2	79.8	0.4	0.4	0.3	0.5	0.3	0.2	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
A 54	Arroz blanco, cocido con leche y azúcar, con sal	164	11.3	2.5	0.1	80.2	79.8	0.4	0.4	0.3	0.5	0.3	0.2	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
A 55	Arroz blanco, cocido con leche y azúcar, con sal y aceite	170	11.4	2.5	0.1	80.2	79.8	0.4	0.4	0.3	0.5	0.3	0.2	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
A 56	Arroz blanco, cocido con leche y azúcar, con sal y aceite, con sal	176	11.5	2.5	0.1	80.2	79.8	0.4	0.4	0.3	0.5	0.3	0.2	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
A 57	Arroz blanco, cocido con leche y azúcar, con sal y aceite, con sal y aceite	182	11.6	2.5	0.1	80.2	79.8	0.4	0.4	0.3	0.5	0.3	0.2	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
A 58	Arroz blanco, cocido con leche y azúcar, con sal y aceite, con sal y aceite, con sal y aceite	188	11.7	2.5	0.1	80.2	79.8	0.4	0.4	0.3	0.5	0.3	0.2	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
A 59	Arroz blanco, cocido con leche y azúcar, con sal y aceite, con sal y aceite, con sal y aceite, con sal y aceite	194	11.8	2.5	0.1	80.2	79.8	0.4	0.4	0.3	0.5	0.3	0.2	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
A 60	Arroz blanco, cocido con leche y azúcar, con sal y aceite, con sal y aceite, con sal y aceite, con sal y aceite, con sal y aceite	200	11.9	2.5	0.1	80.2	79.8	0.4	0.4	0.3	0.5	0.3	0.2	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
A 61	Arroz blanco, cocido con leche y azúcar, con sal y aceite, con sal y aceite, con sal y aceite, con sal y aceite, con sal y aceite, con sal y aceite	206	12.0	2.5	0.1	80.2	79.8	0.4	0.4	0.3	0.5	0.3	0.2	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
A 62	Arroz blanco, cocido con leche y azúcar, con sal y aceite, con sal y aceite, con sal y aceite, con sal y aceite, con sal y aceite, con sal y aceite, con sal y aceite	212	12.1	2.5	0.1	80.2	79.8	0.4	0.4	0.3	0.5	0.3	0.2	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
A 63	Arroz blanco, cocido con leche y azúcar, con sal y aceite, con sal y aceite, con sal y aceite, con sal y aceite, con sal y aceite, con sal y aceite, con sal y aceite, con sal y aceite	218	12.2	2.5	0.1	80.2	79.8	0.4	0.4	0.3	0.5	0.3	0.2	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
A 64	Arroz blanco, cocido con leche y azúcar, con sal y aceite, con sal y aceite, con sal y aceite, con sal y aceite, con sal y aceite, con sal y aceite, con sal y aceite, con sal y aceite, con sal y aceite	224	12.3	2.5	0.1	80.2	79.8	0.4	0.4	0.3	0.5	0.3	0.2	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
A 65	Arroz blanco, cocido con leche y azúcar, con sal y aceite, con sal y aceite, con sal y aceite, con sal y aceite, con sal y aceite, con sal y aceite, con sal y aceite, con sal y aceite, con sal y aceite, con sal y aceite	230	12.4	2.5	0.1	80.2	79.8	0.4	0.4	0.3	0.5	0.3	0.2	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
A 66	Arroz blanco, cocido con leche y azúcar, con sal y aceite, con sal y aceite, con sal y aceite, con sal y aceite, con sal y aceite, con sal y aceite, con sal y aceite, con sal y aceite, con sal y aceite, con sal y aceite, con sal y aceite	236	12.5	2.5	0.1	80.2	79.8	0.4	0.4	0.3	0.5	0.3	0.2	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
A 67	Arroz blanco, cocido con leche y azúcar, con sal y aceite, con sal y aceite, con sal y aceite, con sal y aceite, con sal y aceite, con sal y aceite, con sal y aceite, con sal y aceite, con sal y aceite, con sal y aceite, con sal y aceite, con sal y aceite	242	12.6	2.5	0.1	80.2	79.8	0.4	0.4	0.3	0.5	0.3	0.2	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
A 68	Arroz blanco, cocido con leche y azúcar, con sal y aceite, con sal y aceite, con sal y aceite, con sal y aceite, con sal y aceite, con sal y aceite, con sal y aceite, con sal y aceite, con sal y aceite, con sal y aceite, con sal y aceite, con sal y aceite, con sal y aceite	248	12.7	2.5	0.1	80.2	79.8	0.4	0.4	0.3	0.5	0.3	0.2	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
A 69	Arroz blanco, cocido con leche y azúcar, con sal y aceite, con sal y aceite, con sal y aceite, con sal y aceite, con sal y aceite, con sal y aceite, con sal y aceite, con sal y aceite, con sal y aceite, con sal y aceite, con sal y aceite, con sal y aceite, con sal y aceite, con sal y aceite	254	12.8	2.5	0.1	80.2	79.8	0.4	0.4	0.3	0.5	0.3	0.2	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
A 70	Arroz blanco, cocido con leche y azúcar, con sal y aceite, con sal y aceite, con sal y aceite, con sal y aceite, con sal y aceite, con sal y aceite, con sal y aceite, con sal y aceite, con sal y aceite, con sal y aceite, con sal y aceite, con sal y aceite, con sal y aceite, con sal y aceite, con sal y aceite	260	12.9	2.5	0.1	80.2	79.8	0.4	0.4	0.3	0.5	0.3	0.2	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
A 71	Arroz blanco, cocido con leche y azúcar, con sal y aceite, con sal y aceite, con sal y aceite, con sal y aceite, con sal y aceite, con sal y aceite, con sal y aceite, con sal y aceite, con sal y aceite, con sal y aceite, con sal y aceite, con sal y aceite, con sal y aceite, con sal y aceite, con sal y aceite, con sal y aceite	266	13.0	2.5	0.1	80.2	79.8	0.4	0.4	0.3	0.5	0.3	0.2	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
A 72	Arroz blanco, cocido con leche y azúcar, con sal y aceite, con sal y aceite, con sal y aceite, con sal y aceite, con sal y aceite, con sal y aceite, con sal y aceite, con sal y aceite, con sal y aceite, con sal y aceite, con sal y aceite, con sal y aceite, con sal y aceite, con sal y aceite, con sal y aceite, con sal y aceite, con sal y aceite	272	13.1	2.5	0.1	80.2	79.8	0.4	0.4	0.3	0.5	0.3	0.2	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
A 73	Arroz blanco, cocido con leche y azúcar, con sal y aceite, con sal y aceite, con sal y aceite, con sal y aceite, con sal y aceite, con sal y aceite, con sal y aceite, con sal y aceite, con sal y aceite, con sal y aceite, con sal y aceite, con sal y aceite, con sal y aceite, con sal y aceite, con sal y aceite, con sal y aceite, con sal y aceite, con sal y aceite	278	13.2	2.5	0.1	80.2	79.8	0.4	0.4	0.3	0.5	0.3	0.2	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

