

|   |   |                |          |                 |             |               |   |
|---|---|----------------|----------|-----------------|-------------|---------------|---|
|  | <b>GESTIÓN SERVICIOS BIBLIOTECARIOS</b> |                |          |                 |             |               |    |
|   | <b>CARTA DE AUTORIZACIÓN</b>            |                |          |                 |             |               |   |
| <b>CÓDIGO</b>   | <b>AP-BIB-FO-06</b>                     | <b>VERSIÓN</b> | <b>1</b> | <b>VIGENCIA</b> | <b>2014</b> | <b>PÁGINA</b> | <b>1 de 1</b>   |

Neiva, 10 de enero de 2017

Señores

**CENTRO DE INFORMACIÓN Y DOCUMENTACIÓN  
UNIVERSIDAD SURCOLOMBIANA**

Ciudad

El (Los) suscrito(s):

Yeison Fernando Barrios Rodriguez, con C.C. No. 1.106.307.825, autor (es) de la tesis y/o trabajo de grado Titulado Evaluación y caracterización del potencial antimicrobiano de bacterias ácido lácticas aisladas de leche de cabra en el norte del departamento del Huila, presentado y aprobado en el año 2016 como requisito para optar al título de Ingeniero Agrícola, autorizo (amos) al Centro de Información y Documentación de la Universidad Surcolombiana para que, con fines académicos, muestre al país y el exterior la producción intelectual de la Universidad Surcolombiana, a través de la visibilidad de su contenido de la siguiente manera:

- Los usuarios puedan consultar el contenido de este trabajo de grado en los sitios web que administra la Universidad, en bases de datos, repositorio digital, catálogos y en otros sitios web, redes y sistemas de información nacionales e internacionales “open access” y en las redes de información con las cuales tenga convenio la Institución.
- Permita la consulta, la reproducción y préstamo a los usuarios interesados en el contenido de este trabajo, para todos los usos que tengan finalidad académica, ya sea en formato Cd-Rom o digital desde internet, intranet, etc., y en general para cualquier formato conocido o por conocer, dentro de los términos establecidos en la Ley 23 de 1982, Ley 44 de 1993, Decisión Andina 351 de 1993, Decreto 460 de 1995 y demás normas generales sobre la materia.
- Continúo conservando los correspondientes derechos sin modificación o restricción alguna; puesto que, de acuerdo con la legislación colombiana aplicable, el presente es un acuerdo jurídico que en ningún caso conlleva la enajenación del derecho de autor y sus conexos.

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

Yeison Fernando Barrios Rodríguez:



Firma:

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

**TÍTULO COMPLETO DEL TRABAJO:**

Caracterización y potencial antimicrobiano de bacterias lácticas aisladas de leche de cabra en el norte del departamento del Huila

**AUTOR O AUTORES:**

| Primero y Segundo Apellido | Primero y Segundo Nombre |
|----------------------------|--------------------------|
| Barrios Rodríguez          | Yeison Fernando          |

**DIRECTOR Y CODIRECTOR TESIS:**

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

**ASESOR (ES):**

| Primero y Segundo Apellido | Primero y Segundo Nombre |
|----------------------------|--------------------------|
|                            |                          |

**PARA OPTAR AL TÍTULO DE:** Ingeniero Agrícola

**FACULTAD:** Ingeniería

**PROGRAMA O POSGRADO:** Agrícola

**CIUDAD:** Neiva **AÑO DE PRESENTACIÓN:** 2016 **NÚMERO DE PÁGINAS:** 80

**TIPO DE ILUSTRACIONES (Marcar con una X):**

Diagramas  Fotografías  Grabaciones en discos  Ilustraciones en general  Grabados  Láminas   
 Litografías  Mapas  Música impresa  Planos  Retratos  Sin ilustraciones  Tablas o Cuadros

|   |  |                |          |                 |             |   |               |
|---|--|----------------|----------|-----------------|-------------|---|---------------|
|  | <b>GESTIÓN SERVICIOS BIBLIOTECARIOS</b>              |                |          |                 |             |    |               |
|   | <b>DESCRIPCIÓN DE LA TESIS Y/O TRABAJOS DE GRADO</b> |                |          |                 |             |   |               |
| <b>CÓDIGO</b>   | <b>AP-BIB-FO-07</b>                                  | <b>VERSIÓN</b> | <b>1</b> | <b>VIGENCIA</b> | <b>2014</b> | <b>PÁGINA</b>   | <b>2 de 3</b> |

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

- Pdf,

**MATERIAL ANEXO:**

- Lecturas de diámetros
- Medios de cultivo
- encuesta
- Graficas

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

**PALABRAS CLAVES EN ESPAÑOL E INGLÉS:**

| <u>Español</u>          | <u>inglés</u>       |
|-------------------------|---------------------|
| 1. Ácidos orgánicos     | Organic acids       |
| 2. Leche de cabra       | Goat milk           |
| 3. potencial probiótico | Probiotic potential |
| 4. Bacteriocinas        | Bacteriocins        |

**RESUMEN DEL CONTENIDO:** (Máximo 250 palabras)

En el presente estudio se evaluó la actividad antimicrobiana de BAL aisladas de muestras de leche de cabra frente a 4 cepas de patógenos obtenidos de alimentos contaminados, dos de *E. coli* y dos de *Klebsiella*. Se recolectaron 4 muestras de leche de cabra comercializadas en los municipios de Villavieja y Neiva, a las cuales se realizó un análisis físico y químico en el laboratorio de microbiología de alimentos de la universidad Surcolombiana. Un total de 7 bacterias ácido lácticas fueron aisladas de las muestras, e inoculadas en Agar y caldo MRS. Para evaluar la capacidad antimicrobiana frente a los patógenos, se implementó la técnica de discos y la técnica de difusión en pozos para los sobrenadantes (pH ácido y neutro) libres de células; luego los test fueron incubados a 37°C durante 16, 24 y 36 horas, con la correspondiente lectura de diámetros de inhibición. Los resultados mostraron que existe capacidad antimicrobiana de cada una de las BAL aisladas, al igual que los productos originados a partir del metabolismo de estas, sobresaliendo el tratamiento en presencia de células, llegando a la conclusión, de acuerdo al estudio *in vitro*, que hay un potencial probiótico de las cepas BAL aisladas, que se desconoce y podría ser fundamental para el desarrollo de nuevas innovaciones y tecnología de este producto en la región.

**ABSTRACT:** (Máximo 250 palabras)

The present study evaluated the antimicrobial activity of BALs isolated from goat milk samples versus 4 strains of pathogens obtained from contaminated foods, two from *E. coli* and two from *Klebsiella*. Four samples of goat milk commercialized in the municipalities of Villavieja and Neiva were collected, and a



## GESTIÓN SERVICIOS BIBLIOTECARIOS

### DESCRIPCIÓN DE LA TESIS Y/O TRABAJOS DE GRADO



**CÓDIGO**

**AP-BIB-FO-07**

**VERSIÓN**

**1**

**VIGENCIA**

**2014**

**PÁGINA**

**3 de 3**

physical and chemical analysis was carried out at the food microbiology laboratory of Surcolombiana University. A total of 7 lactic acid bacteria were isolated from the samples, and inoculated in agar and MRS broth. To evaluate antimicrobial capacity against pathogens, the disc technique and the well diffusion technique were implemented for cell-free supernatants (acid and neutral pH); Then the tests were incubated at 37 ° C for 16, 24 and 36 hours, with a corresponding reading of inhibition diameters. The results showed that there is antimicrobial capacity of each of the isolated BAL, as well as the products originated from the metabolism of these, standing out the treatment in the presence of cells, concluding, according to the in vitro study, that there are A potential probiotic of isolated BAL strains, which is unknown and could be fundamental for the development of new innovations and technology of this product in the region.

#### APROBACION DE LA TESIS

Nombre Presidente Jurado: Claudia Milena Amorocho Cruz

Firma:

Nombre Jurado: Nelson Gutiérrez Guzmán

Firma:

Nombre Jurado: Jennifer Katiusca Camacho

Firma:

**CARACTERIZACIÓN Y POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE BACTERIAS  
LÁCTICAS AISLADAS DE LECHE DE CABRA EN EL NORTE DEL  
DEPARTAMENTO DEL HUILA**

**YEISON FERNANDO BARRIOS RODRÍGUEZ**

**UNIVERSIDAD SURCOLOMBIANA  
FACULTAD DE INGENIERÍA  
INGENIERIA AGRICOLA  
NEIVA – HUILA**

**CARACTERIZACIÓN Y POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE BACTERIAS  
LÁCTICAS AISLADAS DE LECHE DE CABRA EN EL NORTE DEL  
DEPARTAMENTO DEL HUILA**

**YEISON FERNANDO BARRIOS RODRÍGUEZ**

**Proyecto presentado a la Facultad de Ingeniería como requisito parcial para optar al título  
de Ingeniero Agrícola**

**Director:  
CLAUDIA MILENA AMOROCHO CRUZ  
Dr. En Biotecnología**

**UNIVERSIDAD SURCOLOMBIANA  
FACULTAD DE INGENIERÍA  
INGENIERÍA AGRÍCOLA  
NEIVA – HUILA**

**NOTA DE ACEPTACION**

---

---

---

---

---

---

**JENIFER KATIUSCA CASTRO CAMACHO**  
**Jurado**

---

**NELSON GUTIERREZ GUZMAN**  
**Jurado**

---

**CLAUDIA MILENA AMOROCHO CRUZ**  
**Directora**

*A Dios.  
A mi madre Clotilde Rodríguez y a mi Padre José Antonio Barrios ejemplos de trabajo,  
dedicación y de amor incondicional*

