

UNIVERSIDAD DE OVIEDO

MASTER UNIVERSITARIO EN BIOTECNOLOGÍA

ALIMENTARIA

**“PREPARACIÓN DE YOGUR ENRIQUECIDO
EN ÁCIDO LACTOBÍONICO COMO
PREBIÓTICO”**

TRABAJO FIN DE MASTER

POR

LUCÍA BAUTISTA RUBIERA

JULIO, 2017





Master en Biotecnología Alimentaria
Universidad de Oviedo
C/Julián Clavería s/n. 33071 Oviedo. España
Tel. 985106226. Fax 985103434. <http://www.unioviedo.es/MBTA>



PROFESOR TUTOR:

Dr. D. Manuel Rendueles de la Vega (Universidad de Oviedo)

D. Cristina García Pérez (Universidad de Oviedo)

CERTIFICA:

Que D. **Lucía Bautista Rubiera** ha realizado bajo mi dirección el Trabajo Fin de Máster al que corresponde la presente memoria en el contexto de los estudios del Máster Universitario en Biotecnología Alimentaria, 11ª promoción curso 2016-2017.

Oviedo, de 14 de julio del 2017

Dr. D. Manuel Rendueles de la Vega (Universidad de Oviedo)

D. Cristina García Pérez (Universidad de Oviedo)

VºBº

Manuel Rendueles de la Vega

Coordinador del Máster en Biotecnología Alimentaria

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar me gustaría expresar mi gratitud a mis tutores comenzando por Manuel Rendueles, por el apoyo que he recibido desde el primer momento para elaborar este trabajo. Por sus ánimos, su paciencia y su rápida y continua disposición a la hora de requerir su consejo y orientación. Muchas gracias, de verdad.

A Cristina García Pérez por su inagotable trabajo y dedicación, y por su facilidad para enseñarme todos sus conocimientos sobre el proyecto y el propio laboratorio. Por sus ánimos y por su eterna paciencia mostrada hacia mí. Gracias de corazón.

A Amanda Laca Pérez por su tiempo, enseñanzas, dedicación y maestría en el laboratorio.

También a Sara, por darme, junto con Cris, la confianza necesaria para comenzar esta nueva etapa en la investigación.

A mis compañeros de máster, en especial a mis chicas. Me encantó conocerlos y que hayáis formado parte de esto.

Por supuesto, a Loren. Por aguantar los buenos momentos pero sobre todo, por aguantar los malos. Por ser mi apoyo incondicional y animarme a que me decidiera por este proyecto.

A mis amigas de siempre, que pase lo que pase nunca fallan. Tania, Carlota, Yenel, Carolina y Elena.

Y, cómo no, a mi familia. Mi hermano, que aunque por el año le haya tenido lejos, para mí siempre está muy presente. Estoy muy orgullosa de ti, Mario. Y mis padres, que gracias a ellos, a su esfuerzo y su perseverancia, estoy aquí escribiendo estas líneas.

A TODOS ELLOS, GRACIAS.

INDICE

- Resumen	6
- Abstract	7
- Lista de figuras	8
- Lista de tablas	13
- Introducción	15
- Consideraciones teóricas	19
1. Leche fermentada	20
1.1 Yogur	20
2. Alimentos funcionales	22
2.1 Probióticos	22
2.1.1 <i>Lactobacillus casei</i>	23
2.2 Prebióticos	23
2.2.1 Ácido lactobiónico	24
2.2.1.1 <i>Pseudomonas taetrolens</i>	25
2.2.1.2 Situación actual del ácido lactobiónico	26
2.3 Simbiosis	26
3. Texturizantes	27
3.1 Carragenato	28
4. Métodos de operación	29
4.1 Biorreactor discontinuo	29
4.2 Cromatografía líquida de alta eficacia	30
4.3 Reómetro	33
4.4 Texturómetro	34
- Material y métodos	37
1. Microorganismos	38
1.1 <i>Lactobacillus Casei</i> CECT 475	38
1.2 <i>Pseudomonas taetrolens</i> LMG 2336	38
2. Medio de cultivo: Leche desnatada	38
3. Fermentación secuencial a nivel de agitador orbital de <i>P. taetrolens</i> y <i>L. casei</i>	39
3.1 Preparación del inóculo de <i>P. taetrolens</i>	39

3.1.1	Preinóculo	39
3.1.2	Preparación del medio de la fermentación	39
3.1.3	Preparación del inóculo	39
3.2	Fermentación de <i>L. casei</i>	40
3.2.1	Preinóculo	40
3.2.2	Preparación del medio de la fermentación	40
3.2.3	Preparación del inóculo	40
3.3	Fermentaciones llevadas a cabo a nivel de agitador orbital	40
4.	Fermentación secuencial de <i>P. taetrolens</i> y <i>L. casei</i> en biorreactor	42
4.1	Fermentaciones llevadas a cabo en biorreactor	44
5.	Otras pruebas	44
6.	Toma de muestra y métodos analíticos	46
6.1	pH	46
6.2	Siembra en placas	46
6.3	Cromatografía HPLC	47
6.4	Reología	48
6.5	Análisis textural	48
-	Resultados	50
1.	Fermentación de <i>P. taetrolens</i> en cultivo puro a nivel de agitador orbital y de biorreactor	51
2.	Fermentaciones secuenciales	54
2.1	pH	54
2.2	Unidades formadoras de colonias	56
2.3	Lactosa, ácido lactobiónico y ácido láctico	60
3.	Caracterización del producto	63
3.1	Caracterización textural	63
3.2	Sinéresis	65
3.3	Proteína	66
4.	Ensayos de aditivación	67
5.	Tabla resumen de los productos finales	72
-	Conclusiones	74
-	Bibliografía	76

RESUMEN

La evolución de la demanda del consumidor hacia alimentos cada vez más saludables provoca que una de las ramas clave de investigación en la industria alimentaria sean los alimentos funcionales. El descubrimiento del ácido lactobiónico como prebiótico, entre muchas otras propiedades, hace que su incorporación en alimentos suscite un gran interés.

Por tanto, en el presente trabajo se estudia la producción de un yogur compuesto por *Lactobacillus casei* como probiótico y enriquecido en ácido lactobiónico, es decir, un alimento simbiótico. Para la síntesis del prebiótico se empleó *Pseudomonas taetrolens* al ser una bacteria no patógena y silvestre y que presenta un alto rendimiento de producción de ácido lactobiónico utilizando lactosa como sustrato.

En estudios previos realizados con cultivo mixto de *P. taetrolens* y *L. casei* no se obtuvieron resultados positivos debido a su relación de amensalismo. Por ello, en este trabajo se lleva a cabo la fermentación secuencial, realizando en una primera etapa la fermentación con *P. taetrolens* para producir ácido lactobiónico y seguida la fermentación con *L. casei* para producir ácido láctico y por tanto tener el producto lácteo final.

Los resultados que se obtuvieron en este caso muestran que la fermentación secuencial de ambas bacterias es posible tanto a nivel de agitador orbital como a nivel de biorreactor, no viéndose afectado el crecimiento del *L. casei* en presencia de ácido lactobiónico. El grado de firmeza de la cuajada final obtenida de las fermentaciones secuenciales es baja por lo que se procedió a la utilización de carragenato como agente texturizante.

ABSTRACT

The evolution of consumer's request for healthier food, has made functional food one of the key branches of development in food technology. The discovery of the lactobionic acid as a prebiotic, among many other characteristics, draws great interest on its incorporation in food.

Accordingly, the production of a yoghurt produced by *Lactobacillus casei* as a probiotic enriched in lactobionic acid as prebiotic – that is to say, a synbiotic product- has been studied in this final thesis master work. *Pseudomonas taetrolens* were used for the prebiotic synthesis, being a non-pathogenic, wild bacteria which presents a high performing production of lactobionic acid using lactose as a substrate.

In previous research carried out with mixed *P. taetrolens* and *L. casei* culture, no positive results were obtained due to its amensalism association. Therefore, sequential fermentation was put into practice in this work, performing fermentation by *P. taetrolens* to produce lactobionic acid in a first phase and following a fermentation by *L. casei* as second step to produce lactic acid and hence to obtain the final dairy product.

Results achieved in this case prove that sequential fermentation is possible in either of the two bacteria, applied at orbital shakers level, as much as in bioreactor level, not being the *L. casei* growth affected by the presence of the lactobionic acid. The firmness of the final curd obtained by sequential fermentation resulted low, due to which a carrageenan was used as a texturizing agent.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Mercado de probióticos en la Unión Europea clasificado por productos desde el 2014 con perspectivas para el 2024, en millones de dólares.	17
Figura 2.	Diagrama de flujo del yogur.	21
Figura 3.	Biorreactor Batch.	30
Figura 4.	Cromatograma.	31
Figura 5.	Componentes del equipo HPLC.	32
Figura 6.	Reograma, gráfica que muestra la tendencia típica de cada tipo de fluido cuando se representa la viscosidad aparente frente la velocidad cortante.	33
Figura 7.	Reómetro.	34
Figura 8.	Perfil de la curva obtenida con el analizador de textura.	36
Figura 9.	Información nutricional de la leche desnatada empleada como medio de cultivo durante el proyecto.	38
Figura 10.	Diagrama de flujo de la fermentación secuencial en la que se adiciona 0,1% de carragenato previo a la esterilización (A) y a posteriori (B).	41
Figura 11.	Diagrama de flujo de la fermentación con CaCl_2 en agitador orbital a nivel de botella.	42
Figura 12.	Diagrama de flujo de la fermentación con CaCl_2 en agitador orbital a nivel de matraz.	42
Figura 13.	BioFlo 110.	43
Figura 14.	Diagrama de flujo de la fermentación secuencial en biorreactor.	44
Figura 15.	HPLC Agilent, 1200 series.	47
Figura 16.	Reómetro Haake Mars II.	48
Figura 17.	Placa de titanio superior del reómetro.	48
Figura 18.	Sonda P/0.5 S.	49
Figura 19.	Analizador TA.XTplus, Stable Micro System.	49
Figura 20.	Evolución del pH (gráfica superior) y de las unidades	51

	formadoras de colonia (gráfica inferior) en la fermentación de <i>P. taetrolens</i> puro a nivel de agitador orbital y de biorreactor.	
Figura 21.	Evolución de la concentración de lactosa como sustrato de la producción de ácido lactobiónico en cultivo puro de <i>P. taetrolens</i> a nivel de agitador orbital y de biorreactor.	52
Figura 22.	Evolución de la producción del ácido lactobiónico en la fermentación pura de <i>P. taetrolens</i> a nivel de agitador orbital y de biorreactor.	52
Figura 23.	Fórmula de la productividad de ácido lactobiónico.	53
Figura 24.	Fórmula del rendimiento sobre sustrato.	53
Figura 25.	Evolución del pH en las diferentes fermentación secuenciales llevadas a cabo nivel de agitador orbital. La gráfica de la izquierda, denominada “Etapa 1”, representa la fase de la fermentación secuencial realizada por <i>P. taetrolens</i> . La de la derecha, “Etapa 2”, muestra la fase en la que se inocula <i>L. casei</i> , posteriormente a la esterilización del medio de cultivo con la consecuente eliminación de <i>P. taetrolens</i> .	54
Figura 26.	Evolución del pH en fermentación pura de <i>L. casei</i> en agitador orbital.	55
Figura 27.	Evolución del pH en las diferentes fermentación secuenciales llevadas a cabo en biorreactor. La gráfica de la izquierda, denominada “Etapa 1”, representa la fase de la fermentación secuencial realizada por <i>P. taetrolens</i> . La de la derecha, “Etapa 2”, muestra la fase en la que se inocula <i>L. casei</i> , posteriormente a la esterilización del medio de cultivo con la consecuente eliminación de <i>P. taetrolens</i> .	55
Figura 28.	Evolución del pH en fermentación pura de <i>L. casei</i> en biorreactor.	56

Figura 29.	A la izquierda, placa de NB con colonias de <i>P. taetrolens</i> . A la derecha, placa de MRS con colonias de <i>L. casei</i> .	57
Figura 30.	Evolución del crecimiento (ufc/ml) de las diferentes fermentaciones secuenciales llevadas a cabo en agitador orbital. La “Etapa 1” representa la fase de la fermentación secuencial realizada por <i>P. taetrolens</i> . La “Etapa 2” muestra la fase en la que se inocula <i>L. casei</i> , posteriormente a la esterilización del medio de cultivo con la consecuente eliminación de <i>P. taetrolens</i> .	57
Figura 31.	Evolución del crecimiento (ufc/ml) en fermentación pura de <i>L. casei</i> llevada a cabo a nivel de agitador orbital.	58
Figura 32.	Evolución del crecimiento (ufc/ml) en las diferentes fermentaciones secuenciales llevadas a cabo en biorreactor. Se representa la etapa 1 (gráfica de la izquierda) perteneciente a la fermentación llevada a cabo por <i>P. taetrolens</i> , y la etapa 2 (gráfica de la derecha) en la que se inocula <i>L. casei</i> en ausencia del primer microorganismo fermentador.	59
Figura 33.	Evolución del crecimiento (ufc/ml) en fermentación pura de <i>L. casei</i> en biorreactor.	59
Figura 34.	Evolución de la concentración de lactosa (g/L) en las diferentes fermentaciones secuenciales llevadas a cabo a nivel de agitador orbital.	60
Figura 35.	Evolución de la concentración de lactosa (g/L) en las diferentes fermentaciones secuenciales llevadas a cabo en el biorreactor.	60
Figura 36.	Evolución de la concentración de ácido lactobiónico (g/L) en las diferentes fermentaciones secuenciales llevadas a cabo a nivel de agitador orbital.	61
Figura 37.	Evolución de la concentración de ácido lactobiónico	62

- (g/L) en las diferentes fermentaciones secuenciales llevadas a cabo a nivel de biorreactor.
- Figura 38.** Evolución de la concentración de ácido láctico (g/L) en las diferentes fermentaciones secuenciales llevadas a cabo a nivel de agitador orbital (en la gráfica de la izquierda) y en la secuencial a nivel de biorreactor (gráfica de la derecha). **62**
- A la izquierda, se muestra la curva de flujo de las fermentaciones de *L. casei* puro y secuencial llevadas a cabo a nivel de agitador orbital, en las que se representan los datos obtenidos en el reómetro de la viscosidad frente a la velocidad cortante. A la derecha, fotografía del producto final obtenido en la fermentación secuencial.
- Figura 39.** Curvas de flujo de las fermentaciones llevadas a cabo en biorreactor. Se representa la viscosidad (cP) respecto a la velocidad cortante mostrándose una oscilación constante y con valores de viscosidad muy bajas. **64**
- Figura 40.** A la izquierda se observa el desuerado del producto fermentado obtenido del proceso secuencial en biorreactor. A la derecha, sin embargo, se muestra el producto elaborado a partir de la fermentación de *P. taetrolens* en el biorreactor, en el cual, no se ha llevado a cabo la separación del suero y la cuajada. **65**
- Figura 41.** Fotografía en la que se observa el experimento del método de Bradford. El primer tubo empezando por la izquierda, es el blanco, siendo los dos siguientes la fermentación de *L. casei* pura y la fermentación secuencial 4, ambas en biorreactor. Las dos últimas son la fermentación de *L. casei* pura y la secuencial 1, en este caso a nivel de agitador orbital. Existe un **66**
- Figura 42.** **67**

	cambio de color hacía un tono azul, siendo más notorio en los tubos que pertenecen a las muestras del agitador orbital, lo que indica que la concentración de proteína en éstos es mayor que en los del biorreactor.	
	Producto obtenido de la fermentación secuencial 5 con 0,5% de carragenato a nivel de biorreactor. En la imagen superior se observa el producto final en el propio biorreactor. En ella se puede observar la zona central tras el proceso de agitación interna En la imagen inferior se muestra el mismo producto en el recipiente utilizado para la medición en el texturómetro.	68
Figura 43.		
	Producto fermentado obtenido de la fermentación secuencial 2 con 0,1% de carragenato a nivel de agitador orbital.	68
Figura 44.		
	Producto obtenido a nivel de agitador orbital al que se le aplicó 0,5%, 1% y 2% de carragenato.	70
Figura 45.		
	Producto obtenido a partir de una fermentación secuencial a nivel de agitador orbital con 2% de carragenato.	70
Figura 46.		
	Producto fermentado obtenido a nivel de biorreactor al que se le aplicó 1%, 1,5% y 2% de carragenato.	71
Figura 47.		
	Producto obtenido a partir de una fermentación secuencial a nivel de biorreactor con 1,5% de carragenato (imágenes superiores) y con el 2% de carragenato (imágenes inferiores).	71
Figura 48.		

LISTA DE TABLAS

Tabla 1.	Clasificación de los microorganismos según la temperatura óptima de crecimiento y ejemplo del producto final que pueden dar lugar.	20
Tabla 2.	Clasificación de la fase móvil y estacionaria.	31
Tabla 3.	Clasificación de los diferentes tipos de cromatografías.	32
Tabla 4.	Descripción de las diferentes propiedades que definen la textura.	35
Tabla 5.	Se muestra la productividad de ácido lactobiónico y el rendimiento sobre sustrato de la fermentación pura de <i>P. taetrolens</i> a nivel de agitador orbital y de biorreactor.	53
Tabla 6.	Tabla que muestra la viscosidad media del producto obtenido por las diferentes fermentaciones y su desviación estándar.	64
Tabla 7.	Se muestra el porcentaje de cuajada y de suero obtenidos en aquellos productos fermentados en los que se produjo la sinéresis.	66
Tabla 8.	En la tabla se exponen las concentraciones de proteína determinadas a partir del método Bradford de las diferentes fermentaciones llevadas a cabo.	66
Tabla 9.	Tabla en la que se refleja los valores de firmeza (g) y adhesividad (g) obtenidos al someter los productos finales de las fermentaciones secuenciales con texturizante a análisis con el texturómetro.	67
Tabla 10.	En la tabla se refleja los valores de firmeza (g) y adhesividad (g) obtenidos al incorporar diferentes concentraciones de carragenato al producto obtenido a nivel de agitador orbital y de biorreactor.	69
Tabla 11	. En la tabla se muestran las características que posee cada producto fermentado final del agitador orbital,	72

tanto las ufc/ml de *P taetrolens* y de *L. casei* como la concentración de lactosa, ácido lactobiónico, ácido láctico y de proteínas de cada uno.

Tabla 12 En la tabla se muestran las características que posee cada producto fermentado final del agitador orbital, tanto las ufc/ml de *P taetrolens* y de *L. casei* como la concentración de lactosa, ácido lactobiónico, ácido láctico y de proteínas de cada uno. **73**

INTRODUCCIÓN

La alimentación del ser humano presenta una evolución desde una sociedad en la que prevalecía la necesidad de alimentarse hacia otra más moderna que se preocupa por aquellos alimentos que desencadenan efectos beneficiosos sobre el organismo, favoreciendo, así, la aparición de los alimentos funcionales.