ANEXO 9



TABLAS PERUANAS DE COMPOSICIÓN DE ALIMENTOS 2008

H - BEBIDAS (ALCOHÓLICAS Y ALCALICÓNICAS):

Composición en 100 g de alimento

CÓDIGO	Nombre del Alimento	Energía <EMER> <KJ>	Energía <EMER> <KJ>	Agua <WATE> <g>	Proteínas <PROT> <g>	Grasa <FAT> <g>	Carbohidratos <CHOSEF> <g>	Carbohidratos disponibles <CHOAVL>	Fibra total <FBT>	Fibra dietaria <FBT>	Cenizas <ASH>	Calcio <CAL>	Fósforo <P>	Zinc <ZIN>	Hierro <FE>	β caroteno total	Retinol PE	Vitaminas A equivalentes <VITAS>	Tiamina <TMA>	Riboflavina <RFB>	Niacina <NIA>	Vitaminas C<VITC>	Asc T	CÓDIGO
H 1	Cerveza	33	151	94.2	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1	0.0	0.0	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	H 1
H 2	Cerveza 350 ml	54	258	94.2	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1	0.0	0.0	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	H 2
H 3	Cerveza 330 ml	24	100	94.2	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1	0.0	0.0	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	H 3
H 4	Cerveza 350 ml	25	117	94.2	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1	0.0	0.0	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	H 4
H 5	Cerveza 350 ml	30	142	94.2	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1	0.0	0.0	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	H 5
H 6	Cerveza 350 ml	27	128	94.2	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1	0.0	0.0	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	H 6
H 7	Cerveza 350 ml	41	174	94.2	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1	0.0	0.0	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	H 7
H 8	Cerveza 350 ml	37	165	94.2	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1	0.0	0.0	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	H 8
H 9	Cerveza 350 ml	38	168	94.2	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1	0.0	0.0	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	H 9
H 10	Cerveza 350 ml	41	174	94.2	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1	0.0	0.0	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	H 10
H 11	Cerveza 350 ml	35	158	94.2	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1	0.0	0.0	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	H 11
H 12	Cerveza 350 ml	35	158	94.2	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1	0.0	0.0	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	H 12
H 13	Cerveza 350 ml	41	174	94.2	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1	0.0	0.0	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	H 13
H 14	Cerveza 350 ml	41	174	94.2	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1	0.0	0.0	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	H 14
H 15	Cerveza 350 ml	33	153	94.2	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1	0.0	0.0	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	H 15