## **I. AGRADECIMIENTOS**

*A Dios por darme la fuerza, el entendimiento y ser mi guía para alcanzar este logro.*

*A la Universidad Surcolombiana como financiadora del Proyecto y al grupo Agroindustria Uso por todo su apoyo.*

*A Mi directora de tesis Claudia Milena Amorocho Cruz por su asesoría, apoyo, tiempo y paciencia durante todo este proceso.*

*A mis padres y hermanos por brindarme el apoyo incondicional e invaluable en mi vida, especialmente a mi madre por su incondicionalidad, por ser el motor y la base de mis metas.*

*A Mi novia, Andrea Natalia Joven Quevedo, por su apoyo y su constante confianza en cada uno de mis proyectos, por su amor y motivación, por su apoyo en cada dificultad, por su dulce magia de amor y por su sonrisa que le da vuelta a mi universo.*

*A todo el grupo de trabajo de CESURCAFE, especialmente al Doctor Nelson Gutiérrez y a los ingenieros agrícolas Erika Tatiana Cortez y Wilmer Licerio Ladino, por el apoyo y confianza depositada en mí.*

*A mis compañeros y amigos que me acompañaron, me apoyaron y me motivaron en todo este proceso.*

## II. TABLA DE CONTENIDO

|  |    |
|--|----|
| <b>RESUMEN</b> .....   | 11 |
| <b>ABSTRACT</b> .....  | 12 |
| 1. INTRODUCCION .....  | 13 |
| 1.1 Problema de investigación .....                                | 14 |
| 2. ANTECEDENTES .....  | 17 |
| 3. OBJETIVOS .....   | 20 |
| 3.1 Objetivo general .....   | 20 |
| 3.2 Objetivos Específicos.....                                     | 20 |
| 4. MARCO CONCEPTUAL .....  | 21 |
| 4.1 Generalidades de la leche de cabra .....                       | 21 |
| 4.2 Alimentos Funcionales (FA) .....                               | 23 |
| 4.3 Probióticos.....   | 24 |
| 4.3.1 Acción de los Probióticos .....                              | 26 |
| 4.3.2 Efectividad de los probióticos en la salud del Huésped ..... | 27 |
| 4.4 Bacterias Acido Lácticas (BAL) .....                           | 29 |
| 4.4.1 Las BAL y los alimentos .....                                | 30 |
| 4.5 <i>Echericha Coli</i> y <i>Klebsiella</i> .....                | 31 |
| 4.5.1 Los alimentos como fuentes de transmisión.....               | 32 |
| 4.5.2 Resistencia a los antibióticos.....                          | 34 |
| 5. MATERIALES Y MÉTODOS .....                                      | 36 |
| 5.1 Toma de muestras.....  | 36 |
| 5.2 Encuesta a capricultores .....                                 | 36 |
| 5.3 Análisis Físicoquímicos .....                                  | 36 |
| 5.3.1 Determinación de pH.....                                     | 37 |
| 5.3.2 Determinación de °Brix .....                                 | 37 |
| 5.3.3 Determinación de acidez titulable .....                      | 37 |
| 5.3.4 Determinación de densidad .....                              | 38 |
| 5.3.5 Determinación de color .....                                 | 39 |
| 5.3.6 Determinación de cenizas .....                               | 40 |
| 5.3.7 Determinación de sólidos totales y contenido de humedad..... | 41 |
| 5.3.1 Determinación de viscosidad.....                             | 42 |

|       |   |    |
|-------|---|----|
| 5.4   | Aislamiento y caracterización de bacterias ácido lácticas de leche de cabra.....  | 42 |
| 5.4.1 | Tinción de GRAM.....  | 43 |
| 5.4.1 | Prueba de Catalasa.....   | 43 |
| 5.4.2 | Prueba de Oxidasa .....   | 44 |
| 5.4.3 | Prueba de Movilidad y producción de HS <sub>2</sub> .....   | 44 |
| 5.4.4 | Prueba de Citrato de simons .....   | 44 |
| 5.5   | Evaluación de la capacidad antimicrobiana de las BAL.....   | 44 |
| 5.5.1 | Capacidad antimicrobiana en presencia de células.....   | 44 |
| 5.5.2 | Capacidad antimicrobiana en ausencia de células .....   | 45 |
| 5.6   | Sensibilidad a antibióticos.....  | 46 |
| 5.7   | Análisis estadístico.....   | 46 |
| 6.    | RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....  | 47 |
| 6.1   | Zonas de muestreo.....  | 47 |
| 6.2   | Propiedades fisicoquímicas de las muestras de leche de cabra.....   | 47 |
| 6.3   | Aislamiento de BAL.....   | 50 |
| 6.4   | Potencial antimicrobiano de BAL aisladas .....  | 52 |
| 6.4.1 | Actividad antimicrobiana frente a <i>E. coli</i> .....  | 52 |
| 6.4.2 | Comportamiento de la actividad antimicrobiana con relación al tiempo, tipo de cepa BAL y tipo de tratamiento frente a <i>E. coli</i> .....    | 55 |
| 6.5   | Potencial antimicrobiano de BAL aisladas frente a <i>Klebsiella</i> .....   | 58 |
| 6.5.1 | Comportamiento de la actividad antimicrobiana con relación al tiempo, tipo de cepa BAL y tipo de tratamiento frente a <i>Klebsiella</i> ..... | 61 |
| 6.6   | Sensibilidad a los antibióticos .....   | 63 |
| 7.    | APLICABILIDAD EN EL SECTOR .....  | 64 |
| 8.    | CONCLUSIONES .....  | 65 |
| 9.    | RECOMENDACIONES.....  | 67 |
| 10.   | REFERENCIAS .....   | 68 |
| 11.   | ANEXOS.....   | 74 |

### III. Lista de Tablas

|   |    |
|---|----|
| <b>Tabla 1.</b> Composición de la leche de cabra y otros tipos de leche .....   | 21 |
| <b>Tabla 2.</b> Composición mineral (mg/100g) de la leche de diferentes especies .....  | 22 |
| <b>Tabla 3.</b> Categoría de alimentos funcionales dada por American Dietetic Association.....  | 23 |
| <b>Tabla 4.</b> Efectividad de los probióticos en la salud del huésped.....   | 27 |
| <b>Tabla 5.</b> Mecanismos de interacción probióticos/huésped.....  | 28 |
| <b>Tabla 6.</b> Subdivisión taxonómica del género del ácido láctico .....   | 29 |
| <b>Tabla 7.</b> Principales enfermedades de <i>E. coli</i> transmitidas por alimentos .....   | 34 |
| <b>Tabla 8.</b> Cepas de patógenos .....  | 44 |
| <b>Tabla 9.</b> Procedencia muestras de leche de cabra .....  | 47 |
| <b>Tabla 10.</b> Propiedades físico químicas de las muestras de leche de cabra.....   | 47 |
| <b>Tabla 11.</b> Parámetros experimentales y calculados de las coordenadas CIELab para cada una de las muestras de leche de cabra ..... | 49 |
| <b>Tabla 12.</b> Identificación de las colonias BAL de las muestras de leche de cabra .....   | 51 |
| <b>Tabla 13.</b> Características cepas lácticas aisladas.....   | 52 |
| <b>Tabla 14.</b> Porcentaje de inhibición de las BAL aisladas de leche de cabra frente a las cepas de <i>E. coli</i> .....              | 54 |
| <b>Tabla 15.</b> Porcentaje de inhibición de las BAL aisladas de leche de cabra frente a las cepas de <i>Klebsiella</i> .....           | 58 |

### IV. Lista de figuras

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 1.</b> Directrices de la FAO/OMS para la evaluación de los probióticos.....  | 25 |
| <b>Figura 2.</b> Diferentes mecanismos de acción ejercidos por las bacterias probióticas. ....   | 26 |
| <b>Figura 3.</b> Metabolismo Fermentativo de las BAL. ....   | 30 |
| <b>Figura 4.</b> Vía de contaminación con <i>E. coli</i> (0157:H7) a través de la interacción entre animales, humanos, cultivos y medioambiente..... | 33 |
| <b>Figura 5.</b> Etiqueta de muestras.....   | 36 |
| <b>Figura 6.</b> Montaje de determinación de pH .....  | 37 |
| <b>Figura 7.</b> Montaje determinación de °Brix .....  | 37 |
| <b>Figura 8.</b> Montaje determinación de acidez titulable.....  | 38 |
| <b>Figura 9.</b> Montaje determinación de densidad.....  | 39 |
| <b>Figura 10.</b> Calibración Equipo Konica Minolta .....  | 38 |