Dentro de éstos, se pueden encontrar los probióticos, los prebióticos y los simbióticos, en continuo estudio para complacer la demanda actual de la sociedad por parte de la industria alimentaria, desarrollando y ofertando cada vez más productos saludables (Ramírez et al., 2011).

Un probiótico muy conocido y estudiado resulta ser *Lactobacillus casei* que origina numerosos efectos beneficiosos en el tracto digestivo al ser ingerido por el ser humano junto con los alimentos. El género de este microorganismo pertenece al grupo de bacterias ácido-lácticas llevando a cabo la fermentación láctica y siendo utilizadas para la elaboración de productos alimenticios como las leches fermentadas.

El descubrimiento del ácido lactobiónico como un componente innovador en la industria alimentaria debido a sus propiedades tecnológicas como aditivo en los alimentos y, además, como prebiótico, ha despertado el interés de investigadores y empresarios a la hora intentar incorporar dicho compuesto a productos alimentarios comerciales (García et al., 2017a).

Su producción se lleva a cabo, actualmente, mediante síntesis enzimática aunque se ha comenzado a desarrollar investigaciones sobre su síntesis microbiana con bacterias como *Acetobacter orientalis*, *Zymomonas mobilis* o *Pseudomonas taetrolens*, superando las desventajas que suponen la primera vía de producción (Kiryu et al., 2012; Alonso, 2013; Valle et al., 2013; Gordeska et al., 2014).

Se estima que la producción de leche de la Unión Europea es de 163,3 millones de toneladas, siendo el 24,4% de la producción del mundial y el 15% de todos los ingresos de UE. La industria láctea es clave en la economía europea ya que las grandes empresas de este sector a nivel mundial se encuentran dentro de La Unión. 508 millones de

habitantes europeos la consumen, siendo su consumo anual per cápita 61,2 kg (Lemoine, 2016).

El campo de los alimentos funcionales presenta un crecimiento muy significativo, presentando tasas de crecimiento anuales del 48%. En el año 2000, el mercado de los alimentos funcionales ha recaudado aproximadamente 10 millones de euros, aumentando a alrededor de 50 millones en el año 2013. Además, del mercado global de los alimentos funcionales, los probióticos representan el 60 – 70% de ellos (Fuentes-Berrio et al., 2015). La expectativa para años futuros es la persistencia del crecimiento como indica la figura 1.

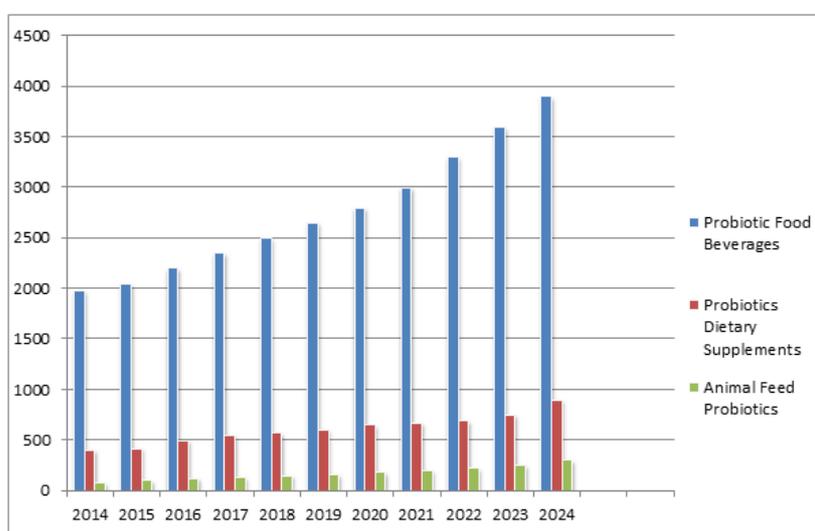


Figura 1. Mercado de probióticos en la Unión Europea clasificado por productos, desde el 2014 con perspectivas para el 2024, en millones de dólares. Fuente: Web 15

Teniendo estos datos en cuenta, en el presente trabajo se lleva a cabo la elaboración de un yogur que contiene el ácido lactobiónico como prebiótico y *L.casei* como probiótico, concibiendo este proyecto interesante para su posible aplicación en un futuro en la industria alimentaria.

Con el fin de obtener un producto que se adecúe a las propiedades organolépticas que resulten agradables para el consumidor y que se adapten a la calidad y los estándares establecidos por la sociedad, el estudio de la reología y la textura de los

alimentos resulta imprescindible a la hora de aprobar la comercialización de un producto final (García, 2012).

Por tanto, los objetivos de este Proyecto Fin de Máster son:

- Estudiar la capacidad de *P. taetrolens* para emplear leche desnatada como fuente de carbono a nivel de agitador orbital y de biorreactor.
- Determinar el modelo de crecimiento de *P. taetrolens* en una fermentación en leche desnatada, estableciendo el consumo de lactosa y la producción de ácido lactobiónico que lleva a cabo.
- Obtención de un producto fermentado lácteo a partir de leche desnatada mediante la fermentación secuencial de *P. taetrolens* y *L. casei*.
- Caracterización del proceso y del producto en cuanto a composición y estructura.
- Escalado del proceso a nivel de biorreactor.

CONSIDERACIONES
TEÓRICAS

1. LECHES FERMENTADAS.

Las leches fermentadas son productos que se obtienen de la coagulación de las proteínas de la leche debido a una disminución del pH próximo al punto isoeléctrico de éstas causado por la fermentación láctica, que es llevada a cabo por fermentos compuestos por las denominadas bacterias lácticas. De este proceso se obtienen productos como el queso, el yogur o la mantequilla (Web 5).

Se pueden emplear una gran variedad de microorganismo según la temperatura óptima de crecimiento:

Tabla 1. Clasificación de los microorganismos según la temperatura óptima de crecimiento y ejemplo del producto final que pueden dar lugar (Gösta, 1996, web 10, web 4).

Bacterias	Ejemplo de bacteria	T ^a óptima de crecimiento	Producto final
Mesófilas	<i>Lactobacillus casei</i> , <i>Lactococcus lactis</i> <i>Leuconostoc spp</i>	20 - 30°C	Kumis Queso Mantequilla
Termófilas	<i>Streptococcus thermophilus</i> , <i>Lactobacillus bulgaricus</i> <i>Lactobacillus acidophilus</i>	40 – 45°C	Yogur clásico Leche ácida

1.1 YOGUR

Uno de los lácteos fermentados más conocidos es el yogur, cuyo proceso de elaboración comprende la fermentación láctica de leche en la que se transforma la lactosa en ácido láctico, produciendo una bajada del pH que da lugar a la precipitación de las proteínas de la leche obteniéndose una cuajada a la que se le denomina yogur (web 4). El diagrama de flujo del proceso de producción del yogur es el siguiente:

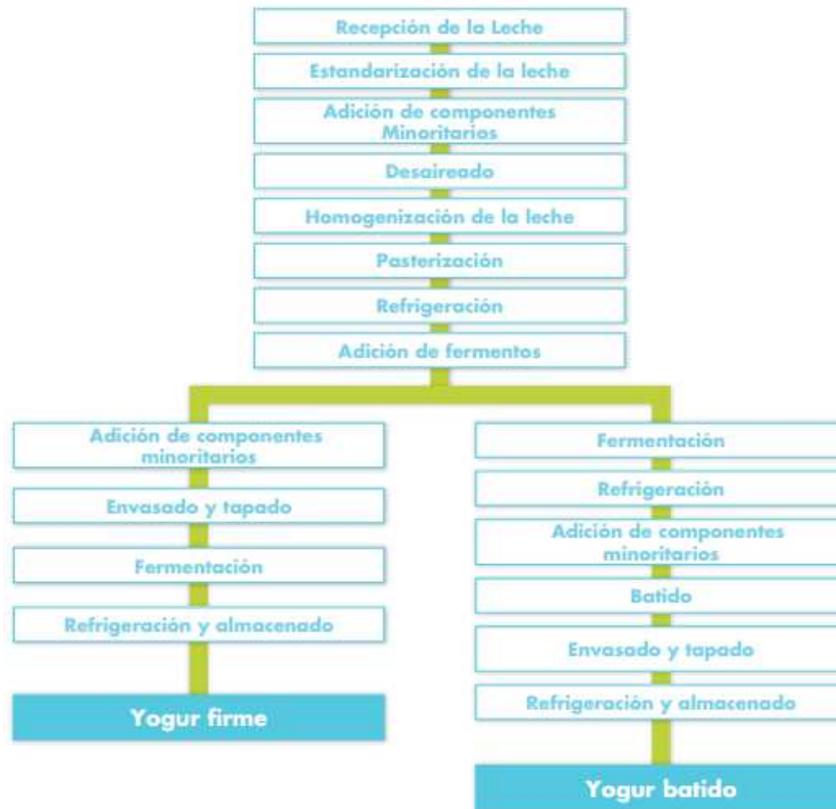


Figura 2. Diagrama de flujo del yogur. Fuente: web 12

La leche más utilizada como materia prima es la de vaca, aunque también puede emplearse la de cabra, oveja, camella y búfala. Además, puede ser entera o desnatada variando, por tanto, el contenido graso del producto final (web 2).

La pasteurización es una de las etapas clave del proceso en la que se somete a la leche a un tratamiento térmico durante un periodo de tiempo para eliminar los microorganismos patógenos de ésta y asegurar, así, su inocuidad. El binomio t/T puede ser muy variado dependiendo del protocolo de elaboración, utilizándose por regla general temperaturas inferiores a 100°C (web 3).

El fermento empleado depende de las propiedades deseadas del producto final, pudiendo variar el pH final, la textura y su viscosidad o el aroma y el sabor. De tal forma, se puede clasificar el yogur atendiendo a su proceso de elaboración y textura final (Gösta, 1996; web 8):

- Yogur firme: La fermentación y el enfriado se lleva a cabo en el mismo envase en el que se va a comercializar. Su consistencia es firme.
- Yogur batido: La fermentación se realiza en tanques industriales para posteriormente envasarlo en el recipiente correspondiente.
- Yogur líquido: El proceso de elaboración es similar al yogur batido siendo necesaria la rotura de la cuajada formada antes de envasarlo.

2. ALIMENTOS FUNCIONALES

Existe una tendencia ascendente de la preocupación por parte de la sociedad en cuanto a la alimentación y la salud y la información nutricional de los alimentos. La búsqueda de alimentos saludables o funcionales que ayuden a prevenir diferentes enfermedades o que sean beneficiosos para la salud se ha incrementado de forma considerable, englobando dentro de este tipo de alimentos los prebióticos (Prieto-Hontoria, 2016). De modo que, la obtención de alimentos probióticos y prebióticos en productos cuyo consumo se encuentra extendido a nivel mundial resulta de gran interés empresarial.

La leche y sus derivados resulta ser uno de los productos más consumidos en el mundo, por lo que se requiere la adaptación por parte de la industria láctea a las nuevas tendencias de la sociedad, desarrollando nuevas tecnologías y productos según la demanda (Cobos, 2016).

2.1 PROBIÓTICOS

Se considera probiótico a *“aquellos microorganismos vivos que cuando se administran en cantidades apropiadas, confieren al huésped un beneficio para la salud”* (web 5). Estos microorganismos han de (Sarao et al., 2017):

- Formar parte de la flora intestinal.
- Sobrevivir en el sistema digestivo y ser capaces de multiplicarse en el intestino.

- Ser reconocidos como seguros para la salud y el consumo humano (GRAS: “Generally Regarded As Safe”).
- Producir un efecto beneficioso en el organismo hospedador.

La gran parte de los probióticos forman parte de las bacterias productoras de ácido láctico, con efectos beneficiosos sobre el organismo como la capacidad para modular el sistema inmune, contribuir a la recuperación de los procesos diarreicos, reducción de la prevalencia de alergias, disminuir la colonización de patógenos en el intestino, mitigar la intolerancia a la lactosa, protección frente al cáncer de colon y capacidad antiinflamatoria en el intestino (Ortega et al., 2002).

En el caso de los productos lácteos, para que sean reconocidos como probióticos, se requiere que la concentración mínima del microorganismo probiótico sea 10^7 ufc/ml (web 13).

2.1.1 *Lactobacillus casei*

L. casei, bacteria Gram positiva, anaerobia, localizada en el sistema digestivo del ser humano, pertenece al grupo de las bacterias lácticas, siendo un género que resiste las barreras gástricas, sobreviviendo en el tracto intestinal y pudiendo desarrollar sus efectos como probiótico en él (Cobo et al., 2006):

- Conservación de la flora intestinal.
- Regular la renovación del epitelio intestinal.
- Colaborar en la regulación del sistema inmunológico.
- Favorecer la recuperación de la diarrea infantil.

2.2 PREBIÓTICOS

En 1995, Gibson y Roberfroid definieron prebiótico como *‘ingredientes no digeribles de los alimentos que afectan beneficiosamente al huésped estimulando selectivamente el crecimiento y/o la actividad de una de las especies de bacterias que están ya establecidas en el colon, o de un número limitado de ellas, y por consiguiente*

mejoran de hecho la salud del huésped' (Gibson et al., 1995). Posteriormente, esta definición fue actualizada por los mismos autores como *'ingredientes selectivamente fermentados que permiten cambios específicos en la composición de la microbiota gastrointestinal y que confieren beneficios en el bienestar y la salud del huésped'*. Los requisitos que se imponen para que un componente alimentario se considere prebiótico son (Gibson et al., 2004):

- No ser hidrolizado ni absorbido en el sistema digestivo y resistir su acidez.
- Ser fermentado por la microbiota presente en el intestino.
- Producir beneficio en la microbiota intestinal, por ejemplo, induciendo su crecimiento.

2.2.1 ÁCIDO LACTOBIÓNICO

El ácido lactobiónico se encuentra dentro del grupo de los polihidroxiácidos y fue descubierto por Fischer y Meyer en 1889 (Alonso, 2013). Está compuesto por una molécula de D-galactosa unida por un enlace del tipo éster a una molécula de ácido D-glucónico y su producción se lleva a cabo mediante la oxidación de la lactosa (Bride, 2004).

Desde su descubrimiento, se han estudiado y revelado numerosas propiedades y funciones como su utilización en nanopartículas de diagnóstico clínico o su presencia en diferentes compuestos utilizados para tratar los órganos empleados para trasplantes en la medicina; su función hidratante, antioxidante y anti-envejecimiento, entre otras, en la industria cosmética; su propiedad como quelante de iones como el calcio, emulsificante o su utilización para la separación de proteína con nanotubos funcionalizados en la industria química. En cuanto a su aplicación en la industria alimentaria, el ácido lactobiónico, además de ser un agente antioxidante, saborizante y conservante, resulta ser también un prebiótico muy potente (Alonso, 2013).

El ácido lactobiónico es un derivado de la lactosa no absorbible por el intestino, el cual se ha demostrado que puede ser utilizado como sustrato para el crecimiento de

ciertas cepas de las bacterias *Lactobacillus rhamnosus* o *Lactobacillus paracasei* presentes en el intestino del ser humano (Saarela et al., 2003). También se ha estudiado la resistencia de *Lactobacillus acidophilus* y de *Lactobacillus reuteri* a los ácidos biliares, como el ácido cólico o el taurocólico, en presencia de lactulosa y ácido lactobiónico al 1%, observándose una protección mayor que utilizando otros sustratos como la inulina. Además, se ha demostrado que regulando la concentración de ácido lactobiónico de forma adecuada, el pH del colon puede situarse en un valor entorno a 5, favoreciendo el crecimiento de los microorganismos probióticos por encima de los patógenos (Adebola et al., 2014).

La producción de ácido lactobiónico comercial, actualmente, se lleva a cabo mediante síntesis enzimática empleando lactosa refinada que, a partir de varias reacciones consecutiva, se oxida dando lugar al ácido lactobiónico. Los inconvenientes que tiene esta vía de producción es el coste del proceso, que se ve incrementado por la obtención y purificación de las enzimas necesarias para que se dé el proceso, y el tiempo que esto conlleva. Por lo tanto, existe un gran interés en la bio-producción de este polihidroxiácido, reduciendo costes y duración y siendo más favorables para el medio ambiente (Alonso, 2013; Alonso et al., 2015).

2.2.1.1 *Pseudomonas taetrolens*

La primera vez que se aisló ácido lactobiónico a partir de bacterias fue en 1947, donde los investigadores Frank Stodola y Lewis Lockwood realizaron experimentos con quince especies diferentes de *Pseudomonas* para obtener, a partir de lactosa, ácidos biónicos. Los resultados concluyeron que la especie *Pseudomonas graveolens* (actualmente denominada *Pseudomonas taetrolens*) consumía toda la lactosa suministrada tras 165 horas de fermentación, produciendo ácido lactobiónico en forma de lactobionato de calcio (Stodola et al., 1947). Existen estudios que demuestran que otras bacterias como *Acetobacter orientalis* (Kiryu et al., 2012) o *Streptococcus lactis* (Alonso 2013), también son capaces de producir este compuesto pero, debido a la inexistencia de genes que codifiquen enzimas que hidrolicen el ácido lactobiónico como las β -galactosidasas, junto con los altos rendimientos de producción que presentan, *P. taetrolens* resulta ser la bacteria ideal para la producción de este ácido (Alonso, 2013).

Se trata de una bacteria no patógena, silvestre, gram negativa y aerobia, capaz de sintetizar el enzima lactosa deshidrogenasa que cataliza la oxidación de la lactosa a lactobiono- δ -lactona para, posteriormente, ser utilizado como sustrato por el enzima lactonasa y obtener el ácido lactobiónico (Nishizuka et al., 1962; García et al., 2017a).

2.2.1.2 SITUACIÓN ACTUAL DEL ÁCIDO LACTOBIÓNICO

Actualmente, sólo en EEUU se encuentra autorizado por la FDA (Food and Drug Administration) el uso de ácido lactobiónico como aditivo alimentario en forma de lactobionato de calcio (E-399). En El Código de Regulaciones Federales (revisado en el 2016) aparecen las siguientes condiciones (web 1):

- a) El aditivo es la sal de calcio proveniente del ácido lactobiónico, a partir de la oxidación de la lactosa.
- b) Se emplea como agente reafirmante para masas secas y en la concentración requerida para ello.

En el caso de la Unión Europea, todavía se encuentra en fase de estudio, pendiente de aprobar por la Agencia Europea de Seguridad Alimentaria (Alonso, 2013). Pese a ello, existe un caso que pone de manifiesto la inocuidad del compuesto. Se trata del “Caspian Sea yogurt”, un producto lácteo tradicional del Japón elaborado a partir de la fermentación de *Acetobacter orientalis* que sintetiza ácido lactobiónico, el cual estará presente, por tanto, en este tipo de yogures (Kiryu et al., 2012). Además, en 1994 se llevó a cabo un estudio para determinar las consecuencias que podría conllevar en la salud humana una ingesta de hasta 24 g al día de ácido lactobiónico, concluyéndose que no se llegó a observar efecto nocivo alguno (Alonso, 2013).