PERU
Ministerio de Salud
Ministerio Nacional de Salud

TABLAS PERUANAS DE COMPOSICION DE ALIMENTOS 2008

T - LEGUMINOSAS Y DERIVADOS

Composición en 100 g de alimento

Código	Nombre del Alimento	Energía <EMER> Cal	Energía <EMER> Cal Lq	Agua <WATE> No S	Proteína <PPROC> No S	Grasa total <FAT> No S	Carbohidrato disponible <CARBODF> No S	Fibra dietaria <FBDF> g	Fibra dietaria <FBDF> g	Almidón <AMID> g	Cáscara <CA> mg	Fécula <FEC> mg	Zona <ZM> mg	Núcleo <NUE> mg	Caroteno <CARO> mg	Almidón <AMID> mg	Yazminas A equivalentes <WTA> mg	Yazminas A <WTA> mg	Tiendas <THA> mg	Riboflavina <RIBF> mg	Miela <MIA> mg	Vitamina C <VITC> mg	Age T mg	Códig
T 21	Frijol	344	344	11	23	14	28	1	1	32	3	32	12	13	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
T 22	Frijol	344	344	11	23	14	28	1	1	32	3	32	12	13	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
T 23	Frijol	344	344	11	23	14	28	1	1	32	3	32	12	13	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
T 24	Frijol	344	344	11	23	14	28	1	1	32	3	32	12	13	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
T 25	Frijol	344	344	11	23	14	28	1	1	32	3	32	12	13	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
T 26	Frijol	344	344	11	23	14	28	1	1	32	3	32	12	13	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
T 27	Frijol	344	344	11	23	14	28	1	1	32	3	32	12	13	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
T 28	Frijol	344	344	11	23	14	28	1	1	32	3	32	12	13	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
T 29	Frijol	344	344	11	23	14	28	1	1	32	3	32	12	13	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
T 30	Frijol	344	344	11	23	14	28	1	1	32	3	32	12	13	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
T 31	Frijol	344	344	11	23	14	28	1	1	32	3	32	12	13	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
T 32	Frijol	344	344	11	23	14	28	1	1	32	3	32	12	13	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
T 33	Frijol	344	344	11	23	14	28	1	1	32	3	32	12	13	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
T 34	Frijol	344	344	11	23	14	28	1	1	32	3	32	12	13	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
T 35	Frijol	344	344	11	23	14	28	1	1	32	3	32	12	13	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
T 36	Frijol	344	344	11	23	14	28	1	1	32	3	32	12	13	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
T 37	Frijol	344	344	11	23	14	28	1	1	32	3	32	12	13	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
T 38	Frijol	344	344	11	23	14	28	1	1	32	3	32	12	13	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
T 39	Frijol	344	344	11	23	14	28	1	1	32	3	32	12	13	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
T 40	Frijol	344	344	11	23	14	28	1	1	32	3	32	12	13	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
T 41	Frijol	344	344	11	23	14	28	1	1	32	3	32	12	13	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
T 42	Frijol	344	344	11	23	14	28	1	1	32	3	32	12	13	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
T 43	Frijol	344	344	11	23	14	28	1	1	32	3	32	12	13	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
T 44	Frijol	344	344	11	23	14	28	1	1	32	3	32	12	13	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
T 45	Frijol	344	344	11	23	14	28	1	1	32	3	32	12	13	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
T 46	Frijol	344	344	11	23	14	28	1	1	32	3	32	12	13	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
T 47	Frijol	344	344	11	23	14	28	1	1	32	3	32	12	13	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
T 48	Frijol	344	344	11	23	14	28	1	1	32	3	32	12	13	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
T 49	Frijol	344	344	11	23	14	28	1	1	32	3	32	12	13	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
T 50	Frijol	344	344	11	23	14	28	1	1	32	3	32	12	13	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
T 51	Frijol	344	344	11	23	14	28	1	1	32	3	32	12	13	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
T 52	Frijol	344	344	11	23	14	28	1	1	32	3	32	12	13	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
T 53	Frijol	344	344	11	23	14	28	1	1	32	3	32	12	13	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