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 11.</b> Montaje determinación de color .....   | 40 |
| <b>Figura 12.</b> Montaje determinación de cenizas .....   | 41 |
| <b>Figura 13.</b> Montaje determinación de solidos totales .....   | 42 |
| <b>Figura 14.</b> Montaje determinación de viscosidad .....  | 42 |
| <b>Figura 15.</b> Aislamiento de BAL .....   | 43 |
| <b>Figura 16.</b> Evaluación de la actividad antimicrobiana en presencia de células .....  | 45 |
| <b>Figura 17.</b> Evaluación de la actividad antimicrobiana en ausencia de células .....   | 45 |
| <b>Figura 18.</b> Propiedades físicoquímicas de las muestras de leche de cabra .....   | 48 |
| <b>Figura 19.</b> Ensayo de Inhibición, cepa BAL Cv2 frente a <i>E. coli</i> AVA .....   | 52 |
| <b>Figura 20</b> Actividad antimicrobiana de las BAL aisladas de leche de cabra en presencia de células. (T1) y ausencia de células a pH ácido (T2) y pH neutro (T3).....  | 53 |
| <b>Figura 21.</b> Comparación entre métodos aplicados a la inhibición de las BAL frente a <i>E. coli</i> .   | 53 |
| <b>Figura 22.</b> inhibición de las BAL aisladas de leche de cabra frente a las cepas de <i>E. coli</i> a las 16, 24 y 36 horas.....                                       | 56 |
| <b>Figura 23.</b> Variación del diámetro de los tratamientos con respecto al tiempo frente a las cepas <i>E. coli</i> .....  | 57 |
| <b>Figura 24.</b> Variación del diámetro de las cepas de BAL con respecto al tiempo frente a las cepas de <i>E. coli</i> . .....   | 57 |
| <b>Figura 25.</b> Actividad antimicrobiana de las BAL aisladas de leche de cabra en presencia de células. (T1) y ausencia de células a pH ácido (T2) y pH neutro (T3)..... | 59 |
| <b>Figura 26.</b> Comparación entre métodos aplicados a la inhibición de las BAL frente a <i>Klebsiella</i> .....  | 59 |
| <b>Figura 27.</b> Porcentaje de inhibición de las BAL aisladas de leche de cabra frente a las cepas de <i>Klebsiella</i> a las 16, 24 y 36 horas .....                     | 61 |
| <b>Figura 28.</b> Variación del diámetro de las cepas de BAL con respecto al tiempo frente a las cepas de <i>Klebsiella</i> .....  | 62 |
| <b>Figura 29.</b> Variación del diámetro de los tratamientos con respecto al tiempo frente a las cepas de <i>Klebsiella</i> .....  | 62 |
| <b>Figura 30.</b> Sensibilidad de las cepas BAL a antibióticos.....  | 63 |
| <b>Figura 31.</b> Curva de viscosidad. Esfuerzo cortante vs Velocidad de cizallamiento.....  | 78 |

**V. LISTA DE ANEXOS**

**Anexo A.** Encuesta a caprinocultores ..... 74

**Anexo B.** Medios de cultivo ..... 76

**Anexo D.** Grafica esfuerzo de corte vs Velocidad de cizallamiento..... 78

**Anexo E.** Actividad antimicrobiana de las BAL frente a las cepas patógenas..... 79

## RESUMEN

Las bacterias ácido lácticas (BAL) representan gran importancia como microorganismos benéficos para la salud humana, algunas de estas se comportan como agentes probióticos, los cuales al ser ingeridos en cantidades suficientes favorecen el estado de salud del huésped, donde la evidencia científica muestra el potencial beneficio en la prevención o tratamiento de algunas condiciones patológicas, así como para mejorar funciones fisiológicas, mostrando un rol más fuerte en relación sobre la diarrea aguda, ayudando a disminuir su severidad y duración. En el presente estudio se evaluó la actividad antimicrobiana de BAL aisladas de muestras de leche de cabra frente a 4 cepas de patógenos obtenidos de alimentos contaminados, dos de *E. coli* y dos de *Klebsiella*.

Se recolectaron 4 muestras de leche de cabra comercializadas en los municipios de Villavieja y Neiva, a las cuales se realizó un análisis físico y químico en el laboratorio de microbiología de alimentos de la universidad Surcolombiana. Un total de 7 bacterias ácido lácticas fueron aisladas de las muestras, e inoculadas en Agar y caldo MRS. Para evaluar la capacidad antimicrobiana frente a los patógenos, se implementó la técnica de discos y la técnica de difusión en pozos para los sobrenadantes (pH ácido y neutro) libres de células; luego los test fueron incubados a 37°C durante 16, 24 y 36 horas, con la correspondiente lectura de diámetros de inhibición. Se realizó un análisis de varianza simple (ANOVA) para los datos de inhibición en cada uno de los tratamientos y entre tratamientos. En caso de presentarse valores atípicos se eligió el test no paramétrico de Kruskal-Wallis que compara las medianas en lugar de las medias. También mediante ANOVA multifactorial de doble vía se analizó la evolución en el tiempo de la capacidad antimicrobiana en relación a la cepa láctica y tratamiento.

Los resultados mostraron que existe capacidad antimicrobiana de cada una de las BAL aisladas, al igual que los productos originados a partir del metabolismo de estas, sobresaliendo el tratamiento en presencia de células, llegando a la conclusión, de acuerdo al estudio *in vitro*, que hay un potencial probiótico de las cepas BAL aisladas, que se desconoce y podría ser fundamental para el desarrollo de nuevas innovaciones y tecnología de este producto en la región.

*Palabras clave: Ácidos orgánicos, Leche de cabra; potencial probiótico, Bacteriocinas.*

## ABSTRACT

Lactic acid bacteria are of great importance as microorganisms beneficial to human health, some of which behave as probiotic agents, which, when ingested in sufficient amounts, favor the health status of the host, where scientific evidence shows the potential benefit in the Prevention or treatment of some pathological conditions, as well as to improve physiological functions, showing a stronger role in relation to acute diarrhea, helping to decrease its severity and duration. The present study evaluated the antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from goat milk samples against 4 strains of pathogens obtained from contaminated foods, two from *E. coli* and two from *Klebsiella*.

Four samples of goat milk commercialized in the municipalities of Villavieja and Neiva were collected, and a physical and chemical analysis was carried out at the food microbiology laboratory of Surcolombiana University. A total of 7 lactic acid bacteria were isolated from the samples, and inoculated in agar and MRS broth. To evaluate antimicrobial capacity against pathogens, the disc technique and the well diffusion technique were implemented for cell-free supernatants (acid and neutral pH); Then the tests were incubated at 37 ° C for 16, 24 and 36 hours, with a corresponding reading of inhibition diameters. A simple variance (ANOVA) analysis was performed for the inhibition data in each of the treatments and between treatments. In case of atypical values, the Kruskal-Wallis nonparametric test was chosen, comparing the medians instead of the means. Also, two-way multifactorial ANOVA analyzes the evolution over time of antimicrobial capacity in relation to the lactic acid and treatment.

The results showed that there is antimicrobial capacity of each of the isolated BALs, as well as the products originated from the metabolism of these, standing out the treatment in the presence of cells, arriving at the conclusion, according to the *in vitro* study, that there is a Potential probiotic of BAL strains isolated, which is unknown and could be fundamental for the development of new innovations and technology of this product in the region.

**Key Words:** *Organic acids, Goat milk, Probiotic potential, Bacteriocins.*

## 1. INTRODUCCION

Según la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación FAO y la organización mundial de la salud OMS (2006), los alimentos con probióticos tienen grandes efectos beneficiosos en la salud humana, ya que desempeñan una importante acción en las funciones inmunológica, digestiva y respiratoria, además de tener un efecto significativo en el alivio de las enfermedades infecciosas de los niños y de otros grupos en alto riesgo. La evidencia científica muestra el potencial beneficio de los probióticos para prevenir o tratar algunas condiciones patológicas, así como para mejorar funciones fisiológicas, mostrando un rol más fuerte en relación sobre la diarrea aguda, ayudando a disminuir su severidad y duración (Manzano, Estupiñán y Poveda., 2012). Como microorganismos probióticos se utilizan, sobre todo, aunque no exclusivamente, bacterias de los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* además de otros del grupo de Bacterias Acido Lácticas denominadas BAL (FAO y OMS, 2006).

Las BAL, son unos de los principales microorganismos estudiados en la implementación como agentes antimicrobianos (Cueto, Acuña, y Valenzuela, 2010), debido a la producción de ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno y pequeños péptidos conocidos como bacteriocinas, con capacidad de inhibir el crecimiento de otras bacterias (Sánchez, 2016). Estos microorganismos están ampliamente distribuidos en la naturaleza y han sido aislados de diversos alimentos, tierra, plantas verdes, así como también del tracto digestivo (de lactantes y adultos) y vagina de mamíferos, entre otras fuentes (Leon, 2012), para su posterior implementación en productos probióticos de la industria alimentaria. Entre las diversas aplicaciones de las BAL, se tiene la fermentación de alimentos como la leche, carne y vegetales para la obtención de productos como el yogurt, quesos, encurtidos, embutidos, entre otros, de igual manera son fundamentales en producción de vinos y cerveza (J. C. Ramírez, Ulloa, Velázquez, Ulloa, & Arce, 2011). En terminos generales se puede decir que en la tecnología de productos alimenticios tienen funciones como la formación de ácido, inhibición de organismos patógenos, gelificación de la leche, reducción del contenido de lactosa y formación de aroma, (Hernandez, Robles, Angulo, De La Cruz, y Garcia, 2007), además de ser implementados como agentes conservantes debido a sus componentes antimicrobianos, las cuales en su mayoría son sustancias producidas en el proceso final de fermentación (Shirai, Guerrero y Lara, 1996, como se cito en Ramírez *et al* ., 2011).