2.3 SIMBIOSIS

La combinación de probióticos y prebióticos en un mismo alimento recibe el nombre de simbiosis. Para que un producto sea considerado como tal, es necesario que el probiótico tenga la capacidad de emplear el prebiótico como sustrato para sobrevivir dentro del tracto intestinal. Por ello, es necesario que exista una compatibilidad entre el

prebiótico y la cepa probiótica para favorecer la supervivencia de esta última (Gotteland, 2010).

Se ha demostrado la capacidad de la cepa *L. casei* 475 para emplear durante su crecimiento el ácido lactobiónico como fuente de carbono en ausencia de otras fuentes, validando así la denominación de producto simbiótico a aquellos que presenten dicha cepa y dicho ácido (García et al., 2017b).

Se han realizado estudios para crear un producto simbiótico lácteo a partir de suero residual de queso. Para ello, se llevó a cabo una fermentación mixta compuesta por *L. casei* y *P. taetrolens*, resultando una relación de amensalismo en la que la presencia de *L. casei* perjudica el crecimiento de *P. taetrolens*, siendo no factible la fermentación simultánea (García et al., 2017a). Este hecho puede deberse al efecto antimicrobiano que ejercen las bacteriocinas sintetizadas por el lactobacilo frente a la pseudomona (Jamuna et al., 2004).

Posteriormente, se realizó un estudio en el que se investigó la fermentación secuencial de ambas bacterias, obteniéndose resultados viables llevando a cabo primero la fermentación de *P. taetrolens*, con la producción correspondiente de ácido lactobiónico, seguido de la fermentación de la cepa CECT 475 de *L. casei*, resultando un producto simbiótico funcional (García et al., 2017b).

3. TEXTURIZANTES

En la industria alimentaria, se ha vuelto muy importante la utilización de aditivos con el propósito de prolongar la vida útil de los alimentos y mejorar las características sensoriales hacia aquellas que son más deseadas por los consumidores. Se considera un aditivo alimentario aquella sustancia, natural o artificial y sin valor nutricional por sí misma, que se incorpora a los alimentos para que cumpla una determinada función, que suele ser potenciar las propiedades organolépticas o tecnológicas. Atendiendo a su función, los más utilizados en la industria alimentaria se pueden clasificar en (web 11):

- **Conservantes:** Aquellos aditivos cuya función es la de evitar o retrasar el deterioro del alimentos, entre ellos se puede encontrar el ácido sórbico o los nitratos y nitritos.
- **Colorantes:** Todo aditivo que atribuye color a los alimentos. Pueden ser naturales, como las clorofilas o los carotenoides, o sintéticos como la tartracina o la eritrosina.
- **Antioxidantes:** Interrumpen la oxidación de grasas que contiene el producto, por ejemplo el ácido L-ascórbico.
- **Potenciador del sabor:** Son compuestos que intensifican el sabor de los componentes de los alimentos. Alguno de ellos son el ácido L-glutámico o el glutamato de sodio.
- **Edulcorantes:** Proporcionan sabor dulce a los alimentos como es el caso de la sacarina o el aspartamo.
- **Texturizantes:** Se dividen en emulsificantes, gelificantes y estabilizantes y modifican la textura de los alimentos o aportan consistencia a éstos. Entre ellos, se encuentran las pectinas, los almidones modificados y los carragenatos.

3.1 CARRAGENATO

Las propiedades texturales en la industria alimentaria resulta ser un factor importante a considerar ya que se trata de uno de los criterios que el consumidor tiene en cuenta a la hora de elegir un producto alimentario. Uno de los mecanismos existentes a la hora de variar la textura de los alimentos es la utilización de texturizantes como el carragenato.

Los carragenatos son polisacáridos que se obtienen de algas marinas rojas como *Gigartina* o *Chondrus* y que se emplean como agentes texturizantes debido a sus propiedades para producir geles con una textura más o menos rígida dependiendo de su concentración y de la temperatura a la que estén sometidos. Se emplean en una gran variedad de alimentos como los yogures, gelatinas de frutas, chocolate a la taza, quesos frescos, leche condensada, salsas, helados, etc, y en la Unión Europea se conocen con el código E-407. Se describieron tres tipos de carragenatos, Kappa, Lambda e Iota, en función de la situación y la cantidad de ésteres de sulfato que presenten.

Cuando se incorpora el carragenato al proceso de elaboración de un producto lácteo, va a fortalecer la coagulación llevada a cabo por la caseína, llegando a proporcionar texturas sólidas incluso a concentraciones del 0,15%. Su absorción intestinal es baja y su Ingesta Diaria Aceptable (IDA) es de 50 mg/kg (web 11; Alarcón, 2003).

4. MÉTODOS DE OPERACIÓN

4.1 BIORREACTOR DISCONTINUO

Los biorreactores son equipos que se utilizan a nivel industrial o de laboratorio para realizar diferentes procesos y tratamientos a diferentes organizaciones biológicas. Presentan formas y volúmenes muy variados, pudiendo realizarse en ellos tratamientos para aguas, cultivos celulares o fermentaciones. Dentro de estas últimas, se pueden diferenciar:

- Fermentaciones en fase sólida: En las que el crecimiento de los microorganismos se lleva a cabo sobre soportes sólidos.
- Fermentaciones en fase líquida: El crecimiento se produce en un medio líquido.

El crecimiento microbiano de las fermentaciones se puede estudiar en tres tipos de cultivos. Los cultivos discontinuos (o batch) son los considerados “cerrados”, ya que el volumen del biorreactor permanece constante, adicionando al comienzo de la fermentación los nutrientes y los microorganismos necesarios para ella. Por consiguiente, los sustratos irán disminuyendo a medida que avanza el proceso, produciéndose un incremento del crecimiento de las bacterias junto con los productos sintetizados durante la fermentación. Lo único que se podría adicionar durante su transcurso sería oxígeno, antiespumante y ácidos o bases para el control del pH. En este tipo de cultivos se obtiene una curva de crecimiento típica en la que se distinguen cuatro fases: fase de latencia, fase log, fase estacionaria y la fase de muerte.

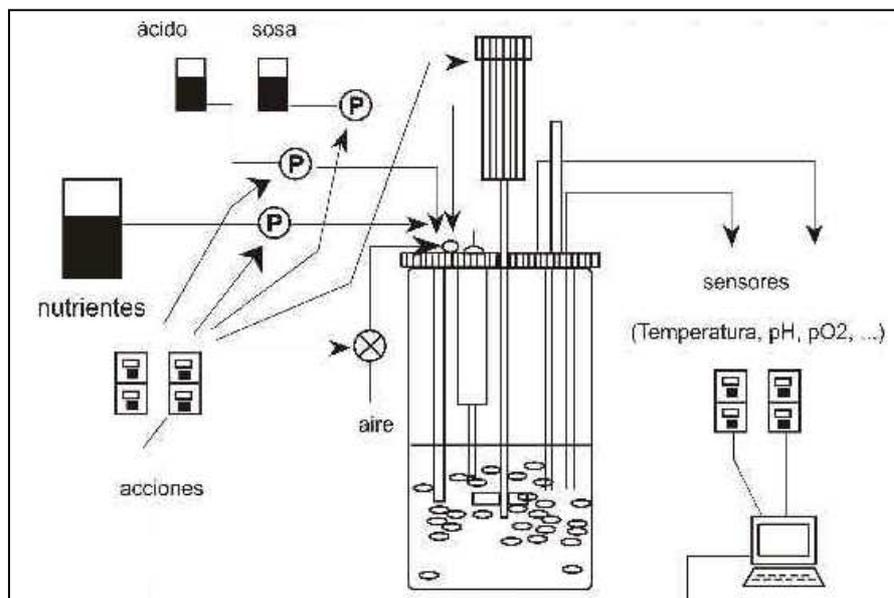


Figura 3. Biorreactor Batch. Fuente: Vázquez et al., 2007.

En los cultivos semicontinuos (fed-batch), los nutrientes se van añadiendo de forma escalonada según transcurre la fermentación, mientras que en los cultivos continuos los sustratos se añaden de forma continua, considerándose un sistema “abierto”. En este último caso y de forma simultánea, se va eliminando del biorreactor el mismo volumen de solución que entra (Díaz, 2012).

4.2 CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICACIA

La cromatografía, descubierta por Mikhail Tswett en 1906, es una técnica empleada para llevar a cabo la separación y la identificación de los analitos que componen una mezcla compleja de compuestos. Se emplea una fase estacionaria que es recorrida por la mezcla cuyo movimiento es facilitado por una fase móvil. El proceso por el cual los analitos se desplazan a través de la fase estacionaria se denomina elución. La velocidad de migración de los diferentes compuestos por la fase estacionaria es lo que determina la separación de éstos y se representa mediante un cromatograma. Esta gráfica permite establecer un análisis cualitativo y cuantitativo de los analitos, identificando los compuestos de la mezcla según la posición del pico y determinando la cantidad existente de éstos en la muestra mediante las áreas debajo de los picos y los patrones de calibrado.

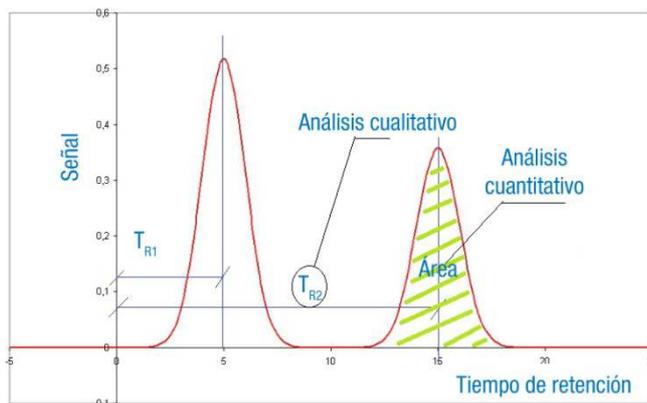


Figura 4. Cromatograma. Fuente: web 6

Existen diferentes técnicas de cromatografía dependiendo de la naturaleza de la fase móvil:

- Gaseosa: Cromatografía de gases.
- Líquida: Cromatografía de líquidos.

Atendiendo al soporte de la fase estacionaria,

- Cromatografía de columna: La fase estacionaria se encuentra en un tubo estrecho denominado columna.
- Cromatografía plana: En este caso, la fase estacionaria está sobre una placa plana o retenida en los poros de un papel.

En ambos casos, la fase móvil se desplazaría a través de la estacionaria por presión o por gravedad.

Tabla 2. Clasificación de la fase móvil y estacionaria.

Fase móvil	Fase estacionaria
Líquida	Plana
	Columna
Gaseosa	columna

En el caso de la cromatografía de columna, según la naturaleza de la fase estacionaria se puede distinguir:

Tabla 3. Clasificación de los diferentes tipos de cromatografías.

Fase móvil	Fase estacionaria	Tipo de cromatografía
De gases	Líquido	Cromatografía gas-líquido o de reparto
	Sólido	Cromatografía gas-sólido o de adsorción
De líquidos	Sólido	Cromatografía líquido-sólido o de adsorción
	líquido	Cromatografía líquido-líquido o de reparto
	Resina de intercambio iónico	Intercambio iónico
	Polímero sólido	Exclusión por tamaño

Durante los años 1960, se desarrolló la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC, High Performance Liquid Chromatography) como un método más rápido de llevar a cabo que la cromatografía líquida en columna. El equipo de HPLC consta de los siguientes componentes:

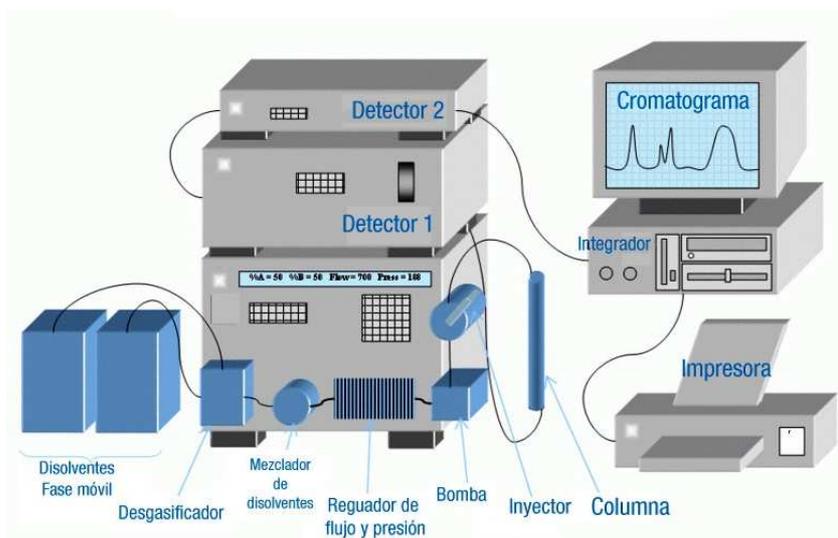


Figura 5. Componentes del equipo HPLC. Fuente: web 6.

La cromatografía iónica de alta resolución es un tipo de HPLC en la que la fase estacionaria resulta ser una resina con carga iónica, de tal forma que los analitos cuya carga sea del mismo signo que la de la fase estacionaria son repelidos y eluyen primero. Los analitos de carga contraria, se unen a la matriz sólida y son retenidos hasta que, mediante un solvente, se varía el pH hasta invertir la carga. Las resinas de las columnas pueden ser de dos tipos:

- De intercambio catiónico: La fase estacionaria posee carga negativa. Puede ser de ácido fuerte o débil, dependiendo del pH al que se va a llevar a cabo el proceso.
- De intercambio aniónico: En este caso, la fase estacionaria tiene naturaleza positiva, por lo que intercambia iones con carga negativa. Del mismo modo que la anterior, pueden ser básicos fuertes o débiles.

Tras la detección de la elución de todos los analitos de la mezcla, se obtiene el cromatograma, a partir del cual y mediante la recta de calibrado elaborada previamente con concentraciones conocidas de los analitos, se puede identificar y determinar la concentración de cada uno de ellos (Skoog et al., 1997).

En este proyecto se emplea el HPLC para determinar la concentración del sustrato de las fermentaciones, la lactosa, y de los dos productos que se sintetizan dependiendo del microorganismo utilizado, ácido lactobiónico si la fermentación la lleva a cabo *P. taetrolens* y el ácido láctico si la realiza *L. casei*.

4.3 REÓMETRO

La reología es la ciencia que caracteriza los fluidos analizando la respuesta que cada uno lleva a cabo cuando se le aplica un esfuerzo (Díaz, 2012). El equipo que lleva a cabo este estudio se denomina reómetro y da lugar a un reograma, en función del cual se clasifican los fluidos:

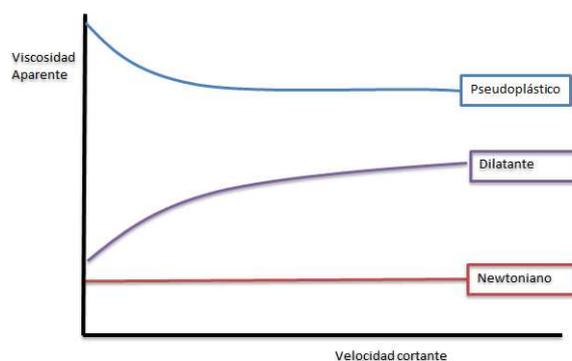


Figura 6. Reograma, gráfica que muestra la tendencia típica de cada tipo de fluido cuando se representa la viscosidad aparente frente a la velocidad cortante. Fuente: web 14

En los fluidos newtonianos, la viscosidad no varía independientemente de la velocidad de deformación que se le aplique. Dentro de los fluidos no newtonianos, se encuentran los fluidos pseudoplásticos cuya viscosidad, sin embargo, disminuye a medida que aumenta la velocidad de deformación, y los fluidos dilatantes se comportan de forma inversa a estos últimos.

Para llevar a cabo el análisis, se emplean reómetros con diferentes técnicas de estudio. Entre ellos, se encuentran los reómetros rotacionales que constan de un rotor superior con una velocidad de giro a determinar según la muestra y un vaso de medición inferior no móvil sobre el que se coloca la muestra. Mediante las dos placas, la muestra es sometida a una deformación y se determina la velocidad de deformación, esfuerzos cortantes y la viscosidad (Slatter, 1997).



Figura 7. Reómetro. Fuente: web 9.

El empleo del reómetro en este trabajo tiene como objetivo caracterizar la textura de los productos fermentados obtenidos con estructura líquida.

4.4 TEXTURÓMETRO

A la hora de elaborar un producto alimentario, es importante determinar las características y los parámetros texturales de éste, utilizando para ello un texturómetro.

Se define textura como “*la manifestación sensorial y funcional de las propiedades estructurales, mecánicas y superficiales de los alimentos detectados a través de los sentidos de la visión, del oído, del tacto y de la cinestesia*” (Szczesniak, 2002).

El Analizador de Textura aplica un esfuerzo a la muestra mediante una sonda, la cual puede presentar diferentes morfologías dependiendo del producto a analizar, obteniéndose tres parámetros, tiempo, fuerza y distancia; a partir de los cuales pueden estudiarse diferentes cualidades de la muestra (dureza, viscosidad, adhesividad, etc) (García, 2012).

Dado que la textura es un parámetro multivariable, se ha creado una nomenclatura internacional universal para evitar confusiones al citar las propiedades:

Tabla 4. Descripción de las diferentes propiedades que definen la textura. Fuente: Szczesniak, 2002

	Físicas	Sensoriales
Propiedades primarias		
Dureza	Fuerza necesaria para alcanzar una deformación dada.	Fuerza requerida para comprimir una sustancia entre los molares (en caso de sólidos) o entre la lengua y el paladar (en el caso de semisólidos).
Cohesividad	Extensión a la que un material puede ser deformado antes de que rompa.	Grado en que una sustancia es comprimida entre los dientes antes de romper.
Viscosidad	Velocidad de flujo por unidad de fuerza.	Fuerza requerida para llevar un líquido de la cuchara a la lengua.
Elasticidad	Velocidad a la que un material deformado vuelve a su condición inicial después de que la fuerza que causa la deformación es retirada.	Grado en que un producto vuelve a su forma original una vez ha sido comprimido entre los dientes.
Adhesividad	Trabajo necesario para superar las fuerzas atractivas entre la superficie del alimento y la superficie de otros materiales con los que el alimento entra en contacto. bajo grado de cohesividad.	Fuerza requerida para eliminar el material que se adhiere a la boca (generalmente al paladar) durante el proceso normal de comer. desmigaja, agrieta o se hace pedazos.
Masticabilidad	Energía requerida para masticar un alimento sólido hasta el estado adecuado para ser tragado: un producto con dureza, cohesividad y elasticidad.	Periodo de tiempo requerido para masticar el producto, aplicando una fuerza a una velocidad constante, hasta alcanzar una consistencia adecuada para poder tragarlo.
Gomosidad	Energía requerida para desintegrar un semisólido a un estado adecuado para ser tragado: un producto con un bajo grado de dureza y alto grado de cohesividad.	Consistencia que persiste durante la masticación; energía requerida para desintegrar un semisólido a un estado adecuado para poder tragarlo.