ANEXO 11

DETERMINACIÓN DE COMPUTO QUIMICO PARA HIDROLIZADO DE SOJA, QUINUA Y CEBADA

COMPUTO QUIMICO DE LA MEZCLA														
CODIGO	ALIMENTO	Proteinas	Factor	Proteinas	Ue	Leu	Us	A4Z	A4R	T7e	T7o	T7c	Vol	H/s
1	Hidrolizado de SOJA	42.373	6.23	264.079	335.5	-33.33	330	352.55	330	237	55.33	430.233	320	159
2	Hidrolizado de QUINUA	16.123	6.23	100.649	325	375	350	123	431	219	65	245.525	181	120
3	Hidrolizado de CEBADA	6.6573	6.23	41.284	334	417	316	346	313	207	93	133.33	111	131

Ue = Unidades de Urea Nitrogeno

Leu = Litros de Urea Nitrogeno

MEZCLA DE ALIMENTOS

ALIMENTO	% Mezcla	Proteinas	Factor	Proteinas	Ue	Leu	Us	A4Z	A4R	T7e	T7o	T7c	Vol	H/s
Hidrolizado de SOJA	30%	42.373	6.23	264.079	335.5	-33.33	330	352.55	330	237	55.33	430.233	320	159
Hidrolizado de QUINUA	30%	16.123	6.23	100.649	325	375	350	123	431	219	65	245.525	181	120
Hidrolizado de CEBADA	30%	6.6573	6.23	41.284	334	417	316	346	313	207	93	133.33	111	131
TOTAL	100%	16.65626	6.23	412.012	334.4	417.0	316.0	346.0	313.0	207.0	93.0	133.33	111.0	131.0

Mezcla de Proteina Mezcla

Me	Leu	Us	A4Z	A4R	T7e	T7o	T7c	Vol	H/s
Lactantes	45	66	42	72	49	17	53	53	26
Resultado	55.0%	75.5%	70.0%	113.0%	85.7%	82.1%	85.5%	85.5%	81.9%

NO CUMPLE con el computo quimico

Me	Leu	Us	A4Z	A4R	T7e	T7o	T7c	Vol	H/s
Proteinas 23	28	66	25	63	34	11	35	35	19
Resultado	127.7%	107.0%	117.7%	123.1%	113.4%	126.3%	140.4%	140.4%	127.1%

SI CUMPLE con el computo quimico

Me	Leu	Us	A4Z	A4R	T7e	T7o	T7c	Vol	H/s
Promedio	37	80	34	65	39	14	43	43	23
Resultado	119.3%	55.3%	89.5%	113.5%	86.9%	55.7%	105.4%	105.4%	105.0%

SI CUMPLE con el computo quimico

3M™ Petrifilm™. Placas para Recuento de Aerobios

Para información detallada acerca de PRECAUCIONES, GARANTÍAS, LIMITACIÓN DE LA RESPONSABILIDAD DE 3M, ALMACENAMIENTO Y ELIMINACIÓN, así como INSTRUCCIONES DE USO ver folleto de producto en las cajas.

Instrucciones
de uso



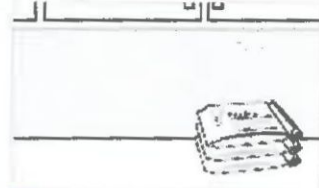
Almacenamiento



1 Refrigerar las bolsas originales sin abrir de las placas Petrifilm. Usar antes de la fecha de caducidad impresa en la bolsa o empaque.



2 Abrir las bolsas con unas tijeras o cutter por el lado que aparece indicado. Retirar de la bolsa únicamente las placas que vayan a usarse. Volver a cerrar la bolsa doblando el lado abierto y asegurando el cierre con una pinza o cinta adhesiva.