Actualmente son muchos los alimentos de los cuales se han identificado y aislado BAL, para su posterior implementación en productos probióticos de la industria alimentaria, debido a la alza en la demanda del mercado nacional e internacional por productos alimenticios que vallan más allá del concepto nutricional, y brinden un beneficio a la salud humana, (Taranto, Médici y Font, 2005), en estas nuevas tendencias de alimentos se han implementado investigaciones en pro de ir contribuyendo a esta nueva demanda y poder otorgarles un valor agregado que los vuelva competitivos, pero también existen muchos alimentos comúnmente en la región comercializados por pequeños productores y sectores de bajos recursos económicos, que pueden llegar a tener esta característica de probióticos y ser desconocidas, desperdiciando una posibilidad enorme de contribuir al desarrollo de estas localidades, es por eso que en el presente estudio se tiene como objetivo principal la caracterización e identificación de BAL con potencial antimicrobiano presentes en la leche de cabra del norte del departamento del Huila, siendo este un producto regional que ha tomado una importante función social para la población rural y comunidades

indígenas del territorio colombiano, ya que proporcionan alimento y ofrecen medios para el mantenimiento cultural y económico. En Colombia el manejo de esta especie menor es muy escasa; sin embargo se tienen registros como la región del Norte de Santander, y la región de la Guajira, los cuales manejan un sistema extensivo de esta especie. Por otro lado, existen, aunque en un nivel más bajo sistemas de producción intensiva muy bien manejados, en las zonas de Cúcuta, Villa del Rosario y Cundinamarca. Las empresas de especies menores no han contado con una verdadera organización que les permita generar estrategias de mercadeo de sus productos. Los canales de comercialización de productos de especies menores como, cuyes, conejos, cabras, caracol, son incipientes comparados con otras especies como porcinos que están más definidos. Las estrategias que los productores han optado son las de ir de puerta en puerta, logrando la aceptación de sus productos, pero aun así no es una estrategia que le permitan crear un buen desarrollo y lograr ser competencia a nivel nacional o regional (Ministerio de Agricultura y desarrollo social, 2016, ANCO, 2016, Montoya *et al.* , 2007). En cuanto al departamento del Huila el producto de la leche de esta especie menor a pesar de ser considerado de gran valor nutricional es comercializado de manera informal, sin el más mínimo desarrollo tecnológico, haciéndose trascendental el poder realizar investigaciones que permitan afianzar estas potencialidades y producir innovaciones que conlleven al desarrollo prospero de este producto en la región.

### **1.1 Problema de investigación**

La cadena caprina de Colombia está conformada, según la Asociación de Criadores de Ganado Ovino de Colombia, Asoovinos, por 557.298 caprinos a nivel nacional, aproximadamente, existiendo en el país más de 50 mil productores del sector donde las principales ganaderías se localizan en Santander, Cundinamarca, La Guajira, Magdalena y Cesar, teniendo como los objetivos principales la producción de carne en sistemas generalmente extensivos con biotipos criollos y la producción de leche generalmente en sistemas semi-intensivos usando razas especializadas y sus cruces (Cortes, 2015). Esta cadena en general se caracteriza por su vinculación a tradiciones culturales y regionales, con una estructura de producción de tipo artesanal caracterizada por un nivel tecnológico precario en muchos de sus factores y con dificultades para conectarse a los circuitos de comercio de insumos y productos (Gonzales, Manrique, y Grajales, 2015)., pero que sin embargo para los pequeños productores constituyen una cadena de fácil acceso ya que los pequeños rumiantes representan en cuanto alimentación una menor demanda, comparada con otros sectores como el bovino, ya que son capaces de consumir plantas arbustivas y vegetación variada (Morand-Fehr *et al.*, 2004) y de fácil explotación gracias a su amplio rango de zonas agroecológicas y sistemas de manejo (Peacock 2008, *citado por*, González, Grajales, Manrique, y Téllez, 2011).

En cuanto a la explotación de este sector en Colombia las referencias estadísticas no son del todo claras, debido principalmente al desconocimiento de la industria de pequeños rumiantes como actividad empresarial a nivel nacional, percepción que ha limitado su reconocimiento económico, su relevancia y su capacidad productiva (Vargas, 2013). Uno de los factores que afecta este sector es que los productores ovinos y caprinos no relacionan el conocimiento como factor de competitividad y esto se debe principalmente a un déficit en los programas de investigación, extensión y transferencia del conocimiento (Vargas, 2013), por ejemplo en cuanto

a la investigación sobre el sector de los pequeños rumiantes, para el 2010, de los 254 proyectos de investigación según la agenda tecnológica de la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria, CORPOICA, solamente uno era en relación a este sector, y para ese mismo año el Programa Nacional de Ciencia y Tecnología de Colciencias tenía registrados 389 grupos de investigación en el Programa de Ciencia y Tecnología Agropecuaria, de los cuales ninguno está vinculado directamente con la producción de tecnología para pequeños rumiantes (González *et al.*, 2011). Aunque para el 2016 el ministerio de agricultura y desarrollo rural junto con la Asociación Nacional de Caprinocultores y Ovinocultores, ANCO, han establecido programa pilotos de mejoramiento de raza y aumento de la producción, buscando asesoría de países como Uruguay y México, quienes cuentan con experiencia en producción de este tipo de especie menores, aún falta un compromiso más fuerte en investigación y desarrollo tecnológico para este sector en el país, pues los factores críticos de comercialización de productos de origen caprino en Colombia requieren ser intervenidos a través de la construcción de cadenas de valor que estimulen el crecimiento de la demanda, el desarrollo de políticas y la calidad de los productos garantizando una participación activa de los productores por medio de productos de valor agregado que aseguren el incremento de los ingresos y el empleo familiar (Moreno y Grajales, 2014).

Uno de los productos caprinos que pueden llegar a garantizar un valor agregado a este sector de especie menores es la producción de leche, la cual ha ganado importancia en la nutrición humana como un segmento significativo en muchas poblaciones de los países desarrollados ( Haenlein, 2004, citado por Albenzio *et al.* , 2015). La leche de cabra debido a los bajos niveles de Alpha S1, una de las cuatro proteínas de la caseína, está más cerca de parecerse a la leche humana que la de la leche de vaca (Clark y Sherbon, 2000), considerándose como alternativa a la leche materna en la nutrición infantil (Slacanac *et al.* , 2010), ya que debido a que presenta una mayor proporción de los llamados ácidos grasos de cadenas cortas (ácidos cáprico, caprónico y caprílico) que la de vaca, la hace mucho más digestible para el bebé y le comunica un sabor particular (Flores, Pérez, Basurto-Sotelo, y Jurado, 2009), permitiendo dar un nuevo enfoque hacia una nueva era de aceptabilidad de los productos lácteos para el consumo humano, como un complemento nutricional beneficioso a lo largo de toda la vida desde la infancia hasta la vejez (Albenzio *et al.*, 2015).

En cuanto a los productos lácteos de leche de cabra, esta presenta un elevado contenido de grasa, proteína, caseína y sólidos totales, lo que la convierte en un producto muy atractivo para la elaboración de quesos debido al elevado rendimiento que puede obtenerse (Frau, Font, Paz, y Pece, 2012). Por otro lado en países como Estados Unidos los productos lácteos de la cabra tales como yogurt, son cada vez más populares, considerado como alimentos procesados con mayor propiedad nutritiva para reforzar el arma invisible que determinan las bacterias benéficas de dicho tracto, con el fin de restaurar el equilibrio microbiológico (Flores, Pérez, Basurto, y Jurado, 2009), lo que quiere decir que presenta la posibilidad de un potencial probiótico, lo que es corroborado por las diversas investigaciones donde se mencionan que las bacterias lácticas aisladas de leche de cabra tienen características probióticas. López (2010), en la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro de México, logro aislar 5 cepas de muestras de suero de leche de cabra y sus derivados, evidenciando en todas las cepas aisladas actividad antimicrobiana contra algunos microorganismos de prueba (*Enterobacter aerogenes*, *E. coli* , *Salmonella* y *Staphylococcus aureus*). En otros estudios llevados a cabo por Carrera (2015) en la evaluación

antimicrobiana de *Salmonella typhi*, se encontró que el mayor poder antimicrobiano se obtuvo con las bacterias extraídas de leche de vaca, leche materna y leche de cabra. Los investigadores Tambekar y Bhutada (2010), realizaron un estudio comparativo, y encontraron que los probióticos de leche de cabra y sus bacteriocinas mostraron un mayor potencial antibacteriano en relación con el probiótico comercial. Todo esto demuestra un alto potencial en este producto de esta especie menor para explotar en pro de la seguridad alimentaria, donde los patógenos bacterianos son los principales agentes etiológicos de enfermedades relacionadas con el consumo de productos alimenticios contaminados y representan un importante problema de salud pública en los países en desarrollo (Haghi *et al.*, 2015), pues muchos de estos patógenos presentan resistencia a los tratamientos realizados comúnmente con antibióticos, haciéndose necesario buscar alimentos que vallan más allá del concepto nutricional y brinden un beneficio a la salud contrarrestando el efecto de estos agentes patógenos.