Los resultados del analizador se muestran a través de una gráfica como aparece reflejado en la figura 8, pudiéndose obtener los valores de los diferentes parámetros a partir de ella como la firmeza o la adhesividad.

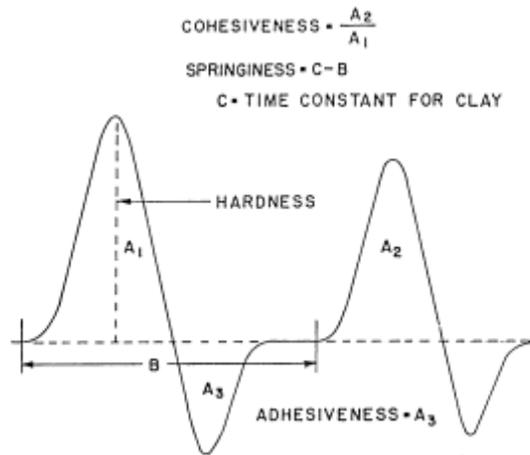


Figura 8. Perfil de la curva obtenida con el analizador de textura. Fuente: Szczesniak, 2002

Este equipo se empleó para analizar las características texturales de los productos finales obtenidos de las fermentaciones con cierto grado de firmeza.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Microorganismos

1.1 *Lactobacillus Casei* CECT 475

Se mantiene congelado a -18°C en glicerol al 40% v/v. Se reactiva en placas de MRS (de Man Rogosa y Sharpe, Biokar diagnostics) con agar al 2% (p/v) y se incuba durante 48 horas a 30°C , almacenándose posteriormente a 4°C .

1.2 *Pseudomonas taetrolens* LMG 2336

Se conserva también a -18°C en una disolución de glicerol al 40% (v/v). En este caso, se reactiva en placas de NB (Nutrient Both, cuya composición es 1 g/L de extracto de carne, 2 g/L de extracto de levadura, 5 g/L de peptona y 5 g/L de cloruro de sodio) con agar al 2% (p/v) y se incuba durante 48 horas a 30°C . Posteriormente se mantienen a 4°C .

2. Medio de cultivo: leche desnatada

Se utiliza leche UHT desnatada comercial de la marca Cremosita, cuya información nutricional es la siguiente:



CREMOSITA®
Leche
 UHT
 Desnatada

Ingredientes: Leche desnatada de vaca.
País de origen: España

Información Nutricional

Valores nutricionales medios

	Por 100 ml	Por porción 250 ml	1 Porción/18*
Valor energético	145 KJ 34 Kcal	364 KJ 86 Kcal	4%
Grasas	<0,5 g	0,8 g	1%
de las cuales saturadas	0,2 g	0,5 g	3%
Hidratos de carbono	4,8 g	12 g	5%
de los cuales azúcares	4,8 g	12 g	13%
Fibra alimentaria	0 g	0 g	
Proteínas	3,1 g	7,8 g	16%
Sal	0,13 g	0,33 g	5%

* Ingesta de Referencia para un adulto medio (8.400 KJ / 2000 Kcal).

Figura 9. Información nutricional de la leche desnatada empleada como medio de cultivo durante el proyecto.

3. Fermentación secuencial a nivel de agitador orbital de *P. taetrolens* y *L. casei*

Todas las fermentaciones se llevan a cabo por duplicado, de modo que el proceso descrito a continuación se realiza doble, trabajando siempre de la misma forma y en las mismas condiciones en ambos.

Se tomaron muestras de todas las fermentaciones de forma periódica para determinar el pH, el crecimiento bacteriano, el consumo de sustrato y la producción de ácido, cuyos resultados son el valor medio de los duplicados, en el caso del pH, el consumo de sustrato y la producción de ácido, y la media resultante de la siembra en placa de las muestras por triplicado, en el caso de los valores que muestran el crecimiento bacteriano.

3.1 Preparación del inóculo de *P. taetrolens*

3.1.1 Preinóculo

Tras la reactivación de la bacteria en las placas de NB, se realiza un preinóculo para dicha bacteria en un matraz Erlenmeyer de 500 mL con 100 mL de NB en condiciones aerófilas. Para ello se seleccionan colonias aisladas de la bacteria de las placas de reactivación y se inocula en el matraz. A continuación, se incuba a 30°C, con una agitación de 250 rpm y durante 10 horas.

3.1.2 Preparación del medio de la fermentación

La fermentación se va a llevar a cabo en 400 mL de leche desnatada. Para asegurar las condiciones de esterilidad, la leche se somete a 90°C en el baño calefactor durante 10 minutos. Como la bacteria requiere oxígeno, la leche pasteurizada se trasvasa a una botella de 2 L, en la cual, se llevará a cabo la fermentación de *P. taetrolens*.

3.1.3 Preparación del inóculo

Tras las horas de incubación necesarias para el preinóculo, se toma el 10% (v/v) del cultivo del matraz y centrifuga a 12.000 g durante 10 minutos. El sobrenadante resultante es desechado y la biomasa sedimentada se resuspende y se vierte la botella de

2 L que contiene los 400 mL de leche pasteurizada. De nuevo, se incuba a 30°C y a 250 rpm.

3.2 Fermentación de *L. casei*

3.2.1 Preinóculo

Posteriormente a la reactivación de la bacteria en las placas de MRS, se realiza un preinóculo para dicha bacteria en una botella de 250 mL con 250 mL de MRS en condiciones anaerobias. Para ello se inoculan colonias aisladas de la bacteria de las placas de reactivación en la botella de 250 mL y se incuba a 37°C, sin agitación, durante 16 h.

3.2.2 Preparación del medio de la fermentación

El medio en el que se va a realizar la fermentación es la leche fermentada por *P. taetrolens*. Dado que esta bacteria no es del tipo GRAS, antes de inocular *L. casei* se esteriliza la leche de la botella de 2 L sometiéndola a 90°C durante 10 minutos para eliminar la pseudomona y se deja enfriar.

3.2.3 Preparación del inóculo

Los 400 mL de leche fermentada se vierten en una botella de 500 mL para asegurar las condiciones anaerobias requeridas por *L. casei* y, una vez transcurridas las 16 h de incubación de *L. casei*, se inocula 40 mL del MRS (10% v/v) en la botella de 500 mL con los 400 mL de leche pasteurizada en el paso previo. Posteriormente, se incuba a 37°C y a 100 rpm.

3.3 Fermentaciones llevadas a cabo a nivel de agitador orbital

- Optimización de tiempos de crecimiento de ambas bacterias en cultivo puro en leche desnatada, realizando la incubación según las condiciones óptimas de cada bacteria: 30°C, 250 rpm, condiciones aerobias para *P. taetrolens*; 37°C, 100 rpm y ausencia de oxígeno para *L. casei*.

- Fermentación secuencial de *P. taetrolens* y *L. casei* sin control de pH y en agitador orbital.
- Fermentación secuencial de *P. taetrolens* y *L. casei* sin control de pH y en agitador orbital añadiéndole carragenato (agente texturizante) al 0,1%:

El texturizante utilizado se denomina k-Carrageenan de la marca Sigma-Aldrich. La fermentación secuencial se lleva a cabo de la misma forma descrita anteriormente. Tras paralizar la fermentación de *P. taetrolens* en el duplicado de botellas, se añade el texturizante de la siguiente forma:

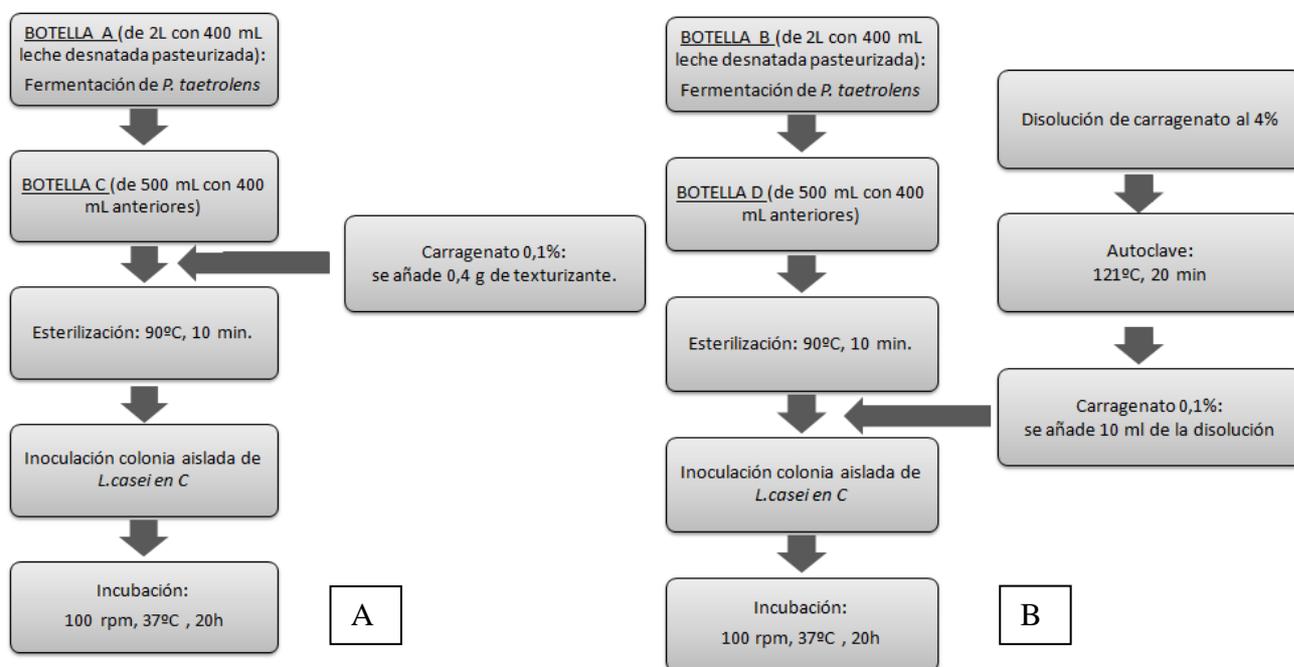


Figura 10. Diagrama de flujo de la fermentación secuencial en la que se adiciona 0,1% de carragenato previo a la esterilización (A) y a posteriori (B).

- Fermentación secuencial de *P. taetrolens* y *L. casei* sin control de pH y en agitador orbital añadiéndole calcio en forma de CaCl_2 :

El calcio es un compuesto clave en la coagulación, disminuyendo el tiempo del producción de la cuajada y favoreciendo la sinéresis (Pardo et al., 2003). Dado que el ácido lactobiónico es quelante del calcio (Alonso, 2013) y que el calcio queda retenido

en la cuajada, con la prueba de adición de cloruro de calcio se pretende comprobar si se favorece la retención del ácido lactobiónico en la cuajada.

El CaCl_2 utilizado es un secuestrante para la elaboración de quesos de Laboratorios Arroyo para el uso alimentario industrial (E-509), cuyas indicaciones señalan que es necesario emplear 1 L de CaCl_2 por cada 4000 L de leche (Baldwin et al., 2010). La fermentación se realiza según la descripción anterior realizándola, además de en botella, en un matraz de 1 L para analizar las diferencias en el crecimiento de *P. taetrolens* en botella y en matraz.

El CaCl_2 se autoclava y se añade de la siguiente forma:

- Fermentación en agitador orbital a nivel de botella:



Figura 11. Diagrama de flujo de la fermentación con CaCl_2 en agitador orbital a nivel de botella.

- Fermentación en agitador orbital a nivel de matraz:



Figura 12. Diagrama de flujo de la fermentación con CaCl_2 en agitador orbital a nivel de matraz.

4. Fermentación secuencial de *P. taetrolens* y *L. casei* en biorreactor

La fermentación se llevó a cabo en un biorreactor (BioFlo 110, USA) con capacidad de 2L, empleando 1 L de leche desnatada pasteurizada.

Se tomaron muestras de todas las fermentaciones de forma periódica de la misma forma que en el caso del agitador orbital.



Figura 13. BioFlo 110

El biorreactor contiene una sonda de medición de oxígeno disuelto (InPro 6830, Suiza) y una sonda de pH (Mettler Toledo, Suiza). Ambas muestran, de forma continua a través de un monitor, los valores de cada parámetro. En el caso de la sonda del pH, es necesario calibrarla previamente a la esterilización del equipo en el autoclave, mientras que la del oxígeno disuelto se calibra a posteriori.

También posee una sonda medidora de la temperatura, un sistema de aireación asociado a un rotámetro y un condensador con una entrada de agua y una salida hacia el desagüe, una toma de muestras, una camisa térmica, una toma de alimentación, una sonda con la que se bombea antiespumante Y-30 (Sigma-Aldrich, Alemania) en una dilución 1:10 de forma automática cuando sea requerido y otra sonda para bombear NaOH 2M cuando sea preciso mantener constante el pH en un valor determinado.

La fermentación se realiza, primeramente, bajo las condiciones de crecimiento óptimo de *P. taetrolens*: 350 rpm, 30°C, con aireación de 1 Lpm. El pH se mantiene sin control durante la fase de crecimiento de la bacteria para, posteriormente, establecer un control automático a 6,5 (Alonso et al., 2011). Tras 48 horas de fermentación, se considera que *P. taetrolens* ha consumido la mitad de la lactosa presente en la leche (a partir de las concentraciones de lactosa determinadas previamente con *P. taetrolens* en cultivo puro) y se comienza la fermentación de *L. casei*: 50 rpm, 37°C, sin aireación.

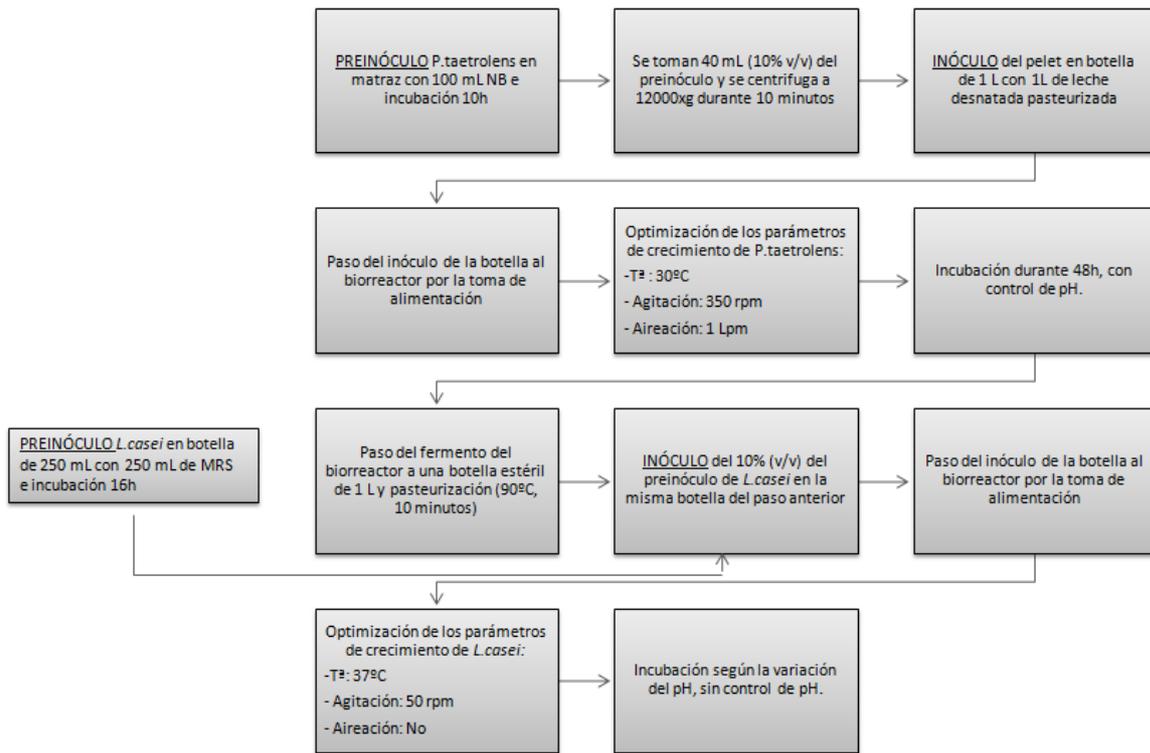


Figura 14. Diagrama de flujo de la fermentación secuencial en biorreactor.

4.1 Fermentaciones llevadas a cabo en biorreactor

- Fermentaciones de las dos bacterias en cultivo puro
- Fermentación secuencial de *P. taetrolens* y *L. casei* con pH libre al inicio para más tarde establecer un control constante a 6,5
- Fermentación secuencial de *P. taetrolens* y *L. casei* con pH libre al inicio para más tarde establecer un control constante a 6,5 con adición de 0,5% de carragenato.

5. Otras pruebas

- ❖ Pruebas de cuajado:

El objetivo de este experimento es comprobar el efecto de la concentración de ácido lactobiónico obtenido en la fermentación sobre la formación de la cuajada láctea. Para ello se realizan pruebas por duplicado de cuajado en leche desnatada en diferentes

condiciones e induciendo la cuajada por precipitación ácida o mediante cuajo, de modo que en 12 tubos de tapa verde se realiza la siguiente distribución:

- 4 tubos con leche desnatada
- 4 tubos con leche desnatada y 30 g/L de ácido lactobiónico. Cada tubo contiene 40 mL de leche desnatada, por lo que se le añade 1,2 g de ácido lactobiónico.
- 4 tubos con leche diluida 1:2. La leche utilizada en los experimentos contiene 31 g de proteína/L por lo que, tras la dilución, la concentración de proteínas será la mitad. El objetivo es observar la influencia de la concentración de las proteínas en la formación de la cuajada.

De los 4 tubos de cada supuesto, dos de ellos serán sometidos a precipitación ácida y a otros dos se les añadirá cuajo.

Precipitación ácida:

Se le añade a cada tubo 2 mL de HCl 1 N y se calientan a 50°C. Si no se produce una separación de la cuajada y el suero, se puede centrifugar el tubo durante 1 minuto a 6000 g (Smith et al., 2016).

Coagulación con cuajo:

Se le añade 0,01 ml CaCl_2 (0,75 g/ml) a cada tubo. Posteriormente, se incorpora 0,005 g de cuajo (51 g de cuajo en 440 L) y se incuba a 35°C durante 45 minutos (Van Tassell et al., 2015).

❖ Determinación de proteína:

Se determina por el método de Bradford (Bradford, 1976), técnica espectrofotométrica basada en el cambio de color del colorante azul de Coomassie G-250. Se realiza la determinación de la absorbancia de la muestra a 595 nm que será proporcional a la concentración de proteína que contiene ésta. Se emplea NaCl 0,15M para realizar una dilución de la muestra 1:31. Posteriormente, se filtra la disolución para evitar que la biomasa interfiera en la espectrofotometría y se realiza la medición.