3 Mantener las bolsas que se han abierto y vuelto a cerrar a $\approx 21^{\circ}\text{C}$ ($\approx 70^{\circ}\text{F}$). No refrigerar las bolsas que han sido abiertas. En este caso, usar las placas Petrifilm no más tarde de 1 mes desde su apertura.

Preparación de Muestra



4 Preparar una dilución de la muestra de alimento, fango o suero. Pasar o presionar la muestra en una bolsa Rinsolán, bolsa Steri-mixer, botella de dilución o cualquier otro recipiente estéril apropiado.

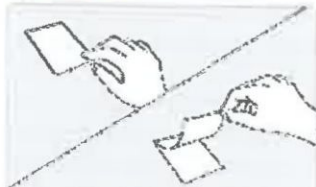


5 Añadir el diluyente apropiado. Usar diluyentes estándar tales como tampón fosfato, agua de peptona, tampón de Butterfield, solución Ringer, papaína-sal, agua destilada y otros. No usar tampones que contengan citrato de sodio o tiosulfato.



6 Mezclar u homogeneizar la muestra mediante los métodos usuales.

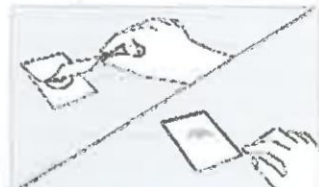
Siembra



7 Disponer la placa Petrifilm en una superficie plana. Levantar el film superior.

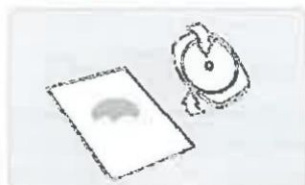


8 Pipetear 1 ml de muestra al centro aproximadamente del film inferior. Mantener la pipeta en posición vertical. No tocar al film inferior mientras se pipetea.



9 Sellar el film superior y dejarlo caer. No deslizar el film hasta el final.

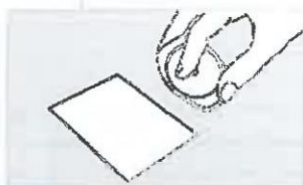
Siembra



10 Colocar el aplicador en el film superior bien centrado sobre el inóculo. Usar el aplicador con la cara rebajada hacia abajo (para las caras hacia arriba).



11 Aplicar presión de manera suave sobre el aplicador para distribuir el inóculo por toda la zona circular. No mover ni girar el aplicador.



12 Levantar el aplicador. Esperar 1 minuto para que se solidifique el gel.

Incubación



13 Incubar las placas Petrifilm para arriba y apiladas en grupos de no más de 20 placas. Incubar a 30 +/- 1°C durante 72 +/- 2 horas para cualquier tipo de alimento. Consultar otras condiciones particulares de incubación.

Interpretación



14 Leer las placas. Usar un lector de placas 3M™ Petrifilm™ contador de colonias estándar. Quebrar u otros. No usar luz de fondo para la lectura de esta placa. Usar luz directa. Consultar la Guía de Interpretación para leer los resultados.

Comentarios Adicionales

- Los pasos 9 y 10 son específicos de las placas Petrifilm para recuento de aerobios.
- Nota: Sembrando inmediatamente poner el aplicador con cada placa antes de sembrar la siguiente placa.

3M

3M España, S.A.
3M Seguridad Alimentaria
C/ Juan, Grao de Luca de Tena, 19-25
28027 Madrid
www.3M.com/microbiology

Llamada gratuita
900 210 584
3M Centro de Información al Cliente

Por favor recicle. Impreso en España
©3M 2009. Todos los derechos reservados. Ref. 1354-101-EU

3M y Petrifilm son marcas registradas de 3M

ANEXO 13

3M™ Petrifilm™

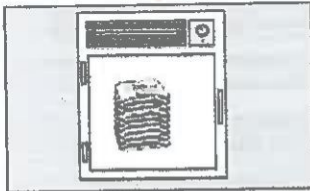
Placas para Recuento de Coliformes

Para Advertencias, Precauciones, Responsabilidad del Usuario, Garantía Limitada, Almacenamiento y Eliminación, e Instrucciones de Uso, ver el folleto del producto.