En el caso de Colombia la producción de leche caprina en la mayoría de los casos es recolectada en forma manual. El destino de esta leche es principalmente la elaboración de quesos artesanales y una parte al consumo local, constituyéndose, en algunas zonas del país, en el único alimento lácteo (ANCO, 2016. y Ministerio de agricultura y desarrollo social, 2016), sin embargo los niveles de producción y el grado de tecnificación del sector caprinocultor, así como la pobre cultura de consumo de sus productos, no han permitido un desarrollo significativo de la industria láctea caprina (Bedoya, Rosero, y Posada, 2012). En cuanto al departamento del Huila no se encuentran datos estadísticos, sin embargo, en el norte del departamento existe ciertos productores que explotan el producto de la leche de esta especie menor, es el caso de los municipios de Neiva, Rivera, Baraya Tello, Villavieja y Colombia. En este último llegó a existir una asociación regional que buscaba el fortalecimiento de este producto, denominada “grupo asociativo los innovadores”, pero por falta de apoyo gubernamental y al fuerte fenómeno del niño en el 2015-2016 ha decaído. En cuanto a Villavieja la leche representa un gran valor cultural y comercial, esta es explotada por pequeños productores y transformada en subproductos como el yogurt, panelitas, queso y comercializada de forma informal, y en los otros sectores como los municipios de Neiva, Tello y Rivera la leche es vendida puerta a puerta, apetecida por los consumidores locales por su valor nutricional. Esto demuestra que en la región existe un gran desconocimiento de las grandes características a explotar en este producto, y lo significativo que puede llegar a ser para el desarrollo cultural, social y económico de los pequeños productores, por lo cual nace la pregunta de investigación **¿Es posible caracterizar y evaluar *in vitro* el potencial antimicrobiano de Bacterias ácido lácticas aisladas de leche de cabra comercializadas en el norte del departamento del Huila?**

## 2. ANTECEDENTES

Desde la década de los 80, la investigación científica sobre las propiedades saludables del consumo de probióticos ha aumentado considerablemente, lo cual ha promovido significativamente su uso (Manzano A. *et al.* , 2012). Elie Metchnikoff, científico Ruso y Premio Nobel, afirmó que la dependencia de los microbios intestinales con respecto a los alimentos hace posible adoptar medidas para, modificar la flora de nuestro organismo y sustituir los microbios nocivos por microbios útiles (Guarner *et al.*, 2011), sentando de esta manera el concepto de lo que hoy se conoce como microorganismos probióticos, los cuales se pueden usar para contrarrestar las disfunciones inmunológicas locales, para estabilizar la función de barrera de la mucosa intestinal, para evitar la sucesión infecciosa de microorganismos patógenos o para influir en el metabolismo intestinal (Holzapfel, Haberer, Snel, y Schillinger, 1998). En los últimos años, el campo de los probióticos ha experimentado un gran auge, lográndose avances científicos y clínicos que han permitido el desarrollo y comercialización de diversos productos debidamente contrastados (Rodríguez, 2015).

Las BAL, son unos de los microorganismos más implementados para estos fines, lo cuales están presentes en la alimentación del hombre desde hace mucho tiempo y es posible encontrarlos en diferentes productos de leche fermentada, yogurt, quesos frescos y madurados, en diferentes carnes, sus productos y en algunas hortalizas (Del campo, Gómez, y Alaníz, 2008). En busca de estos microorganismo y de brindar alimentos probióticos se han realizado diferentes estudios en distintas clases de alimentos, por ejemplo se tiene evidencia de investigaciones llevadas a cabo por Montoya, Estrada y Gutierrez (2006) , quienes trabajaron con dos cepas nativas de *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus brevis*, aisladas de productos fermentados; encontrando mediante la evaluación de los extractos de estas cepas, que existía capacidad bactericida frente a *Salmonella sp.* y *Escherichia coli*.

Larrea, Florez, y Huapaya (2007) evaluaron la actividad antimicrobiana de bacterias ácido lácticas puras liofilizadas, encontrando que *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus bulgaricus* y *Lactobacillus helveticus* presentan diferentes grados de actividad antimicrobiana frente a bacterias entéricas, donde el mejor efecto bacteriostático lo presentaron *Lactobacillus fermentum* y *Lactobacillus acidophilus* frente a *Escherichia coli* y *Salmonella enteritidis*, respectivamente, con una concentración mínima inhibitoria de 4 µL/ml.

Jurado, Aguirre, y Ramirez (2009), aislaron las cepas lácticas del intestino grueso de cerdos adultos, realizando pruebas de difusión en pozos donde evidenciaron que las BAL seleccionadas inhibieron principalmente los enteropatógenos: *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* y *Clostridium perfringens*. Mostrando un perfil de bacterias lácticas con características probióticas, que pueden ser una alternativa para sustituir las terapias con antibióticos como un método menos agresivo y una nueva visión en la industria farmacéutica.

Cueto *et al.*, (2010), evaluaron 53 BAL provenientes de suero costeño, encontrándose que 7 de ellas tenían potencial probiótico debido a la sensibilidad que presentaban a antibióticos de importancia epidemiológica y su adhesión al mucus intestinal, reuniendo las condiciones requeridas para considerarse como potencialmente probióticos.

En Argentina Catellanos, Gimenez, Lobo, y Norma (2010) aislaron 123 colonias de BAL de productos regionales (papas, yacon, choclo, oca, maíz, entre otros), de las cuales 7 presentaron actividad inhibitoria contra *Listeria innocua*, y 2 frente *Clostridium perfringens*.

Sánchez y Tromps (2014), encontraron de un total de 72 cepas BAL de fuentes de animales, que el 63,6% de las cepas seleccionadas exhibieron actividad antagónica frente a *Bacillus cereus* y *Staphylococcus aureus*, el 75,7% a *Salmonella typhimurium* y el 72,7% a *Pseudomonas aeruginosa* (Sánchez y Tromps, 2014).

Por otro lado, Vélez, Gutiérrez, y Montoya (2015) a partir de calostro de la leche de cerdas, obtuvieron dos BAL aisladas y caracterizadas previamente como probióticas exhibiendo actividad antimicrobiana *in vitro* contra *S. typhimurium*. Corroborando que existe un efecto probiótico del calostro materno, lo que se constituye en uno de los factores de transferencia inmunológica para el neonato, situación que favorece la colonización de estos microorganismos benéficos a nivel intestinal.

Todas estas investigaciones permiten saber algunas alternativas naturales las cuales sirven para proteger la salud del consumidor, sin tener efectos colaterales como es el caso de algunos medicamentos que pueden en un momento dado llegar a ser tóxico (Lizeldi, Luna, y Vazquez, 2005). En cuanto a la leche de cabra se tiene que en las últimas décadas ha venido aumentando el interés por este producto debido a sus características benéficas para la salud, pero sin embargo la investigación respecto a su potencial probiótico sigue siendo algo ambigua.

Lopez (2010), aisló 5 cepas de muestras de suero de leche de cabra y sus derivados (Jocoque y suero) encontrando que todas las cepas aisladas presentaron actividad antimicrobiana contra algunos microorganismos de prueba (*Enterobacter aerogenes*, *E. coli*, *Salmonella* y *Staphylococcus aureus*), dando también positivo en pruebas *in vitro* a la resistencia de acidez gástrica, demostrando de esta manera que las bacterias obtenidas de la leche de cabra y sus derivados podrían ser utilizadas de manera positiva para elaborar productos lácteos con probióticos o como aditivos en alimentos para humanos o animales, pues cumplen con los criterios para ello.

Tambekar y Bhutada (2010), analizaron un total de 120 muestras de leche de diferentes orígenes, identificando 110 aislamientos como bacterias de ácido láctico. A partir del estudio comparativo de probióticos se concluyó que los probióticos de la leche de cabra y sus bacteriocinas mostraron un fuerte potencial antibacteriano en comparación con la preparación probiótica comercial, por lo tanto el probiótico de la leche de este tipo de animal puede ser utilizado como terapia mediante consumo oral y como profiláctica para prevenir las infecciones entéricas como diarrea, gastroenteritis, disentería, infecciones del tracto urinario, intoxicación alimentaria, fiebre tifoidea y síndrome del intestino irritable.

Viswanathan, Preethi, Veilumuthu, y Chairman (2015) determinaron el efecto de diferentes pH tales como 5, 6 y 9 sobre la base de la bacteriocina producida por aislados de *Lactobacillus sp* de leche de cabra a través del método de difusión de pozos de agar. La eficacia de la bacteriocina se verificó frente a los patógenos Gram positivos y negativos comunes en los alimentos, dando

como resultado que todas las especies son positivas para producción de probióticos, reteniendo su actividad a una temperatura de 60 y 70 °C y pH 6 y 7.

Sridevi, Sirisha, y Swapna (2015), aislaron un total de 11 y 15 cepas de bacterias de ácido láctico a partir de muestras de leche de cabra y vaca respectivamente, obteniendo que un aislamiento de leche de cabra puede ser utilizado como probiótico potencial, ya que es tolerante a la acidez en el intestino e inhibidor a microorganismos patógenos, la cual fue identificada como *Lactobacillus plantarum*.

Carrera (2015), en la evaluación antimicrobiana de *Salmonella typhi*, con 8 aislados obtenidos de diferentes muestras de leche, encontró que el mayor poder antimicrobiano se obtuvo con 3 bacterias extraídas de leche de vaca, leche materna y leche de cabra.

Con lo mencionado anteriormente se demuestra que existen investigaciones en proceso sobre este tipo de productos probióticos en leche de cabra y en otros tipos de alimentos, que permiten tener un soporte metodológico para caracterizar y evaluar el valor agregado en este producto regional con masivas potencialidades por explotar y aún desconocidas, y que pueden contribuir de manera significativa al desarrollo creciente de este sector en el departamento.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo general**

- Aislar e identificar bacterias ácido lácticas de leche de cabra producida en el norte del Huila y evaluar su potencial antimicrobiano en presencia y ausencia de células.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

- Formular y aplicar encuesta de diagnóstico, caracterización y manejo de la producción caprina.
- Aislar mediante el empleo de medio de cultivo selectivo MRS los microorganismos presentes en la leche de cabra y aplicación de pruebas bioquímicas (catalasa, oxidasa, producción de sulfuros, movilidad y citrato)
- Identificar la microflora láctica de las muestras de leche de cabra producida en el norte del Huila, realizando recuentos totales de la población microbiana de la leche de cabra.
- Evaluar *in vitro* la actividad antimicrobiana en presencia y ausencia de células de las BAL aislada de leche de cabra frente *Echericha Coli* y *Klebsiella*.