❖ Prueba de concentración de texturizante:

A los productos obtenidos de la fermentación secuencial en botella con CaCl_2 duplicada se les inoculó diferentes concentraciones de carragenato para determinar cuál de ellas es la más adecuada para obtener un producto cuya textura se asemeje a la del yogur. Tras obtener valores texturales del producto fermentado con 0,1% de carragenato (insuficientes para lograr una cuajada firme) en la anterior fermentación, en este caso se empleó el texturizante al 0,5%, 1% y 2%, inoculando 0,25 g, 0,5 g y 1 g de carragenato respectivamente en 50 ml de producto fermentado final.

❖ Determinación de sinéresis:

Mediante la diferencia del peso de la cuajada y del suero juntos con el peso solo de la cuajada se puede determinar el porcentaje de cuajada y suero que se ha formado en el producto lácteo obtenido.

6. Toma de muestra y métodos analíticos:

Todas las muestras tomadas de forma periódica de las fermentaciones a nivel de agitador orbital y de biorreactor son sometidas a las siguientes pruebas:

6.1 pH

Se toma de 2 mL de muestra en un tubo de tapón verde y se mide su pH (pH.meter BASCI 20+ CRISON).

6.2 Siembra en placas

Se toma una alícuota de 1 mL en un tubo Eppendorf y se realizan diluciones seriadas utilizando NaCl 0,7% (p/v) basándose en los resultados obtenidos en la curva de crecimiento de cada bacteria. Posteriormente, se realiza la siembra por triplicado en sábana de placas de NB y MRS para *P. taetrolens* y *L. casei*, respectivamente. Se

incubaban a 30°C, 48 horas y se procede al recuento de las colonias expresando los resultados obtenidos en ufc/mL.

6.3 Cromatografía HPLC

La misma alícuota del paso anterior se centrifuga (en Eppendorf Centrifuge 5415R) y el sobrenadante es empleado para determinar la concentración de lactosa, ácido lactobiónico y ácido láctico del producto que se va obteniendo mediante cromatografía de líquidos de alta eficacia. Para ello, y dado que la concentración de lactosa en las primeras horas es muy alta, se realiza la dilución 1:20 del sobrenadante



Figura 15. HPLC Agilent, 1200 series.

El equipo utilizado es Agilent, modelo 1200, y la fase móvil está compuesta por una disolución de ácido sulfúrico 0,450 mM (50 μ l de H₂SO₄ en 2 L de agua MiliQ). La disolución se filtra a vacío con un filtro de 0,45 μ m y se somete a un baño de ultrasonidos durante 30 minutos para eliminar burbujas. La elución es isocrática, manteniendo la composición de la fase móvil constante en todo el proceso. Para el mantenimiento de los canales y los filtros se emplea isopropanol.

El modelo de la columna del cromatógrafo es IC Sep ICE-ION-300 (Transgenomic Inc., USA). El flujo que atraviesa la columna es de 0,3 mL/min, a una temperatura constante de 75°C y con una presión de 40 bares aproximadamente. Además, se emplea

un detector del tipo RID (detector de índice de refracción) y Agilent ChemStation como software de recogida de datos.

6.4 Reología

Se ha empleado el reómetro Haake Mars II de Thermo Scientific asociado a un controlador de temperatura Peltier. El sensor es placa-placa de titanio de 90 mm de diámetro. La distancia de separación entre la placa superior y la inferior es de 1 mm y las condiciones de trabajo van a permanecer constantes en todas las muestras con un ritmo cortante de 0,01 a 10 1/s, a temperatura ambiente (20°C) y sin tiempo de adaptación, obteniéndose una curva de flujo.

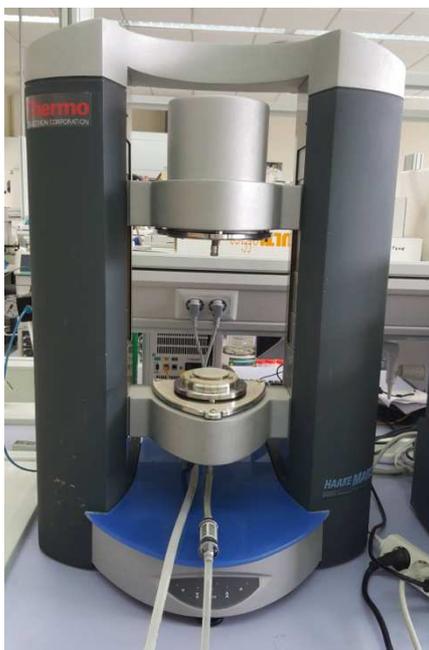


Figura 16. Reómetro Haake Mars II



Ilustración 17. Placa de titanio superior del reómetro

El reómetro se utilizó para determinar las propiedades físicas de los productos fermentados sin estructura de gel.

6.5 Análisis textural

El análisis de la textura de los productos fermentados con estructura de gel se llevó a cabo mediante un texturómetro TA.XTplus (Stable Micro Systems) con una sonda

esférica P/0.55, con la que se determinó la firmeza y la adhesividad de la muestra. La sonda se coloca en el brazo móvil del equipo y se le aplica una altura de trabajo de 40 mm. Se analizaron 50 mL de cada producto resultante de cada fermentación, utilizando como soporte un vaso de plástico fijo a la base del analizador. Los resultados de dureza y adhesividad obtenidos se muestran en gramos.



Figura 18. Sonda P/0.5 S



Figura 19. Analizador TA.XTplus, Stable Micro System

RESULTADOS

1. Fermentación de *P. taetrolens* en cultivo puro a nivel de agitador orbital y de biorreactor.

Los datos de pH y crecimiento registrados durante las dos fermentaciones se muestran en la figura 1:

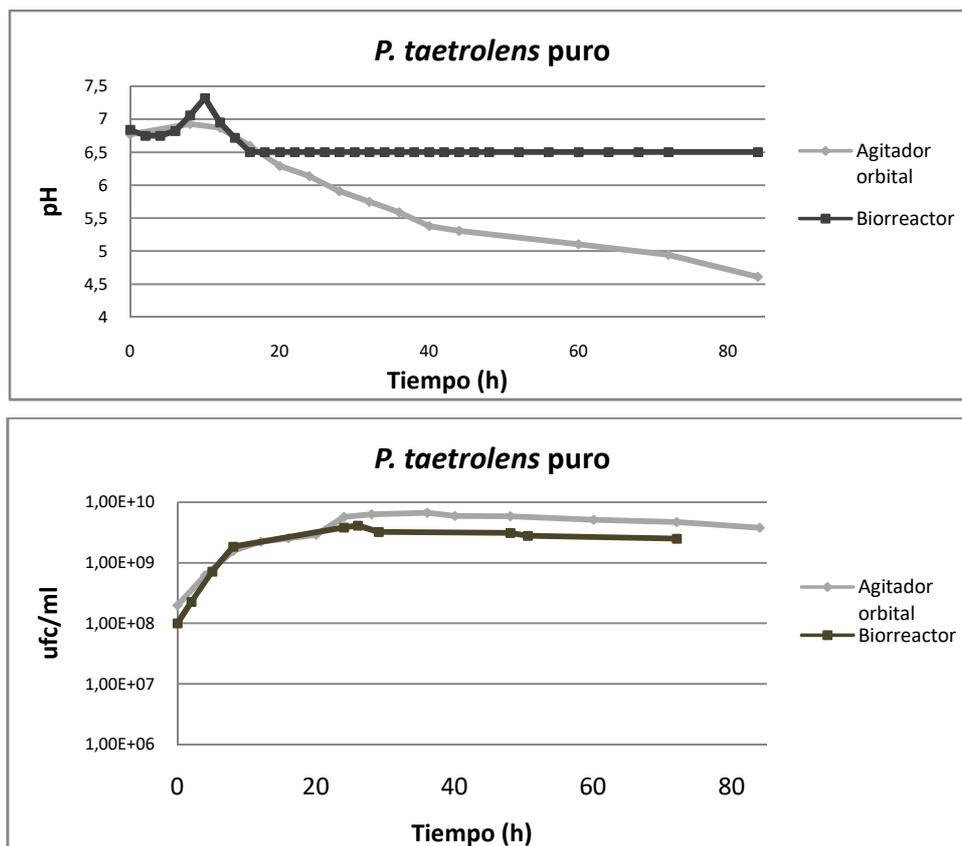


Figura 20. Evolución del pH (gráfica superior) y de las unidades formadoras de colonia (gráfica inferior) en la fermentación de *P. taetrolens* puro a nivel de agitador orbital y de biorreactor.

En ambas fermentaciones se observa en las primeras horas un aumento del pH desde 6,5 hasta valores entorno a 7, en el caso del biorreactor, o a 7,5 a nivel de agitador orbital. Este incremento de pH durante la fase de crecimiento exponencial puede ser debido a la presencia de nitrógeno como producto del metabolismo de proteínas (Alonso, 2013). A nivel de biorreactor, como estrategia de control de pH, se emplea la técnica “pH-shift” por lo que a partir de las 16 horas, el pH se mantiene constante a 6,5 siendo el valor óptimo de crecimiento para el metabolismo oxidativo de *P. taetrolens*

(Alonso, 2013) y evitando la caída hasta 4,5 que sí que presenta la fermentación llevada a cabo en el agitador orbital debido a la producción de ácido lactobiónico.

En cuanto a las unidades formadoras de colonias (UFCs), no existe una diferencia notoria entre el agitador orbital y el biorreactor ya que sus máximos $6,70 \times 10^9$ y a $4,10 \times 10^9$ ufc/ml respectivamente. Posteriormente, en ambos se detecta un leve descenso de las ufc/ml que puede deberse a la muerte del microorganismo.

La evolución de la utilización de lactosa y la producción de ácido lactobiónico a lo largo de la fermentación pura de *P. taetrolens* a nivel de agitador orbital y a nivel de biorreactor se representa en las siguientes figuras:

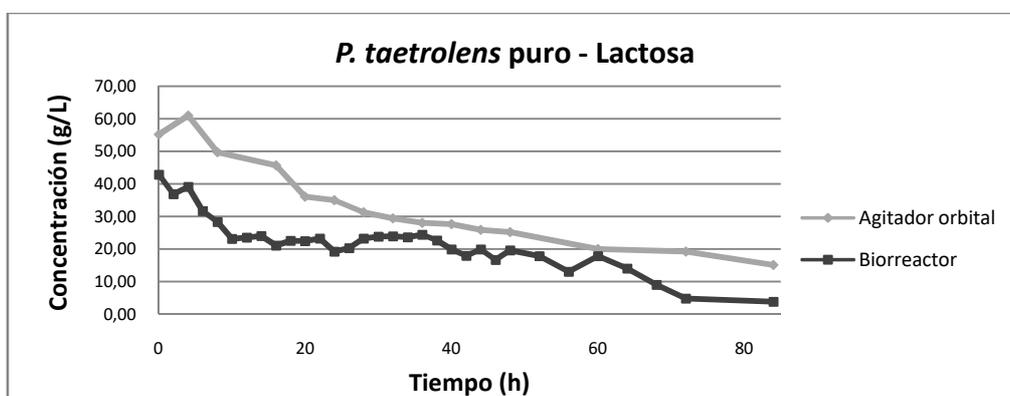


Figura 21. Evolución de la concentración de lactosa como sustrato de la producción de ácido lactobiónico en cultivo puro de *P. taetrolens* a nivel de agitador orbital y de biorreactor.

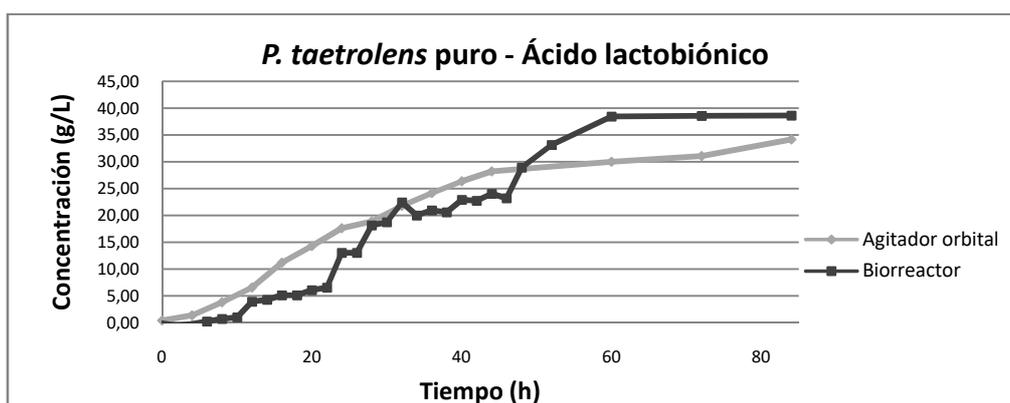


Figura 22. Evolución de la producción del ácido lactobiónico en la fermentación pura de *P. taetrolens* a nivel de agitador orbital y de biorreactor.

La lactosa representada en la figura 2 presenta un descenso en ambos casos debido a su utilización como sustrato para la producción del ácido lactobiónico. La concentración de lactosa disminuye hasta 15,15 g/L en el caso de la fermentación en agitador orbital y a valores de 3,81 g/L en el biorreactor.

En cuanto al ácido lactobiónico, a nivel de agitador orbital se llega a sintetizar 34,16 g/L a las 86 horas, mientras que en el biorreactor a las mismas horas se produce una concentración similar, 38,63 g/L.

Por tanto, con las fórmulas que aparecen a continuación, se calcula la productividad de ácido lactobiónico y el rendimiento sobre sustrato de ambos casos:

$$\text{Productividad} = \frac{\text{Concentración de ácido lactobiónico } \left(\frac{g}{L}\right)}{N^{\circ} \text{ de horas}}$$

Figura 23.Fórmula de la productividad de ácido lactobiónico.

$$\text{Rendimiento sobre sustrato} = \frac{\text{Sustrato consumido } \left(\frac{g}{L}\right)}{\text{Ácido lactobiónico producido } \left(\frac{g}{L}\right)}$$

Figura 24.Fórmula del rendimiento sobre sustrato.

Tabla 5.Se muestra la productividad de ácido lactobiónico y el rendimiento sobre sustrato de la fermentación pura de *P. taetrolens* a nivel de agitador orbital y de biorreactor.

	Productividad	Rendimiento sobre sustrato
Agitador orbital	0,406	0,88
 biorreactor	0,459	0,98

Como muestra la tabla 5, la productividad y el rendimiento sobre sustrato tanto en agitador orbital como a nivel de biorreactor presentan valores similares. Aún así, tanto el dato de la productividad como el del rendimiento es mayor en el biorreactor, lo que puede deberse al control del pH realizado en 6,5 que evita la inhibición ácida del microorganismo favoreciendo el mejor aprovechamiento del sustrato.

De la prueba de la fermentación de *P. taetrolens* en matraz se obtuvo que la fermentación transcurre más rápido (más lactobiónico en menos tiempo, por tanto más

productividad), pero se selecciona la botella frente al matraz por la necesidad de un mayor volumen de cultivo que permita monitorizar la fermentación durante más tiempo.

2. Fermentaciones secuenciales.

Tras el estudio del modelo de crecimiento de *P. taetrolens* en la leche desnatada y de las tasas de consumo de sustrato y de producción de ácido lactobiónico, se procede al estudio de la fermentación secuencial de *P. taetrolens* junto con *L. casei*.

2.1 pH:

La variación del pH de las fermentaciones secuenciales llevadas a cabo a nivel de agitador orbital se muestran en la figura 25.

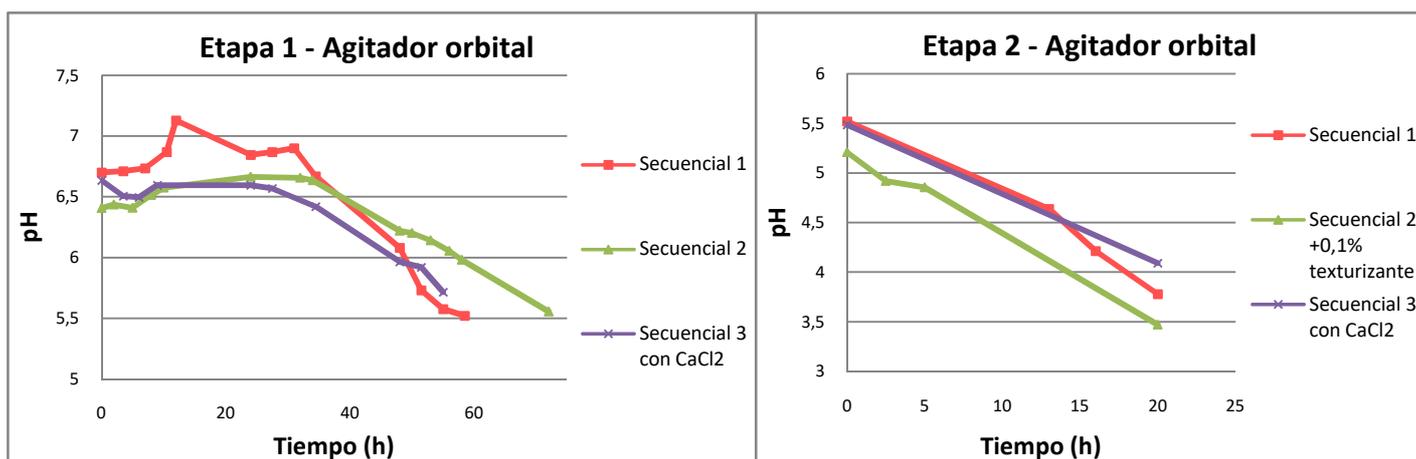


Figura 25. Evolución del pH en las diferentes fermentación secuenciales llevadas a cabo a nivel de agitador orbital. La gráfica de la izquierda, denominada “Etapa 1”, representa la fase de la fermentación secuencial realizada por *P. taetrolens*. La de la derecha, “Etapa 2”, muestra la fase en la que se inocula *L. casei*, posteriormente a la esterilización del medio de cultivo con la consecuente eliminación de *P. taetrolens*.

En el caso de *P. taetrolens*, en los tres casos se observa un pequeño ascenso del pH en las primeras horas, al igual que en el cultivo puro del apartado anterior, siendo mayor el aumento en el caso de la fermentación secuencial 1 que en las otras dos. En las siguientes horas, el pH comienza a descender de la misma forma que se producía en la fermentación pura del agitador orbital hasta valores entorno a 5,5, consiguiéndose con mayor rapidez en la fermentación secuencial 1 y en la secuencial 3 con CaCl_2 .

Posteriormente, las fermentaciones se detuvieron para inocular *L. casei*. En todos los casos, la fermentación se detuvo al alcanzar un pH aproximado de 5,5 ya que en trabajos anteriores (García et al., 2017b) se vio que un pH inicial menor a 5 impide el correcto desarrollo posterior de *L. casei*.