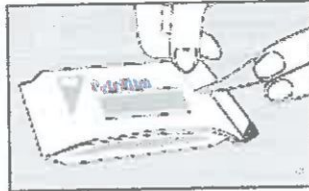
Instrucciones
de uso



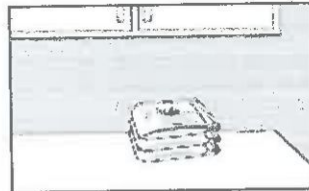
Almacenamiento



1 Conservar las bolsas cerradas a $< 8^{\circ}\text{C}$. Usar antes de la fecha de caducidad impresa en la bolsa. En zonas con alta humedad donde puede haber condensación, es mejor dejar que las bolsas alcancen la temperatura ambiente antes de abrirlas.



2 Para cerrar las bolsas que se están utilizando, doblar los extremos y cerrarlos con celo.

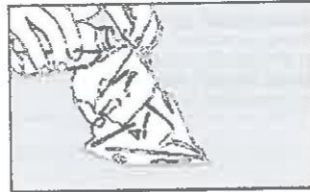


3 Mantener las bolsas una vez cerradas a $< 25^{\circ}\text{C}$, a HR $< 50\%$. No refrigerar las bolsas abiertas. Usar las placas Petrifilm en un mes desde su apertura.

Preparación de la muestra

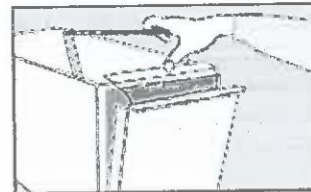


4 Pesar o pipetear el producto alimenticio en un contenedor estéril adecuado, como una bolsa tipo Stomacher, frasco de dilución, bolsa Whirl-Pak®, o cualquier otro contenedor estéril.



5 Si es necesario, utilizar diluyentes estériles apropiados: agua peptonada sal (método ISO 6887) (Diluyente de Máxima Recuperación), tampón fosfato de Butterfield (tampón fosfato IDF, KH_2PO_4 , a 0.0425g/l), ajustar pH a 7.2), agua peptonada al 0.1%, agua peptonada tamponada (método ISO 6579), solución salina (0.85 - 0.90%), caldo letheen sin bisulfito, o agua destilada.

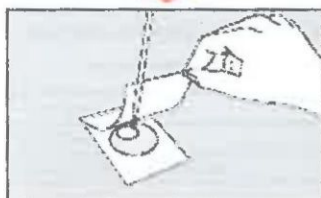
No usar tampones que contengan citrato, bisulfito o bisulfato, ya que pueden inhibir el crecimiento.



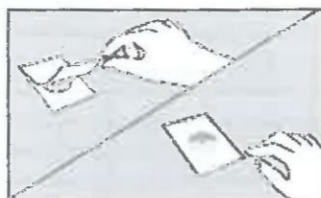
6 Mezclar u homogeneizar la muestra según el procedimiento habitual.

Ajustar el pH de la muestra diluida entre 6.6 y 7.2:
• para productos ácidos, usar NaOH 1N.
• para productos alcalinos, usar HCl 1N.

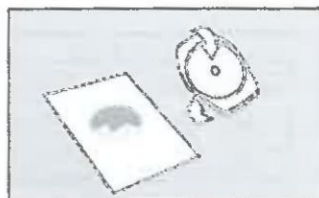
Inoculación



- 7 Colocar la placa Petrifilm en una superficie plana. Levantar el film superior. Con una pipeta colocada de forma perpendicular a la placa Petrifilm, colocar 1 ml. de la muestra en el centro del film inferior.

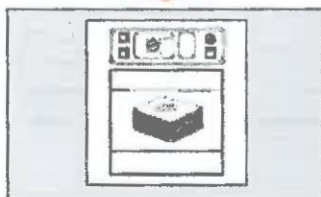


- 8 Bajar el film superior con cuidado evitando introducir burbujas de aire. No dejarlo caer.



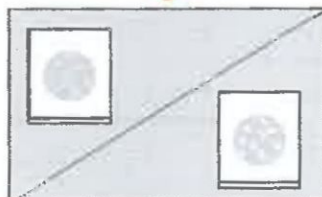
- 9 Con la cara lisa hacia abajo, colocar el aplicador en el film superior sobre el inoculo. Con cuidado, ejercer una presión sobre el aplicador para repartir el inoculo sobre el área circular antes de que se forme el gel. No girar ni doblar el aplicador. Levantar el aplicador. Esperar al menos un minuto a que solidifique el gel.

Incubación



- 10 Incubar las placas para arriba en pilas de hasta 20 placas. El tiempo e incubación varía según el método.

Interpretación



- 11 Las placas Petrifilm pueden leerse con un contador de colonias standard u otra lente de aumento iluminada. Para leer los resultados, consultar la Guía de Interpretación.