## 4. MARCO CONCEPTUAL

### 4.1 Generalidades de la leche de cabra

La leche de cabra es de un color blanco mate, debido a que no contiene  $\beta$ -caroteno y en el momento del ordeño presenta un olor neutro, con un sabor dulzón (Haza, 1995). Entre los principales componentes se encuentra el agua, lípidos, carbohidratos, proteínas, sales y una gran lista de componentes misceláneos (Flores *et al.* , 2009), en la tabla 1 se encuentra una descripción de estos componentes presentes en la leche de cabra, comparados con los valores de otros tipos de leche como la de oveja, vaca y humana.

**Tabla 1.** Composición de la leche de cabra y otros tipos de leche

| <b>Composición</b>           | <b>Cabra</b> | <b>Oveja</b> | <b>Vaca</b> | <b>Humana</b> |
|------------------------------|--------------|--------------|-------------|---------------|
| <b>Grasa %</b>               | 3,8          | 7,9          | 3,6         | 4             |
| <b>Sólidos no Grasos %</b>   | 8,9          | 12           | 9           | 8,9           |
| <b>Lactosa %</b>             | 4,1          | 4,9          | 4,7         | 6,9           |
| <b>Proteína %</b>            | 3,4          | 6,2          | 3,2         | 1,2           |
| <b>Caseína %</b>             | 2,4          | 4,2          | 2,6         | 0,4           |
| <b>Albumina, Globulina %</b> | 0,6          | 1            | 0,6         | 0,7           |
| <b>N no proteico %</b>       | 0,4          | 0,8          | 0,2         | 0,5           |
| <b>Cenizas %</b>             | 0,8          | 0,9          | 0,7         | 0,3           |
| <b>Calorías /100 ml</b>      | 70           | 105          | 69          | 68            |

*Fuente:* Bedoya *et al.*, (2012)

La leche de cabra presenta una grasa cuyo contenido en los llamados triglicéridos de cadena media (MCT), alcanzan normalmente, un porcentaje mayor del 30 %, a diferencia de la leche de vaca que no alcanza de estos compuestos más del 20 % (Flores *et al.* , 2009). La leche de cabra tiene un contenido en ácidos grasos prácticamente doble que el de la leche de vaca (16,6% frente al 8%), variando su porcentaje de ácidos grasos saturados entre el 65,9% y el 71,9%. Si se estudian los ácidos grasos en función de la longitud de su cadena de átomos de carbono de C4 a C12, la leche de cabra y la de oveja son similares, con un 20% y un 24%, respectivamente, frente al 14% de la leche de vaca. La diferencia entre las leches de cabra y vaca se encuentra esencialmente en la proporción de los ácidos grasos CS, C10 y C12, que para la leche de vaca y cabra son de 1,8 y 3,6%, de 4,0 y 3,2% y de 8,7 y 4.7%, respectivamente (Haza, 1995 y Park, 2007).

Por otro lado, la grasa de la leche de cabra presenta dos características importantes que repercuten en los procesos de transformación de este producto. Uno de ellos es el menor tamaño de los glóbulos de grasa en la leche de cabra en comparación con las de la leche de vaca. En ambas especies los glóbulos de grasa van de 1 a 10 micras, sin embargo, los glóbulos grasos de la leche de cabra son más pequeños que en la de vaca, encontrándose que un 65% de los glóbulos grasos de la leche de cabra tienen un diámetro inferior a 3 micras frente a un 43% en la leche de

vaca, con un diámetro medio muy próximo al de la leche de oveja, de 3,5 micras y de 3,3 micras respectivamente. Esta diferencia da lugar a la textura más suave de los productos lácteos de cabra, a pesar de que hace que la fabricación de la mantequilla de la leche de cabra sea de mayor dificultad. La segunda característica es la composición de ácidos grasos de la leche de cabra, esta contiene una mayor proporción de ácidos grasos de cadena media, es decir, caproico (C6: 0), caprílico (C8: 0) y cáprico (C10: 0), que son en parte responsables del olor característico de la leche de cabra (Silanikove, Leitner, Merin, y Prosser, 2010 y Haza, 1995).

En cuanto al contenido mineral de la leche de cabra varía 0,70 a 0,85%. En comparación con la leche humana y de vaca, la leche de cabra contiene más calcio, fósforo y potasio, pero su contenido de vitaminas es similar a la de vaca y la leche humana (Silanikove *et al.* , 2010), como se ilustra en la tabla 2. En general, la concentración de elementos minerales decrece durante las siete primeras semanas de lactancia. Elementos traza como el hierro, cobre, zinc, y manganeso se encuentran en proporciones semejantes en la leche de cabra y vaca (Flores *et al.*, 2009 y Bedoya *et al.*, 2012).

**Tabla 2.** Composición mineral (mg/100g) de la leche de diferentes especies

|           | <b>Cabra</b> | <b>Oveja</b> | <b>Humana</b> | <b>Vaca</b> |
|-----------|--------------|--------------|---------------|-------------|
| <b>Ca</b> | 194          | 160          | 32            | 119         |
| <b>Fe</b> | 0,05         | 0,1          | 0,03          | 0,05        |
| <b>Mg</b> | 14           | 18           | 3             | 13          |
| <b>P</b>  | 270          | 145          | 14            | 13          |
| <b>K</b>  | 204          | 136          | 51            | 152         |
| <b>Zn</b> | 0,3          | -            | 0,17          | 0,38        |

*Fuente:* Sanz *et al.* , (2003)

Los oligosacáridos de la leche caprina, al igual que la lactosa, fueron recientemente reportados al encontrar que las cantidades de oligosacáridos que están presentes en la leche de caprinos fluctúan en un rango de 250 a 300 mg/L, lo cual representa 4 ó 5 veces más que los valores encontrados en la leche de vaca y 10 veces mayor que la de la leche de oveja, pero aún mucho más bajos que en la leche humana, a 5-8 g / L. (Bedoya *et al.*, 2012).

En relación con la proteína de la leche de cabra existe un polimorfismo genético ligado a la composición de esta en razón de la presencia en mayor o menor cantidad, o incluso ausencia de la  $\alpha$ S1-caseína, aspecto de singular interés, ya que es capaz de determinar la calidad tecnológica de esta leche así como la nutritiva o incluso saludable de la misma. En efecto, si la presencia de  $\alpha$ S1-caseína da lugar a una leche con mayor tiempo de coagulación, y en consecuencia, con un igualmente, mayor rendimiento en queso, la ausencia de dicha caseína da un mayor valor nutricional(Sanz *et al.* , 2003), por lo cual la diferencia clave entre la leche de cabra y la leche de vaca, radica en el nivel de  $\alpha$ S1-caseína, caseína, el cual en rangos de leche de cabra es de 0 – 7 g/L, variabilidad que está asociada con poliformismos dentro del  $\alpha$ S1-caseína de genes, que son muy comunes en cabras (Martin, Szymanowska, Zwierzchowski, y Leroux, 2004).

## 4.2 Alimentos Funcionales (FA)

La investigación científica, la innovación tecnológica y la actual tendencia hacia lo saludable revolucionaron la industria alimenticia con el nuevo concepto de “alimentos funcionales”, el cual surge en Japón en los años ochenta (Millone, Olagnero, y Santana, 2011), en términos generales se define como un tipo alimento que proporciona beneficios para la salud más allá de la nutrición básica y, además, es capaz de generar evidencia científica de que mejora una o varias funciones en el organismo (Cámpora, 2016).

**Tabla 3.** Categoría de alimentos funcionales dada por American Dietetic Association

| <b>Categoría de alimentos funcionales Convencional</b> |             | <b>Ejemplos de alimentos funcionales seleccionados</b>  |
|--|-------------|---|
| Alimentos convencionales (alimentos integrales)        |             | Ajos<br>Nueces<br>tomates   |
| Alimentos Modificados                                  | Fortificado | Zumo de naranja fortificado con cal Sal yodada  |
|  | Enriquecido | Panes enriquecidos con folato   |
|  | Mejorado    | Barras energéticas, aperitivos, yogures, té, agua embotellada y otros alimentos funcionales formulados con componentes bioactivos como la luteína, aceites de pescado, o aminoácidos variados |
| Alimentos Medicinales                                  |             | Alimentos formulados para ser consumidos o administrados bajo supervisión médica  |
| Alimentos para dietéticos especiales                   |             | Alimentos infantiles, hipoalergénico (por ej. alimentos libres de gluten y libres de lactosa) y alimentos que se ofrecen para descenso de peso.   |

*Fuente:* Hasler, Bloch, Thomson, Enrione, y Manning, (2009)

Según la American Dietetic Association los alimentos funcionales son aquellos que van más allá de la necesidad, proporcionando beneficios de salud adicionales que pueden reducir el riesgo de enfermedad y / o promover una salud óptima. Los alimentos funcionales incluyen alimentos convencionales, alimentos modificados (es decir, fortificados, enriquecidos o mejorados), alimentos médicos y alimentos para uso dietético especial, como lo especifica la tabla 3 (Hasler, Bloch, Thomson, Enrione, y Manning, 2009), dividiendo los alimentos funcionales en dos amplias categorías, la primera categoría consiste en alimentos funcionales que naturalmente contienen un componente que ofrece beneficios adicionales al consumidor, y la otra categoría de alimentos funcionales consiste en alimentos procesados en el que el componente se añade al alimento para darle beneficios adicionales (Ford y Dahl, 2011).

Por otro lado, The International Life Sciences Institute (ILSI) de Europa, considera que los alimentos funcionales no constituyen una entidad única, bien definida y correctamente caracterizada, definiendo como alimento funcional aquel que demuestre satisfactoriamente que ejerce un efecto beneficioso sobre una o más funciones selectivas del organismo, además de sus

efectos nutritivos intrínsecos, de modo tal que resulte apropiado para mejorar el estado de salud y bienestar, reducir el riesgo de enfermedad, o ambas cosas (Ashwell, 2004).