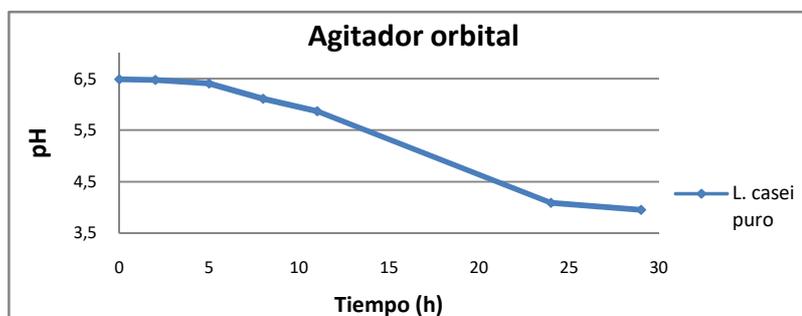


Figura 26. Evolución del pH en fermentación pura de *L. casei* en agitador orbital.

El descenso de pH llevado a cabo por este microorganismo se debe a la producción de ácido láctico. La fermentación pura de *L. casei* presenta un descenso del pH mucho más acusado que en las fermentaciones secuenciales, pasando de un pH de 6,5 en el inicio a un pH final de 3,95. Sin embargo, en las fermentaciones secuenciales parte de un valor entorno a 5 y desciende a un pH entre 3,85 y 3,47. La presencia del ácido lactobiónico se suma a la del ácido láctico alcanzándose valores de pH más ácidos que en un producto tradicional fermentado únicamente por bacterias ácido lácticas.

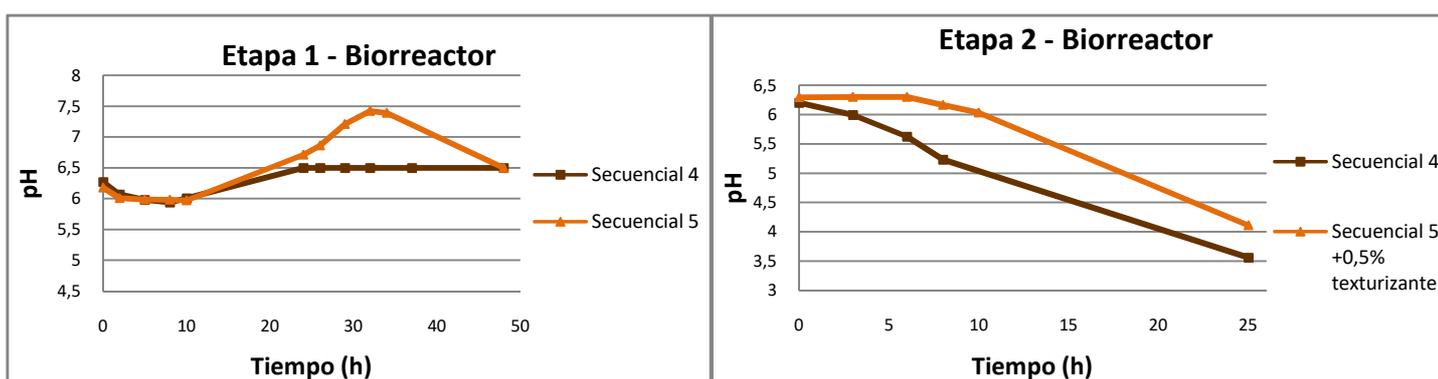


Figura 27. Evolución del pH en las diferentes fermentación secuenciales llevadas a cabo en biorreactor.

La gráfica de la izquierda, denominada “Etapa 1”, representa la fase de la fermentación secuencial realizada por *P. taetrolens*. La de la derecha, “Etapa 2”, muestra la fase en la que se inocula *L. casei*, posteriormente a la esterilización del medio de cultivo con la consecuente eliminación de *P. taetrolens*.

Durante las fermentaciones secuenciales de *P.taetrolens* se ha empleado la técnica “pH-shift”, en la que inicialmente se permite la variación libre del pH durante la fase de crecimiento exponencial de la bacteria. En esta situación, el pH vuelve a realizar una subida de igual características que en las fermentaciones anteriormente descritas. En el caso de la fermentación secuencial 5, la subida del pH transcurre de forma mucho más lento y de forma más pronunciada que la fermentación secuencial 4. En las horas posteriores, el pH se automatiza a 6,5 en ambas fermentaciones.

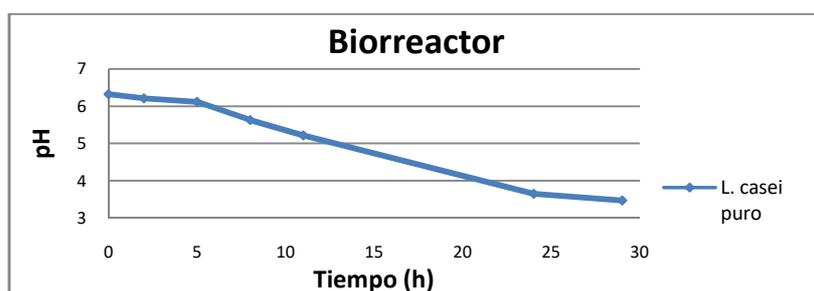


Figura 28. Evolución del pH en fermentación pura de *L. casei* en biorreactor.

En cuanto a la fermentación de *L. casei* en biorreactor, la fermentación pura transcurre de forma similar a la del agitador orbital. En la etapa 2 de la secuencial 4 del biorreactor, se produce un descenso del pH más rápido y más bajo que en la secuencial 5 con texturizante, llegando a las 24 horas a valores de pH de 3,56 en la primera y a 4,11 en la segunda. En ningún caso se alcanzaron valores inferiores a 3,5, como sucede en las fermentaciones ejecutadas sin control de pH. Este menor descenso de pH resulta favorable de cara a no obtener unos valores de acidez demasiado elevados que pudiesen desfavorecer la calidad organoléptica del producto final.

2.2 Unidades formadoras de colonias:

Los recuentos de las ufc se han llevado a cabo en los medios propios de cada bacteria, siendo el NB para la *P. taetrolens* y el MRS para *L. casei*.

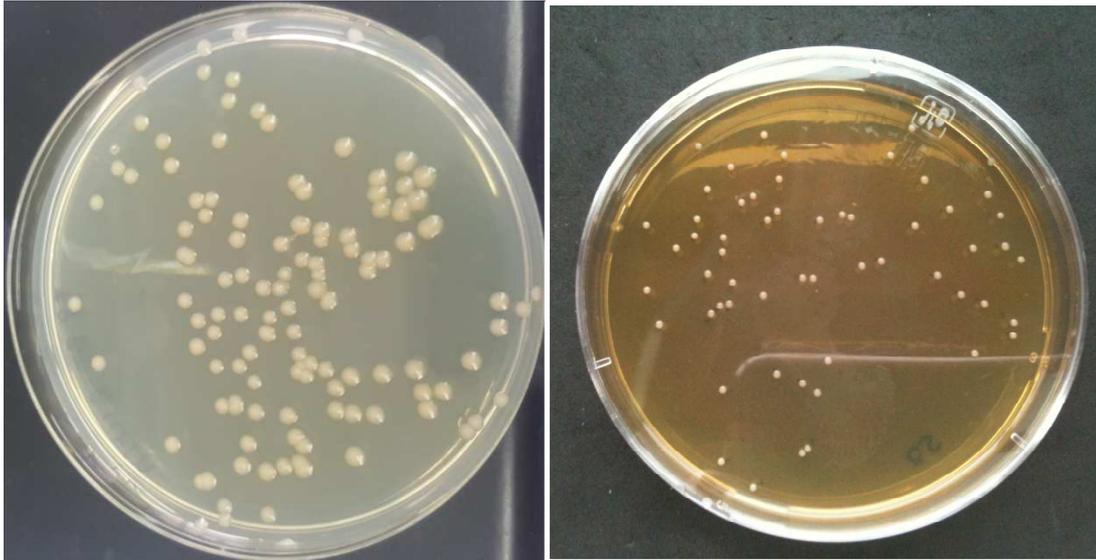


Figura 29. A la izquierda, placa de NB con colonias de *P. taetrolens*. A la derecha, placa de MRS con colonias de *L. casei*.

Los resultados obtenidos a nivel de agitador orbital se representan en las siguientes gráficas:

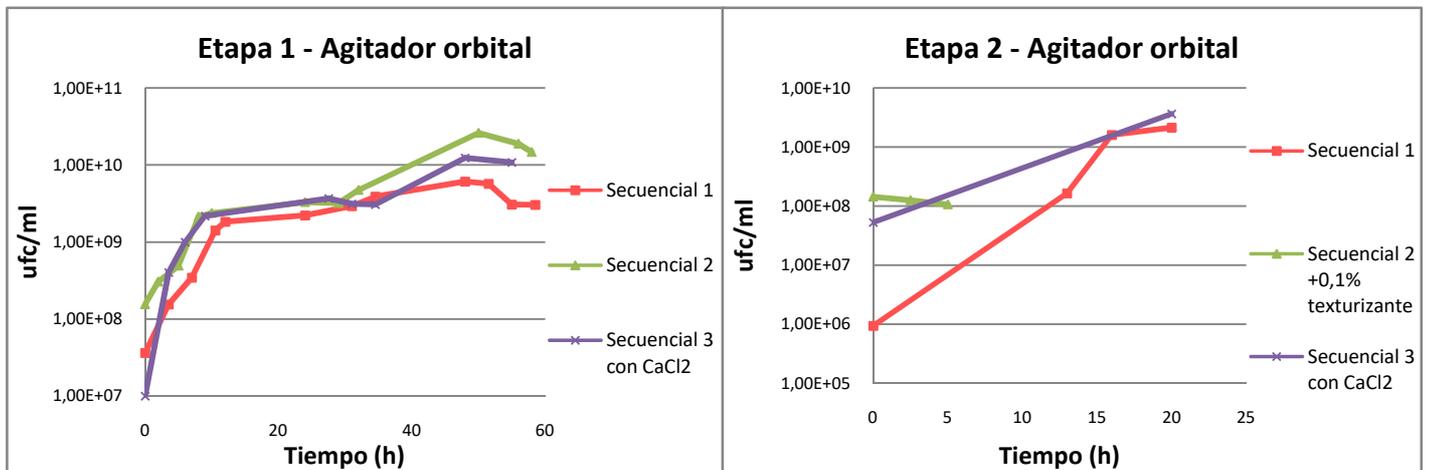


Figura 30. Evolución del crecimiento (ufc/ml) de las diferentes fermentaciones secuenciales llevadas a cabo en agitador orbital. La “Etapa 1” representa la fase de la fermentación secuencial realizada por *P. taetrolens*. La “Etapa 2” muestra la fase en la que se inocula *L. casei*, posteriormente a la esterilización del medio de cultivo con la consecuente eliminación de *P. taetrolens*.

P. taetrolens presenta una curva de crecimiento similar en las tres fermentaciones secuenciales llegando a presentar un pico mayor de $2,59 \times 10^{10}$ en la fermentación secuencial con texturizante. En las dos restantes, las ufc por mililitro máximas que se

alcanzaron fueron $6,10 \times 10^9$ en la fermentación secuencial y $1,23 \times 10^{10}$ en la secuencial con cloruro de calcio. Además, los picos máximos coinciden en los tres casos entre las 48 y las 50 horas.

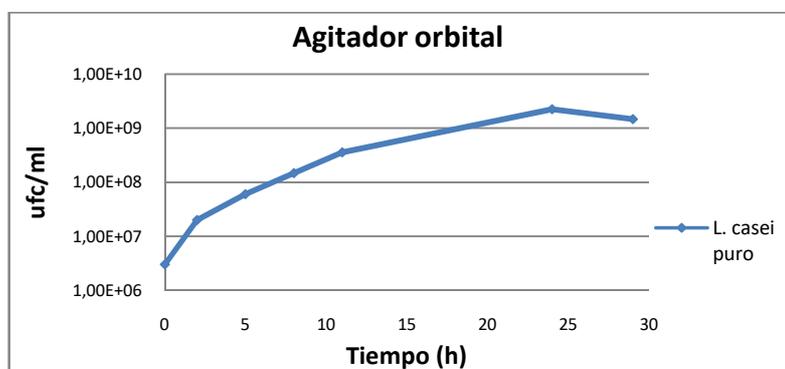


Figura 31. Evolución del crecimiento (ufc/ml) en fermentación pura de *L. casei* llevada a cabo a nivel de agitador orbital.

Tras la inoculación de *L. casei*, también se observa un crecimiento similar en la fermentación pura, secuencial 1 y la secuencial 3 con cloruro de calcio. En este caso, los máximos obtenidos son $2,23 \times 10^9$, $2,13 \times 10^9$ y $3,65 \times 10^9$ respectivamente entre las 20 y 25 horas.

Cabe destacar que el crecimiento de *L. casei* en la segunda etapa de la fermentación secuencial no parece verse negativamente afectado en ningún caso por la actividad previa de *P.taetrolens* ni por la presencia del ácido lactobiónico en el medio, ya que se alcanzan valores de biomasa dentro del mismo rango que cuando *L. casei* crece en cultivo puro.

En el caso de las fermentaciones en biorreactor, se ha procedido a realizar recuentos en placas de igual forma que en el caso anterior mostrándose los resultados en la figura 32.

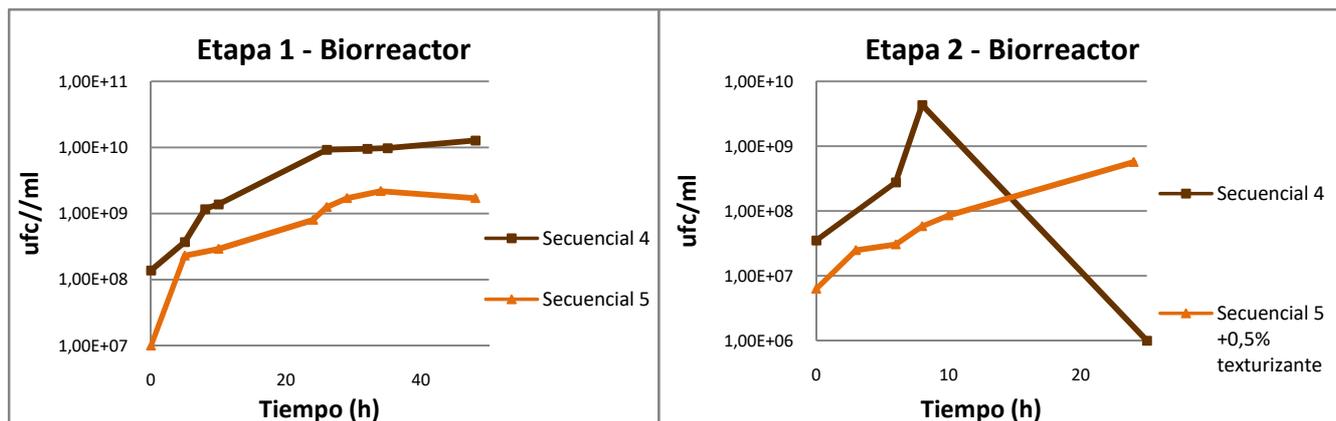


Figura 32. Evolución del crecimiento (ufc/ml) en las diferentes fermentaciones secuenciales llevadas a cabo en biorreactor. Se representa la etapa 1 (gráfica de la izquierda) perteneciente a la fermentación llevada a cabo por *P. taetrolens*, y la etapa 2 (gráfica de la derecha) en la que se inocula *L. casei* en ausencia del primer microorganismo fermentador.

El crecimiento de *P. taetrolens* es menor en la fermentación secuencial 5. El valor máximo obtenido es $2,17 \times 10^9$ mientras que en la fermentación secuencial 4 llega a $1,28 \times 10^{10}$.

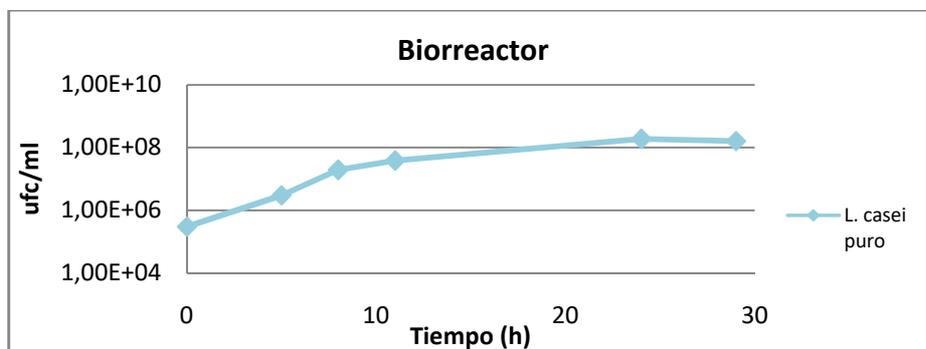


Figura 33. Evolución del crecimiento (ufc/ml) en fermentación pura de *L. casei* en biorreactor.

En la fermentación pura de *L. casei* se alcanzan valores de $1,87 \times 10^8$ ufc/ml a las 24 horas. En la segunda etapa de la fermentación secuencial 4 y 5 se observa un crecimiento exponencial desde el inicio hasta las 25 horas donde el recuento, en el caso de la fermentación secuencial 4, no se ha podido llevar a cabo. Igual que en el caso de las fermentaciones a nivel de agitador orbital, la etapa previa de oxidación llevada a cabo por *P.taetrolens* no perjudica el posterior desarrollo de *L.casei*, alcanzándose valores de UFC/mL incluso mayores a las 10 horas de cultivo en la fermentación secuencial.

2.3 Lactosa, ácido lactobiónico y ácido láctico

Las concentraciones de lactosa de las fermentaciones en botella muestran una tendencia descendente debido a que es el sustrato de la reacción tanto de *P. taetrolens* para la síntesis del ácido lactobiónico, como de *L. casei* para la producción del ácido láctico. La concentración de la que se parte es variable, encontrando valores iniciales entre 27 y 44 g/L, al igual que las concentraciones finales que engloban valores entre 19,5 y 14,5 g/L. El mayor descenso tiene lugar en la fermentación secuencial 2 con texturizante, pasando de 44 g/L a 14,50 g/L.

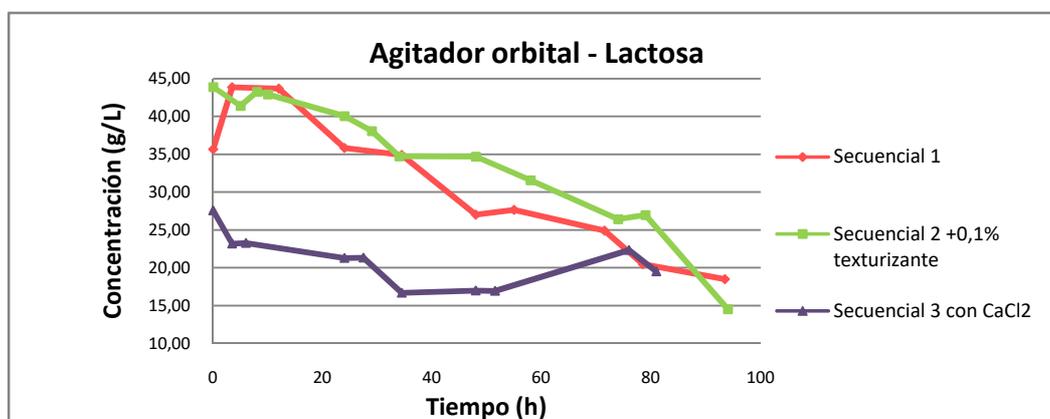


Figura 34. Evolución de la concentración de lactosa (g/L) en las diferentes fermentaciones secuenciales llevadas a cabo a nivel de agitador orbital.