- 12 Las colonias pueden aislarse para una posterior identificación. Levantar el film superior y seleccionar la colonia del gel.

Métodos aprobados más usuales:

Coliformos totales

• Métodos Oficiales 986.33 y 989.10 (leche, leche cruda, otros productos lácteos):

Incubar 24h ± 2h a 32°C ± 1°C.

• Método Oficial AOAC 991.14 (todos los alimentos): Incubar 24h ± 2h a 35°C ± 1°C.

• Método NMKL 147.1993:

Incubar 24h ± 2h a 37°C ± 1°C.

• Métodos validados AFNOR 9M 01/2-09/89A y B:

Incubar 24h ± 2h a 30°C ± 1°C.

Coliformos termotolerantes (fecales)

• Método validado AFNOR

9M 01/2-09/89C:

Incubar 24h ± 2h a 44°C ± 1°C.

Para esta alta temperatura, es necesario una humidificación del incubador.

ANEXO 14

NTS N° 071 - MINSADIGESA-V.01
NORMA SANITARIA QUE ESTABLECE LOS CRITERIOS MICROBIOLÓGICOS DE CALIDAD SANITARIA E INOCUIDAD PARA LOS ALIMENTOS Y BEBIDAS DE CONSUMO HUMANO

XV.2 Alimentos preparados con tratamiento térmico (ensaladas cocidas, guisos, arroces, postros cocidos, arroz con leche, mazamorra, otros)

Agente microbiano	Categoría	Clase	n	c	Límite por g ó ml	
					m	M
Aerobios mesófilos	2	3	5	2	10 ⁴	10 ⁵
Coliformes	5	3	5	2	10	10 ²
<i>Staphylococcus aureus</i>	8	3	5	1	10	10 ²
<i>Escherichia coli</i>	6	3	5	1	< 3	—
<i>Salmonella</i> sp.	10	2	5	0	Ausencia /25 g	—

XVI. BEBIDAS.

XVI.1 Bebidas carbonatadas

Agente microbiano	Categoría	Clase	n	c	Límite por 100 ml	
					m	M
Aerobios mesófilos (*)	2	3	5	2	10	10 ²
Mohos	2	3	5	2	5	10
Levaduras	2	3	5	2	10	10 ²

(*) Para bebidas carbonatadas con menos de 3 atmósferas de CO₂. En caso de no poder determinar se realizará el análisis.

XVI.2 Bebidas no carbonatadas.

Agente microbiano	Categoría	Clase	n	c	Límite por ml	
					m	M
Aerobios mesófilos	2	3	5	2	10	10 ²
Mohos	2	3	5	2	1	10
Levaduras	2	3	5	0	1	10
Coliformes	5	2	5	0	< 3	—

XVI.3 Aguas embotelladas carbonatadas (*) y no carbonatadas.

Agente microbiano	Categoría	Clase	n	c	Límite por ml	
					m	M
Bacterias heterófilas	2	3	5	2	10	100
Coliformes	5	2	5	0	< 1, / 100 ml	—
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10	2	5	0	Ausencia /100 ml	—

(*) Los análisis se efectúan sus pe a e caso de aeración con CM + 3.5

XVI.4 Agua y hielo para consumo humano.

Agente microbiano	Unidad de medida	Límite máximo permisible
Bacterias coliformes (termotolerantes & <i>Escherichia coli</i>)	UFC / 100 mL a 44-5°C	0 (*)
Bacterias heterófilas	UFC / ml a 35 °C	500
Huevos de nematodos	N° / 100 ml	0

(*) En caso de analizar por el método de NMP a + 22 - 25°C.

XVII. ESTIMULANTES Y FRUITIVOS.

XVII.1 Café (*) y sucedáneos de café

Agente microbiano	Categoría	Clase	n	c	Límite por g	
					m	M
Mohos	2	3	5	1	10	10 ²
<i>Trichoderma reesei</i> (**)	8	3	5	1	10	10

(*) No incluye el café verde (café natural).

(**) Para sucedáneos de café.

XVII.2 Hierbas de uso alimentario para infusiones (ta, mate, manzanilla, boldo, otros).



MINSADIGESA



DIGESA

ANEXO 15

CURVAS DE CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS EN HIDROLIZADOS DE SOYA, QUINUA Y CEBADA RESPECTIVAMENTE