Desde un punto de vista práctico, según la ILSI, un alimento funcional puede ser:

- Un alimento natural en el que uno de sus componentes ha sido mejorado mediante condiciones especiales de cultivo.
- Un alimento al que se ha añadido un componente para que produzca beneficios (por ejemplo, bacterias probióticas seleccionadas, de probados efectos beneficiosos sobre la salud intestinal).
- Un alimento del cual se ha eliminado un componente para que produzca menos efectos adversos sobre la salud (por ejemplo, la disminución de ácidos grasos saturados).
- Un alimento en el que la naturaleza de uno o más de sus componentes ha sido modificada químicamente para mejorar la salud (por ejemplo, los hidrolizados proteicos adicionados en los preparados para lactantes para reducir el riesgo de alergenicidad).
- Un alimento en el que la biodisponibilidad de uno o más de sus componentes ha sido aumentada para mejorar la asimilación de un componente beneficioso.
- Cualquier combinación de las posibilidades anteriores.

### **4.3 Probióticos**

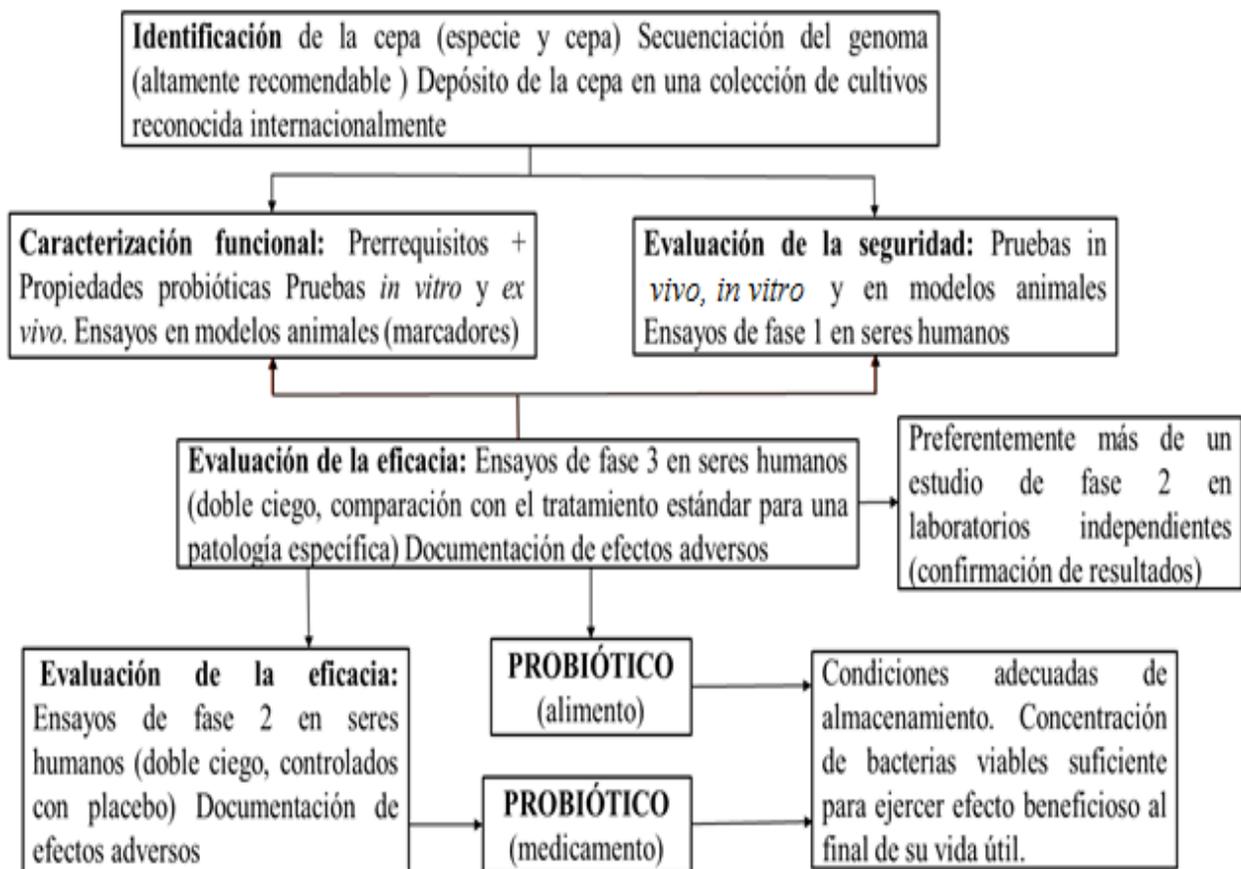
Según la FAO/OMS (2002), los probióticos son microorganismos vivos que, cuando se consumen en cantidades apropiadas, confieren al huésped efectos saludables, en términos estrictos, sin embargo, el término “probiótico” se debe reservar para los microbios vivos que en estudios controlados en humanos han demostrado conferir beneficios a la salud (Guarner *et al.*, 2011). Entre los microorganismos utilizados como probióticos, las bacterias lácticas y las bifidobacterias ocupan el lugar más destacado (Arribas, Rodríguez, Camuesco, Zarzuelo, y Gálvez, 2008), estos microorganismos actúan acidificando la luz intestinal, segregando sustancias que inhiben el crecimiento de microorganismos patógenos, consumiendo nutrientes específicos o uniéndose competitivamente a los receptores intestinales de forma que mantienen la flora intestinal y evitan la acción de gérmenes patógenos (Ferrer y Dalmau, 2001).

Para considerarse como probiótico es necesario que cumplan una serie de características y parámetros, la FAO/OMS, 2002 estableció una serie de criterios que los probióticos deben cumplir, figura 1:

- Identificación del género, la especie y la cepa probiótica: fundamental para garantizar que se trata de un microorganismo inocuo.
- Resistencia a la acidez gástrica y a las sales biliares: es un prerrequisito para que el probiótico sea efectivo y desarrolle sus efectos inmunomoduladores, reduzca la adhesión

de micro biota competitiva y desarrolle la actividad microbiana que favorece el desplazamiento de patógenos.

- Adherencia al mucus y las células epiteliales: las condiciones ácidas, sales biliares, variaciones de pH afectan en alguna medida la viabilidad de los microorganismos y es necesario que lleguen vivos al final del intestino para ejercer efectos inmunomoduladores.
- Habilidad para reducir la adhesión de la flora competitiva: actividad antimicrobiana que favorezca el desplazamiento de patógenos, y capacidad para hidrolizar las sales biliares.



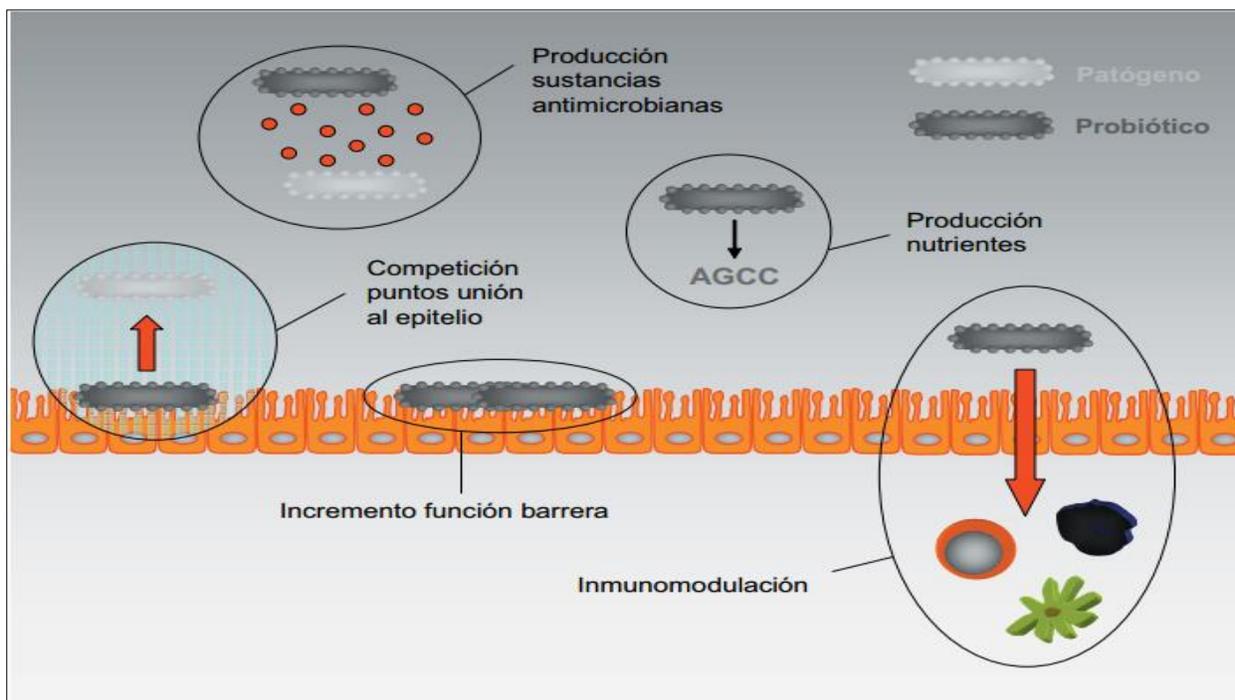
**Figura 1.** Directrices de la FAO/OMS para la evaluación de los probióticos.