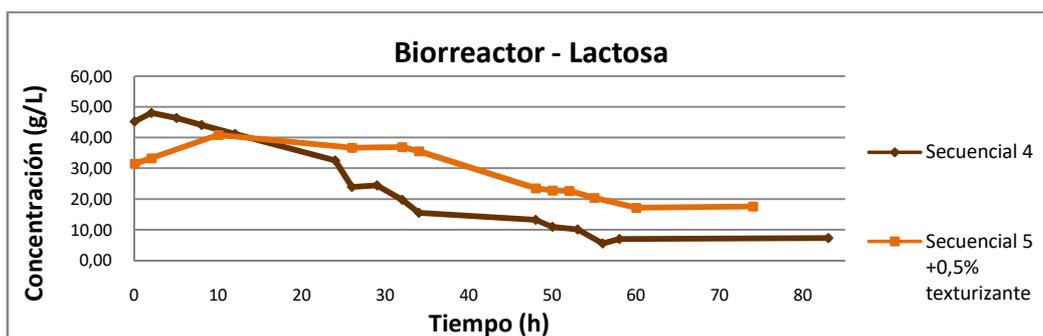


Figura 35. Evolución de la concentración de lactosa (g/L) en las diferentes fermentaciones secuenciales llevadas a cabo en el biorreactor.

En el caso de las fermentaciones llevadas a cabo en el biorreactor, también existe un descenso esperable en la concentración de la lactosa. En la fermentación secuencial 4 la disminución de la lactosa comienza en 45,26 g/L llegando a valores finales de 7,31g/L, el mayor descenso de las cinco fermentaciones.

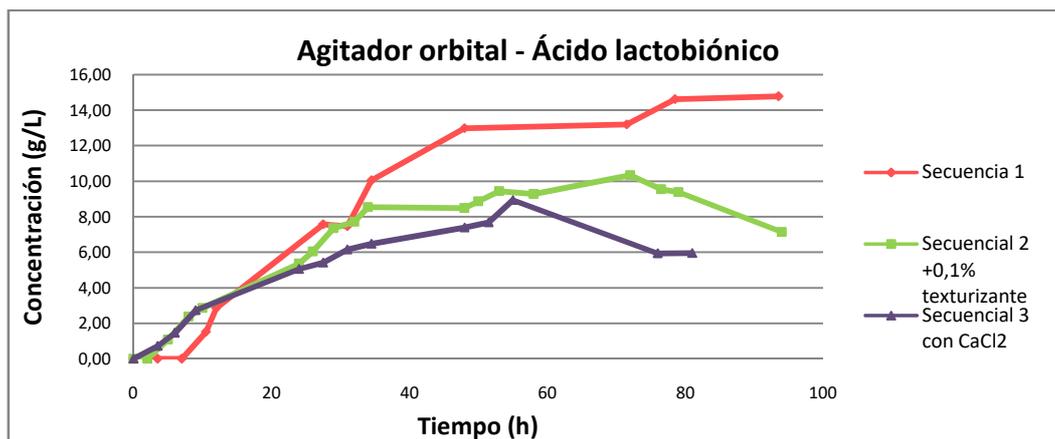


Figura 36. Evolución de la concentración de ácido lactobiónico (g/L) en las diferentes fermentaciones secuenciales llevadas a cabo a nivel de agitador orbital.

El ácido lactobiónico presenta una tendencia ascendente esperable debido a su síntesis por parte de *P. taetrolens*. La fermentación secuencial 1 es la que más concentración de ácido lactobiónico ha obtenido, con un máximo de 14,79 g/L. Seguido de ésta se encuentra la fermentación secuencial 2 con texturizante, con 10,34 g/L, y la secuencial 3 con cloruro de calcio cuyo máximo ha sido de 8,94 g/L. En esta última queda reflejado que la presencia de calcio no influyó en la retención del ácido lactobiónico en la cuajada, sería necesario realizar otros estudios incrementando la concentración del calcio.

Tanto la fermentación secuencial 2 como la 3 muestran un pequeño descenso en la concentración del ácido lactobiónico en las últimas horas que puede deberse a que tras la inoculación de *L. casei*, el producto fermentado comienza a cuajarse y la toma de muestra es dificultosa. También, en trabajos anteriores (García et al., 2017b) se ha visto que *L. casei* consume la lactosa en primer lugar dentro de su jerarquía de consumo de carbohidratos, observándose sólo un pequeño consumo de ácido lactobiónico cuando aún queda lactosa en el medio.

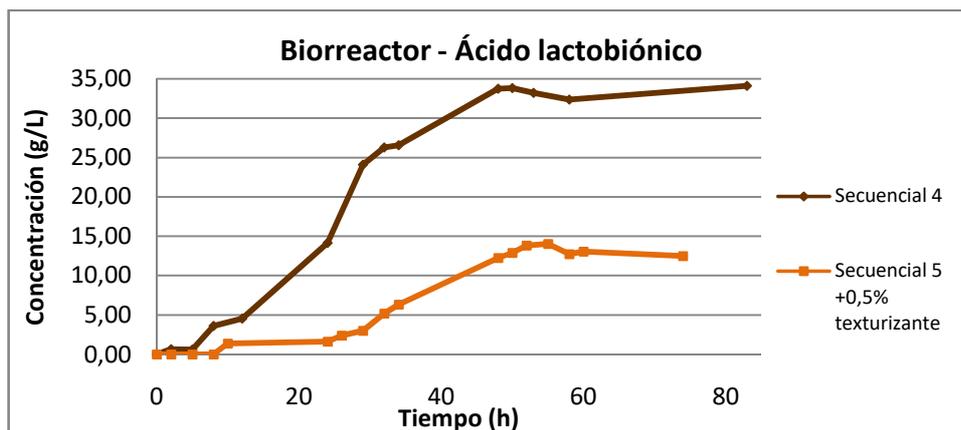


Figura 37. Evolución de la concentración de ácido lactobiónico (g/L) en las diferentes fermentaciones secuenciales llevadas a cabo a nivel de biorreactor.

En la figura 37, a nivel de biorreactor, se observa también un aumento del ácido lactobiónico. Tanto en las fermentaciones en biorreactor como en las de agitador orbital la producción se realiza de forma muy pronunciada hasta aproximadamente las 48 horas, momento en el que se para la fermentación y se elimina la pseudomona para inocular el *L. casei*.

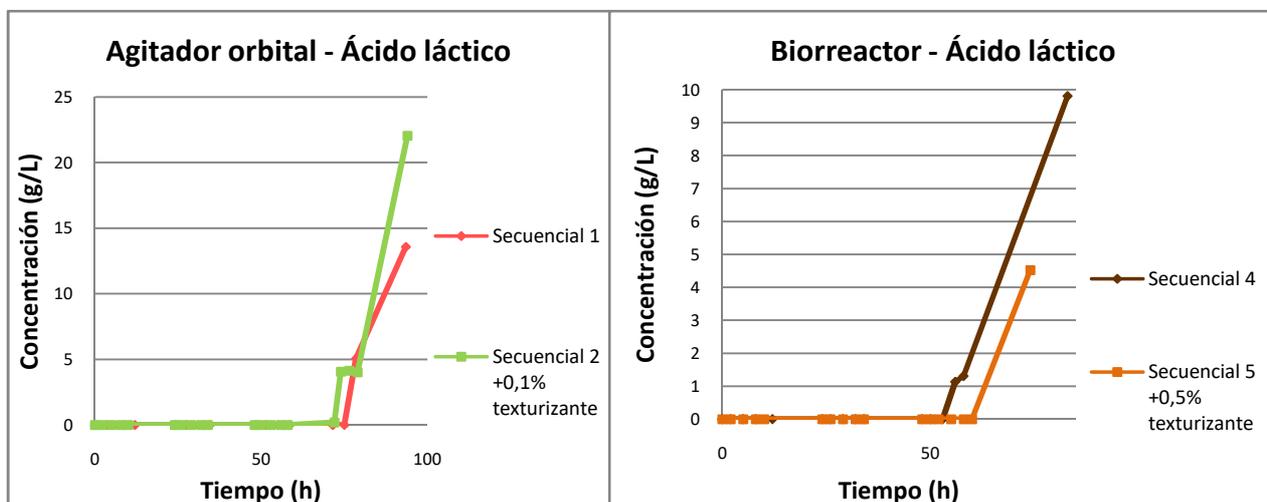


Figura 38. Evolución de la concentración de ácido láctico (g/L) en las diferentes fermentaciones secuenciales llevadas a cabo a nivel de agitador orbital (en la gráfica de la izquierda) y en la secuencial a nivel de biorreactor (gráfica de la derecha).

El ácido láctico comienza a sintetizarse solo a partir de la inoculación de *L. casei*, obteniéndose la mayor concentración en este caso en la fermentación secuencial 2 con texturizante, 22,03 g/L. A nivel de biorreactor, se observa el mismo patrón de

producción que en el caso anterior, alcanzándose una concentración de 9,80 g/L en la fermentación secuencial 4 y 4,60 en la secuencial 5 con texturizante.

3. Caracterización del producto obtenido

Una vez caracterizado el proceso de elaboración del producto fermentado lácteo enriquecido en ácido lactobiónico, se procede a caracterizar el producto fermentado final de las fermentaciones.

3.1 Caracterización textural

Para determinar la textura que presentan los productos finales obtenidos de las fermentaciones que se enumeran a continuación, se han sometido a pruebas con el texturómetro y el reómetro dependiendo de si la estructura es de tipo gel o no. Esta caracterización permite, además, determinar el efecto de la oxidación de la pseudomona y la presencia del ácido lactobiónico sobre las propiedades físicas del producto final, comparado con las encontradas en un producto tradicional fermentado sólo por bacterias ácido lácticas.

- Fermentaciones a nivel de agitador orbital $\left\{ \begin{array}{l} - \text{ L. casei} \\ - \text{ Secuencial 1} \end{array} \right.$

- Fermentaciones en biorreactor $\left\{ \begin{array}{l} - \text{ L. casei} \\ - \text{ Secuencial 4} \end{array} \right.$

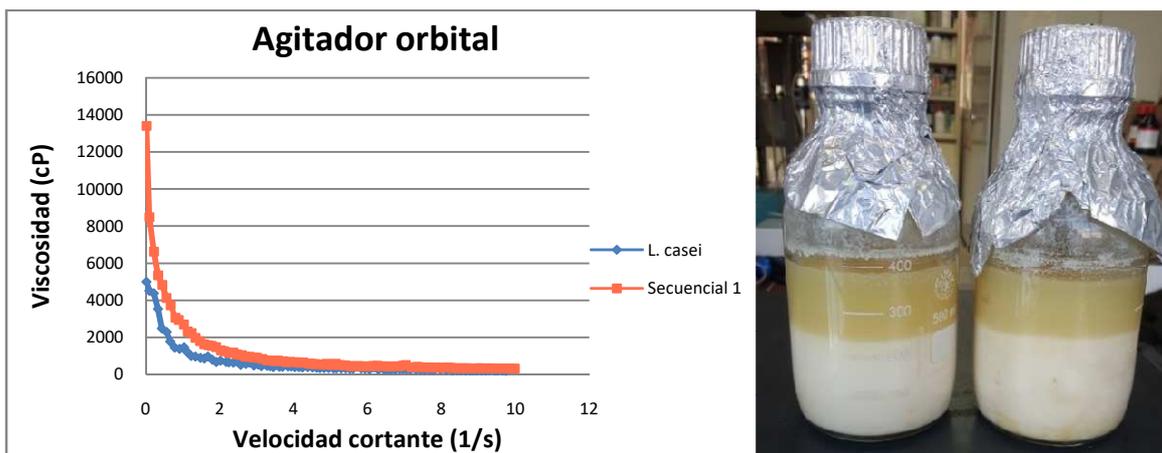


Figura 39. A la izquierda, se muestra la curva de flujo de las fermentaciones de *L. casei* puro y secuencial llevadas a cabo a nivel de agitador orbital, en las que se representan los datos obtenidos en el reómetro de la viscosidad frente a la velocidad cortante. A la derecha, fotografía del producto final obtenido en la fermentación secuencial.

Como se observa en la figura 39, en el caso de las fermentaciones a nivel de agitador orbital, tanto el producto obtenido de la fermentación pura de *L. casei* como la secuencial 1, han sido sometidos a pruebas de reología dada su apariencia líquida. Los resultados obtenidos indican que a medida que aumenta la velocidad de deformación, la viscosidad disminuye por lo que ambos productos tienen un comportamiento pseudoplástico.

Tabla 6. Tabla que muestra la viscosidad media del producto obtenido por las diferentes fermentaciones y su desviación estándar.

Tipo de fermentación	Viscosidad (cP)	Desviación estándar
<i>L. casei</i> biorreactor	4,49	0,34
Secuencial biorreactor	4,05	0,32

En cuanto a las fermentaciones en biorreactor presentan una viscosidad muy baja, cercana a la del agua que es 1 cP. Además, existe una oscilación que tiende a mantenerse constante (figura 40).

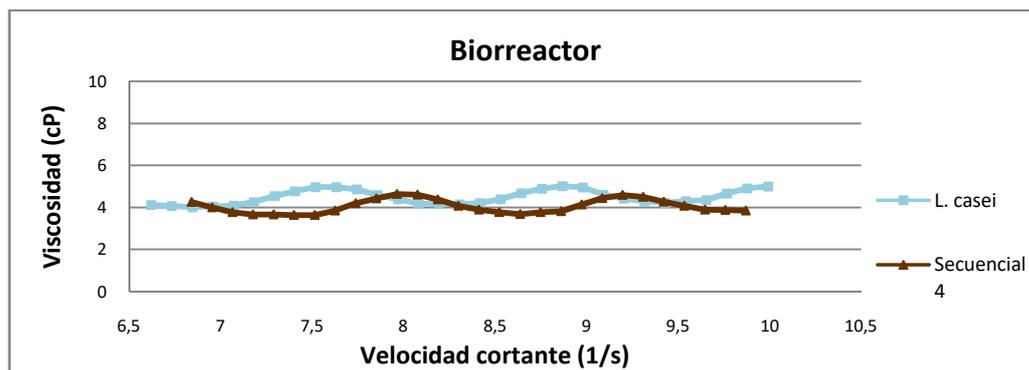


Figura 40. Curvas de flujo de las fermentaciones llevadas a cabo en biorreactor. Se representa la viscosidad (cP) respecto a la velocidad cortante mostrándose una oscilación constante y con valores de viscosidad muy bajas.

Por tanto, las fermentaciones en botella son más viscosas que aquellas llevadas a cabo a nivel de biorreactor. A nivel de agitador orbital, la fermentación secuencial 1 es más viscosa que la pura de *L. casei*, hecho razonable dado a que la secuencial 1 cuenta con una cierta concentración de ácido lactobiónico que, como ya se ha indicado anteriormente, es un agente gelificante. A nivel de biorreactor, sin embargo no existe mucha diferencia, ambas fermentaciones tienen una viscosidad muy baja. Las pruebas de cuajado realizadas corroboraron que el ácido lactobiónico no interfiere negativamente en la formación de la cuajada (de hecho se supone que la debería favorecer), por lo que la falta de cuajado y la baja viscosidad obedece a la agitación interna del biorreactor.

3.2 Sinéresis

La prueba de desuerado permite determinar el porcentaje de suero y de cuajada que se ha obtenido en cada producto fermentado. Se ha podido realizar el experimento solo en aquellos en los que se ha producido la separación del suero y de la cuajada, los cuales se muestran en la tabla 7. Las fermentaciones llevadas a cabo en biorreactor presentan un porcentaje mucho más alto de suero (44,28 y 47,26%) que la fermentación secuencial en agitador orbital (26,92%). El bajo porcentaje de suero en el caso del agitador orbital puede deberse a la rotura de la cuajada al homogenizar durante la toma de muestra.

Tabla 7. Se muestra el porcentaje de cuajada y de suero obtenidos en aquellos productos fermentados en los que se produjo la sinéresis.

Tipo de fermentación	% CUAJADA	% SUERO
Secuencial en agitador orbital	73,08	26,92
<i>L. casei</i> puro en biorreactor	55,72	44,28
Secuencial en biorreactor	52,74	47,26



Figura 41. A la izquierda se observa el desuerado del producto fermentado obtenido del proceso secuencial en biorreactor. A la derecha, sin embargo, se muestra el producto elaborado a partir de la fermentación de *P. taetrolens* en el biorreactor, en el cual, no se ha llevado a cabo la separación del suero y la cuajada.

3.3 Proteína

A partir de los datos de absorbancia del espectrofotómetro obtenidos con el método de Bradford y con la recta de calibrado se obtuvo la concentración de proteína en g/L de las siguientes fermentaciones:

Tabla8. En la tabla se exponen las concentraciones de proteína determinadas a partir del método Bradford de las diferentes fermentaciones llevadas a cabo.

Tipo de fermentación	Concentración de proteína (g/L)
L. casei agitador orbital	1,26
L. casei biorreactor	0,44
Secuencial agitador orbital	1,39
Secuencial biorreactor	0,47



Figura 42. Fotografía en la que se observa el experimento del método de Bradford. El primer tubo empezando por la izquierda es el blanco, siendo los dos siguientes la fermentación de *L. casei* pura y la fermentación secuencial 4, ambas en biorreactor. Las dos últimas son la fermentación de *L. casei* pura y la secuencial 1, en este caso a nivel de agitador orbital. Existe un cambio de color hacia un tono azul, siendo más notorio en los tubos que pertenecen a las muestras del agitador orbital, lo que indica que la concentración de proteína en éstos es mayor que en los del biorreactor.

4. Ensayos de aditivación

La obtención de productos fermentados con poca consistencia, así como el alto porcentaje de desuerado descrito anteriormente (del 27% en el menor de los casos), hacen interesante la adición de texturizante con el objetivo de obtener productos fermentados con mayor consistencia y evitar la separación del suero. Por tanto, se han llevado a cabo fermentaciones secuenciales a los que se les incorporó carragenato al 0,1% y al 0,5%. Los productos obtenidos presentaron cierto grado de cuajada, por lo que se sometieron a análisis con el texturómetro.

Tabla 9. Tabla en la que se refleja los valores de firmeza (g) y adhesividad (g) obtenidos al someter los productos finales de las fermentaciones secuenciales con texturizante a análisis con el texturómetro.

Tipo de fermentación	Firmeza (g)	Adhesividad (g)
Secuencial con 0,1% texturizante agitador orbital	189,933	-33,8745
Secuencial con 0,5% de texturizante biorreactor	101,055	-3,727

Los datos que se observan en la tabla 9 muestran que de la introducción de un 0.1% de texturizante se obtuvieron valores de firmeza y de adhesividad mayores que con el 0,5% de carragenato en el biorreactor, hecho que pone nuevamente de relieve el efecto de la agitación interna en el biorreactor alterando la formación de la red proteica.



Figura 43. Producto obtenido de la fermentación secuencial 5 con 0,5% de carragenato a nivel de biorreactor. En la imagen superior se observa el producto final en el propio biorreactor. En ella se puede observar la zona central tras el proceso de agitación interna. En la imagen inferior se muestra el mismo producto en el recipiente utilizado para la medición en el texturómetro.



Figura 44. Producto fermentado obtenido de la fermentación secuencial 2 con 0,1% de carragenato a nivel de agitador orbital.

En el caso de la fermentación secuencial con texturizante del biorreactor, también se analizó con el reómetro obteniéndose resultados que indican que se trata de un fluido pseudoplástico.

Además, también se han realizado ensayos integrando el carragenato una vez obtenido el producto final de la fermentación. En este caso, se añadieron concentraciones de texturizante superiores al 0.5%, con el objetivo de obtener productos fermentados con texturas más firmes.

Tabla 10. En la tabla se refleja los valores de firmeza (g) y adhesividad (g) obtenidos al incorporar diferentes concentraciones de carragenato al producto obtenido a nivel de agitador orbital y de biorreactor.

	Concentración de carragenato	Firmeza (g)	Adhesividad (g)
Agitador orbital	1%	80,39	-4,14
	2%	661,11	-16,17
Biorreactor	1%	257,42	-6,96
	1,50%	366,62	-5,30
	2%	977,31	-8,11

Como cabe esperar, a medida que se aumenta la concentración de carragenato, tanto la cohesividad y firmeza como la adhesividad de la cuajada aumenta. Como se observa en la tabla10, aunque la incorporación de carragenato se produzca en la misma concentración en el caso del 1% y del 2% en ambas muestras, la firmeza de la muestra obtenida en biorreactor es mayor en los dos casos, observándose una diferencia de más de 170 g en el caso del 1% y de más de 300 g en el 2%. A nivel de agitador orbital también se realizó la prueba con 0,5% de texturizante sin llegar a producirse una cuajada consistente. Los resultados obtenidos a nivel de agitador orbital se muestran en la siguiente figura:



Figura 45. Producto obtenido a nivel de agitador orbital al que se le aplicó 0,5%, 1% y 2% de carragenato.



Figura 46. Producto obtenido a partir de una fermentación secuencial a nivel de agitador orbital con 2% de carragenato.

En las imágenes se observa la textura líquida de la muestra con menor concentración de carragenato y la textura más consistente de la muestra que contiene el 2% de concentración. Esta última presenta una textura más firme que la de un yogur comercial mientras que la del 0,5 es más bien del tipo yogur líquido. En la muestra que contiene el 1% de carragenato se observó una textura media entre las otras dos concentraciones.



Figura 47. Producto fermentado obtenido a nivel de biorreactor al que se le aplicó 1%, 1,5% y 2% de carragenato



Figura 48. Producto obtenido a partir de una fermentación secuencial a nivel de biorreactor con 1,5% de carragenato (imágenes superiores) y con el 2% de carragenato (imágenes inferiores).

En el caso de las pruebas de texturizante en el producto obtenido del biorreactor se obtuvieron resultados similares a las anteriores, siendo la concentración del 2% la proporciona al producto fermentado final una textura más firme.

5. Tabla resumen de los productos finales

Las siguientes tablas muestran las características que poseen los productos fermentados finales que se han elaborado en este proyecto.

Tabla 11. En la tabla se muestran las características que posee cada producto fermentado final del agitador orbital, tanto las ufc/ml de *P. taetrolens* y de *L. casei* como la concentración de lactosa, ácido lactobiónico, ácido láctico y de proteínas de cada uno.

	Agitador orbital				
	<i>P. taetrolens</i>	<i>L. casei</i>	Secuencial	Secuencial +0,1%	Secuencial +CaCl ₂
ufc/ml <i>P. taetrolens</i>	3,77 x 10 ⁹	-	-	-	-
Ufc/mL <i>L. casei</i>	-	1,47 x 10 ⁹	3,02 x 10 ⁹	5,48 x 10 ⁹	1,08 x 10 ¹⁰
Lactosa (g/L)	27,08	32,12	18,48	14,50	19,50
Ácido lactobiónico (g/L)	24,56	-	14,79	7,13	5,95
Ácido láctico (g/L)	-	11,98	13,57	22,03	0,42
Proteínas (g/L)	-	1,26	1,39	-	-

Tabla 12. En la tabla se muestran las características que posee cada producto fermentado final del agitador orbital, tanto las ufc/ml de *P. taetrolens* y de *L. casei* como la concentración de lactosa, ácido lactobiónico, ácido láctico y de proteínas de cada uno.

	Biorreactor			
	<i>P. taetrolens</i>	<i>L. casei</i>	Secuencial	Secuencial +0,5%
ufc/ml <i>P. taetrolens</i>	2,50 x 10 ⁹	-	-	-
ufc <i>L. casei</i>	-	1,60 x 10 ⁸	0	5,63 x 10 ⁸
Lactosa (g/L)	3,18	30,42	7,31	17,60
Ácido lactobiónico (g/L)	28,63	-	34,10	12,50
Ácido láctico (g/L)	-	7,72	9,80	4,53
Proteínas (g/L)	-	0,44	0,47	-

CONCLUSIONES

En vista a los resultados obtenidos en este proyecto, se extrajeron las siguientes conclusiones:

- *P. taetrolens* en cultivo puro es capaz utilizar la leche desnatada como fuente de carbono, mostrando un crecimiento similar tanto a nivel de agitador orbital como de biorreactor, con valores máximos de $6,70 \times 10^9$ y $4,10 \times 10^9$ ufc/ml, respectivamente.
- El escalado a nivel de biorreactor permite mejorar la producción de ácido lactobiónico, obteniéndose valores más elevados que en agitador orbital tanto de productividad (aumenta de 0,406 a 0,459) como de rendimiento en sustrato (de 0,88 a 0,98).
- El sistema de fermentación secuencial resulta adecuado para la obtención de un producto fermentado simbiótico conteniendo ácido lactobiónico y *L.casei*, no observándose un efecto negativo en el crecimiento de *L. casei* ocasionado por la presencia de ácido lactobiónico en el medio o por la actividad oxidativa desempeñada previamente por *P.taetrolens*.
- El desarrollo de las fermentaciones en agitador orbital resulta en productos finales más viscosos que los generados en biorreactor, debido a que en el biorreactor la agitación interna rompe la red proteica dando lugar a viscosidades más bajas.
- La adición de carragenato como agente texturizante al 0,1 y 0,5% durante el proceso de fermentación secuencial resulta insuficiente para conseguir productos de mayor firmeza y, en el caso de las fermentaciones en agitador orbital, para evitar el desuerado.
- La adición de concentraciones más elevadas de carragenato sobre los productos fermentados finales permite obtener texturas más firmes, siendo necesario llevar a cabo más pruebas que permitan determinar la concentración más adecuada dentro del rango del 1-1,5%.

BIBLIOGRAFÍA

- Adebola, OO; Corcoran, O; Morgan, WA. "Synbiotics: the impact of potential prebiotics inulin, lactulose and lactobionic acid on the survival and growth of lactobacilli probiotics." *Journal of Functional Foods*. Vol. 10, (2014) p. 75 – 84.
- Alarcón, S. "Evaluación del uso de carragenina en bebidas lácteas fermentadas. Revisión bibliográfica." Tesis doctoral, Chile 2003.
- Alonso, S. "Obtención de ácidos orgánicos por fermentación de subproductos lácteos." Tesis doctoral, Universidad de Oviedo 2013.
- Alonso, S; Rendueles, M; Díaz, M. "Efficiente lactobionic acid production from whey by *Pseudomonas taetrolens* under pH-shift conditions." *Bioresource Technology*. Vol. 102, (2011) p. 9730 - 9736.
- Alonso, S; Rendueles, M; Díaz, M. "Simultaneous production of lactobiónico and gluconic acid in cheese whey/glucose co-fermentation by *Pseudomonas taetrolens*." *Bioresource Technology*. Vol. 196, (2015) p. 314 - 323.
- Baldwin, C; Akashe, A; Lyn, B; Márquez-Sánchez, M. "Mineral complexes of lactobiónico acid and method of using for mineral fortification of food products." Patente nº US 7,781,002 B2 (2010).
- Bradford, MM. "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." *Analytical Biochemistry*. Vol. 72, (1976) p. 248 – 254.
- Bride, E. "Hidroxiácidos. Ayer, hoy y mañana: agentes terapéuticos en Dermatología." *Medicina Cutánea Ibero-Latino-Americana*. Vol.32, n.6 (2004), p. 265-270.
- Cobo, JM; Mateos, JA; Muñoz A. "Effect of *Lactobacillus casei* on the incidence of infectious conditions in children." *Nutrición Hospitalaria*. Vol. 21, n.4 (2006).
- Cobos, S. "Dairy sector in Spain." Trabajo Fin de Grado. Grado en Economía, Universidad de León 2016.
- Díaz, M. "Ingeniería de bioprocesos." Madrid, Paraninfo, 2012.
- Fuentes-Berrio, L; Acevedo-Correa, D; Gelvwz-Ordoñez, VM. "Functional foods; Impact and challenges for development and welfare society Colombian."

- Biocología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*. Vol. 13, n. 2 (2015) p. 140 – 149.
- García, C; Rendueles, M; Díaz, M. “Microbial amensalism in *Lactobacillus casei* and *Pseudomonas taetrolens* mixed culture.” *Bioprocess and Biosystems Engineering*. Vol. 40, nº7 (2017a) p. 1111-1122.
 - García, C; Rendueles, M; Díaz, M. “Synbiotic fermentation for the co-production of lactic and lactobionic acids from residual dairy whey.” *Biotechnology Progress*. (2017b) (en prensa. doi: 1002/btpr.2507.).
 - García, G. “Texturometría Instrumental: Puesta a punto y aplicación a la tecnología de alimentos.” Proyecto Fin de Máster. Máster de Biotecnología Alimentaria, Universidad de Oviedo 2012.
 - Gibson, GR; Probert, HM; Van Loo J; Rastall RA; Roberfroid MB. “Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics.” *Nutrition Research Reviews*. Vol. 17, n.2 (2004) p. 259 – 275.
 - Gibson, GR; Roberfroid, MB. “Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics.” *Journal of Nutrition*. Vol. 125, n.6 (1995) p. 1401 -1412.
 - Goderska, K; Szwengiel, A; Czarnecki, Z. “The Utilization of *Pseudomonas taetrolens* to Produce Lactobionic Acid.” *Applied Biochemistry and Biotechnology*. Vol. 173, n.8 (2014) p. 2189 – 2197.
 - Gösta, M. “Manual de Industrias Lácteas.” Madrid, Tetra Pak, 1996.
 - Gotteland, M. “Alimentos simbióticos.” *Indu Alimentos* (2010).
 - Jamuna, M; Jeevaratnam, K. “Isolation and characterization of lactobacilli from some traditional fermented foods and evaluation of the bacteriocins.” *The Journal of General and Applied Microbiology*. Vol. 50 (2004) p. 79 – 90.
 - Kiryu, T; Yamauchi, K; Masuyama, A; Ooe, K; Kimura, T; Kiso, T; Nakano, H; Murakami, H. “Optimization of lactobionic acid production by *Acetobacter orientalis* isolated from Caucasian fermented milk, ‘Caspian Sea Yogurt’.” *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. Vol. 76, n.2 (2012) p. 361 – 363.

- Lemoine, R. “European dairy sector rising to all challenges.” *Revue Laitière Française*. N. 767 (2016).
- Nishizuka, Y; Hayaishi, O. “Enzymic formation of lactobiónico acid from lactose.” *The Journal of Biological Chemistry*. Vol. 237, n.9 (1962).
- Ortega, RM; Marcos, A; Aranceta, J; Mateos, JA; Requejo, AM; Serra, L. “Alimentos funcionales. Probióticos.” Madrid, Medica Panamericana, 2002.
- Pardo, ME; Almanza, F. “Guía de procesos para la elaboración de productos lácteos.” Bogotá, CAB, 2003.
- Prieto-Hontoria, P. “Innovación y tendencias alimentarias.” *Contribuciones Científicas y Tecnológicas*. Vol. 41 (2016).
- Ramírez, JC; Rosas, P; Yanira, M; González, V; Ulloa, JA; Arce, F. “Bacterias lácticas: importancia en alimentos y sus efectos en salud.” *Revista Fuente*. N.7 (2011)
- Saarela, M; Hallamaa, K; Mattila-Sandholm, T; Mättö, J. “The effect of lactose derivatives lactulose, lactitol and lactobiónico acid on the functional and technological properties of potentially probiotic *Lactobacillus* strains.” *International Dairy Journal*. Vol. 13, (2003) p. 291-302.
- Sarao, LK; M, A. “Probiotics, prebiotics and microencapsulation – A review.” *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. Vol. 52, n.2 (2017) p. 344- 371.
- Skoog, DA; West, DM; Holler, FJ. “Fundamentos de química analítica (II).” Barcelona, Editorial Reverté, S. A, 1997.
- Slatter, PT. “The Rheological characterisation of sludges.” *Water Science & Technology*. Vol. 36, n. 11 (1997) p. 9 – 18.
- Smith, S; Smith, TJ; Drake, MA. “Short communication: Flavor and flavor stability of cheese, rennet and acid wheys.” *Journal of Dairy Science*. vol. 9, n.5 (2016) p. 3434 – 3444.
- Stodola, FH; Lockwood, LB. “The oxidation of lactose and maltose to bionic acids by *Pseudomonas*.” *The Journal of Biological Chemistry*. (1947) p. 213 – 221.

- Szczesniak, AS. "Texture is a sensory property." *Food Quality and Preference*. Vol. 23, (2002) p. 49 – 62.
- Valle, TA; Ruzza, AA; Mastroeni, MF; Malvessi, E; da Silveira, MM; de Souza, O; Erzinger, GS. "Lactobionic acid produced by *Zymomonas mobilis*: Alternative to prepare targeted nanoparticles." *Pharmaceutica Analytica Acta*. (2013).
- Van Tassell, ML; Ibarra-Sánchez, LA; Takhar, SR; Amaya-Llano, SL; Miller, MJ. "Use of miniature laboratory fresh cheese model for investigating antimicrobial activities." *Journal of Dairy Science*. Vol. 98, n. 12 (2015) p. 8515-8524.
- Vázquez, HJ; Dacosta, O. "Fermentación alcohólica: Una opción para la producción de energía renovable a partir de desechos agrícolas." *Ingeniería, Investigación y Tecnología*. Vol. 8, n. 4 (2007) p. 249 – 259.

Páginas web:

- **Web 1.** "Food additives permitted for direct addition to food for human consumption." Food and Drug Administration Department of Health and Human Services (2016). Disponible en:
<https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfCFR/CFRSearch.cfm?CFRPart=172&showFR=1&subpartNode=21:3.0.1.1.3.8>
(Consulta 24/05/2017)
- **Web 2.** "Leches fermentadas: aspectos nutritivos, tecnológicos y probióticos más relevantes." Agencia Aragonesa de Seguridad Alimentaria. Disponible en:
http://www.aragon.es/estaticos/ImportFiles/12/docs/Areas/Seguridad_Agroalimentaria/Agencia_Aragonesa_Seguridad_Alimentaria/Dictámenes_informes/AAS_A/LECHES_FERMENTADAS.pdf
(Consulta 25/05/2017)
- **Web 3.** "Conservar alimentos mediante calor." Eroski Consumer (2013). Disponible en:
<http://www.consumer.es/seguridad-alimentaria/ciencia-y-tecnologia/2013/10/16/218321.php>
(Consulta 26/05/2017)

- **Web 4.**“Leche y productos lácteos.” Codex Alimentarius de La Organización Mundial de La Salud (2011). Disponible en:
<http://www.fao.org/3/a-i2085s.pdf>
(Consulta 26/05/2017)
- **Web 5.**“Probióticos en los alimentos. Propiedades saludables y nutricionales y directrices para la evaluación.” Organización de Las Naciones Unidas para la Agricultura y La Alimentación (2006). Disponible en:
<http://www.fao.org/3/a-a0512s.pdf>
(Consulta 27/05/2017)
- **Web 6.**Imagen cromatograma y equipo HPLC. Disponible en:
<http://urbinavinos.blogspot.com.es/2016/02/tecnicas-de-analisis-instrumental-en.html>
(Consulta 30/05/2017)
- **Web 7.**“El sector lechero mundial: Datos.”Food and Agriculture Organization of the United Nations. Disponible en:
<http://www.dairydeclaration.org/Portals/153/FAO-Global-Facts-SPANISH-F.PDF?v=1>
(Consulta 07/06/2017)
- **Web 8.**“Leches fermentadas en la Comunidad de Madrid. Diagnóstico de situación del mercado y del etiquetado.” Consejería de Sanidad de la Comunidad de Madrid (2007). Disponible en:
http://www.madrid.org/cs/Satellite?c=CM_Publicaciones_FA&cid=1142559570725&language=es&pagename=ComunidadMadrid%2FEstructura
(Consulta 08/06/2017).
- **Web 9.**Imagen del reómetro. Disponible en:
http://myrefpoint.blogspot.com.es/2013_02_01_archive.html
(Consulta 09/06/2017).
- **Web 10.**“CODEX STAN 243-2003.” Disponible en:
www.fao.org/input/download/standards/400/CXS_243s.pdf
(Consulta 17/06/2017)
- **Web 11.**“Aditivos alimentarios.” Sociedad Española de Dietética y Ciencias de la Alimentación. Área de Nutrición y Bromatología de La Universidad de Navarra (2003). Disponible en:

http://www.nutricion.org/publicaciones/revista_agosto_03/Funcionales/aditivos.pdf

(Consulta 20/06/2017)

- **Web 12.** Diagrama de flujo del yogur. Disponible en:

http://www.lacteosinsustituibles.es/p/archivos/pdf/monografia_queso_yogur_otraslechesfermentadas.pdf

(Consulta 21/06/2017)

- **Web 13.** ¿Cuándo un microorganismo se considera probiótico?. Disponible en:

<https://www.medwave.cl/link.cgi/Medwave/PuestaDia/Cursos/3253>

(Consulta 05/06/2017)

- **Web 14.** Reograma. Disponible en:

http://myrefpoint.blogspot.com.es/2013_02_01_archive.html.

(Consulta 05/06/2017)

- **Web 15.** Gráfica del mercado de probióticos en la Unión Europea desde el 2014 hasta el 2024 en millones de dólares. Disponible en:

<http://probiotics.conferenceseries.com/>

(Consulta 07/07/2017)