Fuente: Rodríguez, (2015)

Al igual se debe cumplir con unos requerimientos de seguridad de los probióticos, para lo cual es necesario hacer unas pruebas de caracterización como resistencia a antibióticos verificando la ausencia de genes de resistencia transferibles, actividades metabólicas perjudiciales, estudios epidemiológicos sobre posibles efectos adversos en los consumidores; determinación de la producción de toxinas y capacidad hemolítica, si la cepa pertenece a una especie potencialmente productora, y ausencia de infectividad en animales inmunodeprimidos (Saenz y Collado, 2003).

### 4.3.1 Acción de los Probióticos

Los probióticos pueden actuar en el huésped a distintos niveles: el lumen intestinal, mediante interacción con la microbiota intestinal o ejerciendo un efecto metabólico directo, en la función de barrera epitelial y en el sistema inmune de la mucosa, incluyendo los efectos de barrera, los procesos digestivos y el sistema inmunológico asociado a la mucosa, figura 2. (Siew, Hart, Kamm, Stagg, y Knight, 2009). Algunos probióticos, como los lactobacilos, generan peróxido de hidrógeno, que reduce el pH luminal y el potencial redox, y produce bacteriocinas que inhiben el crecimiento de las bacterias patógenas. Los *Lctobacilos* y *Bifidobacterias* promueven la maduración del intestino y su integridad, y son antagónicos de patógenos y contribuyen a la modulación de la inmunidad intestinal. Poseen la capacidad de adherirse a enterocitos y colonocitos y afectan a la composición del ecosistema intestinal, incrementando el efecto barrera no dependiente del sistema inmunológico. Los probióticos ejercen un efecto competitivo con otras bacterias, ocupando sus lugares de nidación e inhibiendo el crecimiento de especies de enteropatógenos. Los *Lactobacilos* y las *Bifidobacterias* pueden segregar antibióticos naturales con amplio espectro de actividad, como las lactocinas, las helveticinas, las curvacinas, las nicinas y las bifidocinas, además de competir por nutrientes de la flora intestinal patógena. Dificultan la traslocación bacteriana, por lo que podrán ser útiles en pacientes que reciben alimentación parenteral, también aumentan la actividad de las hidrolasas de las sales biliares que se unen al colesterol y ayudan a su eliminación, por lo que tienen un efecto hipocolesterolémico (Ferrer y Dalmau, 2001., Tormo, 2006., Arribas *et al.*, 2008., Siew *et al.*, 2009., y Martínez, Peláez, y Requena, 2012).



**Figura 2.** Diferentes mecanismos de acción ejercidos por las bacterias probióticas.  
*Fuente:* Arribas *et al.*, (2008).

### 4.3.2 Efectividad de los probióticos en la salud del Huésped

En primer lugar, se tiene que las bacterias probióticas son las responsables del proceso de fermentación y de esta forma se incrementa la biodisponibilidad de proteínas, aminoácidos y péptidos por su acción proteolítica, lo que le otorga efectos nutricionales en el huésped (Fooks, Fuller, y Gibson, 1999). En cuanto a la efectividad de los probióticos, los resultados de varios estudios clínicos han demostrado que determinadas cepas probióticas tienen capacidad de acortar la duración o reducir el riesgo de ciertas infecciones bacterianas y virales, encontrándose la mayor evidencia clínica vinculada a su uso en el mejoramiento de la salud intestinal y la estimulación de la función inmunitaria (Guarner *et al.* , 2011), como se ilustra en la tabla 4. El consumo de probióticos puede ayudar a disminuir y aliviar síntomas de alergias alimentarias por medio de la modulación del sistema inmune a través de la modificación de la microbiota intestinal, convirtiéndose en una alternativa especialmente en niños que tienen su microbiota en pleno desarrollo (Amarocho, 2011). Los probióticos actúan como adyuvantes de respuestas inmunes específicas por intervención de linfocitos T4, aumentan los mecanismos defensivos no específicos contra infecciones o tumores por fenómenos fagocitarios e incrementan los niveles de  $\gamma$ -interferón (Fooks, Fuller, y Gibson, 1999).

**Tabla 4.** Efectividad de los probióticos en la salud del huésped

|                      |  |
|----------------------|--|
| Aparato digestivo    | Probado<br>Diarreas infecciosas (rotavirus)<br>Diarrea por <i>Clostridium difficile</i><br>Diarrea asociada a antibióticos |
|                      | Probable<br>Diarrea del viajero<br>Sobre crecimiento bacteriano<br>Intolerancia a la lactosa<br>Enterocolitis necrotizante |
| Sistema inmunológico | Prevención/tratamiento de la alergia alimentaria<br>Dermatitis atópica   |
| Otros                | Carcinogénesis<br>Hipercolesterolemia<br>Disminución de los niveles amonio   |

Fuente: Ferrer y Dalmau, (2001)

Los probióticos afectan al ecosistema intestinal estimulando los mecanismos inmunitarios de la mucosa y estimulando los mecanismos no inmunitarios a través de antagonismo y competencia con patógenos potenciales, generando una reducción en la incidencia y severidad de la diarrea, uno de los usos más ampliamente reconocidos de los probióticos (Guarner *et al.* , 2011), por ejemplo la ingestión de *Lactobacillus* GG disminuye la gravedad y duración de la diarrea de origen vírico y es eficaz en el tratamiento de las recaídas por *Clostridium difficile* (Ferrer y Dalmau, 2001), al igual existe evidencia de la eficacia de algunas cepas probioticas de *Saccharomyces boulardii*, *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus* en casos de la diarrea asociada al tratamiento con antibióticos (Arribas *et al.*, 2008). También se ha demostrado que algunos probioticos tienen efecto en una serie de trastornos gastrointestinales y extraintestinales, entre los

que se incluyen la enfermedad intestinal inflamatoria (EII), el síndrome de intestino irritable (SII), y las infecciones vaginales (Guarner *et al.*, 2011).

En la tabla 5 se muestra los mecanismos de interacción existentes entre los probióticos y huésped, en relación a ciertos beneficios inmunológicos y no inmunológicos, dada por la organización mundial de gastroenterología, WGO por sus siglas en inglés.

**Tabla 5.** Mecanismos de interacción probióticos/huésped

|                                    |  |
|------------------------------------|--|
| <b>Beneficios inmunológicos</b>    | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Activar los macrófagos locales para que aumenten la presentación de antígenos a los linfocitos B y aumenten la producción de inmunoglobulina A (IgA) secretora, tanto local como sistémicamente</li> <li>- Modular los perfiles de las citoquinas</li> <li>- Inducir la hipo respuesta a los antígenos alimentarios</li> </ul>  |
| <b>Beneficios no inmunológicos</b> | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Digerir los alimentos y competir con los patógenos por los nutrientes</li> <li>- Alterar el pH local para crear un ambiente local desfavorable para los patógenos</li> <li>- Producir bacteriocinas para inhibir a los patógenos</li> <li>- Fagocitar a los radicales superóxidos</li> <li>- Estimular la producción epitelial de mucina e Incrementar la función de barrera intestinal</li> <li>- Competir por adherencia con los patógenos</li> <li>- Modificar las toxinas derivadas del patógeno</li> </ul> |

*Fuente:* Guías Mundiales de la WGO, (2011)

Estos factores están relacionados con la viabilidad de ufc/ml en el producto. En los últimos años, se están realizando estudios sobre la viabilidad y la identidad de las cepas de productos probióticos comercializados, incluyendo productos lácteos y suplementos alimentarios. Estos análisis mostraron que, en productos lácteos, los valores de bacterias lácticas alcanzan valores altos entre  $10^5$  - $10^9$  UFC/mL. Por el contrario, en los suplementos, éstos son en algunos casos, reducidos entre  $10^3$  y  $10^6$  UFC/mL, limitando su potencial efectividad (Saenz, y Collado, 2003), lo que indica que el mantenimiento tanto de la concentración y la viabilidad de los microorganismos probióticos en un producto probiotico es un factor muy importante en el vida útil del producto, pues condiciona su efectividad, por ejemplo el número de células viables en el alimento al final de su vida útil debe ser de al menos  $10^6$  UFC/ml en productos con bifidobacterias (Collado, 2004).

Sin embargo la dosis efectiva depende de la cepa probiótica, aunque algunas organizaciones internacionales, como la asociación japonesa Fermented Milks and Fermented Milk Drinks, proponen una concentración mínima de  $10^7$  ufc/ml de producto para que se generen los efectos benéficos a la salud de los consumidores, otras como la estadounidense National Yogurt Association (NYA) exigen un mínimo de  $10^8$  ufc/g en el momento de la producción para poder ser calificado el producto como “Producto con cultivos vivos y activos (Lourens y Viljoen, 2001).

#### 4.4 Bacterias Acido Lácticas (BAL)

Los microorganismos del ácido láctico son organismos inmóviles, de forma bacilar o esférica. Su nombre deriva del hecho que ellas sintetizan ATP a través de fermentación de carbohidratos que dan ácido láctico como principal producto final. Son todas anaerobias facultativas que crecen fácilmente sobre la superficie de medios solidos expuestos al aire, aunque son incapaces de sintetizar ATP por respiración, lo cual es reflejo de su incapacidad para sintetizar citocromos y otras enzimas que contengan grupo hemo, lo que las hace catalasa negativas, por lo que no pueden descomponer el agua según la reacción:  $2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$  (Stanier, Igraham, Wheelis, y Painter, 1996). Las BAL pertenecen al phylum firmicutes que comprende alrededor de 20 generos: *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Weisella*, siendo el *lactobacillus* el más grande de estos géneros (Parra, 2010).

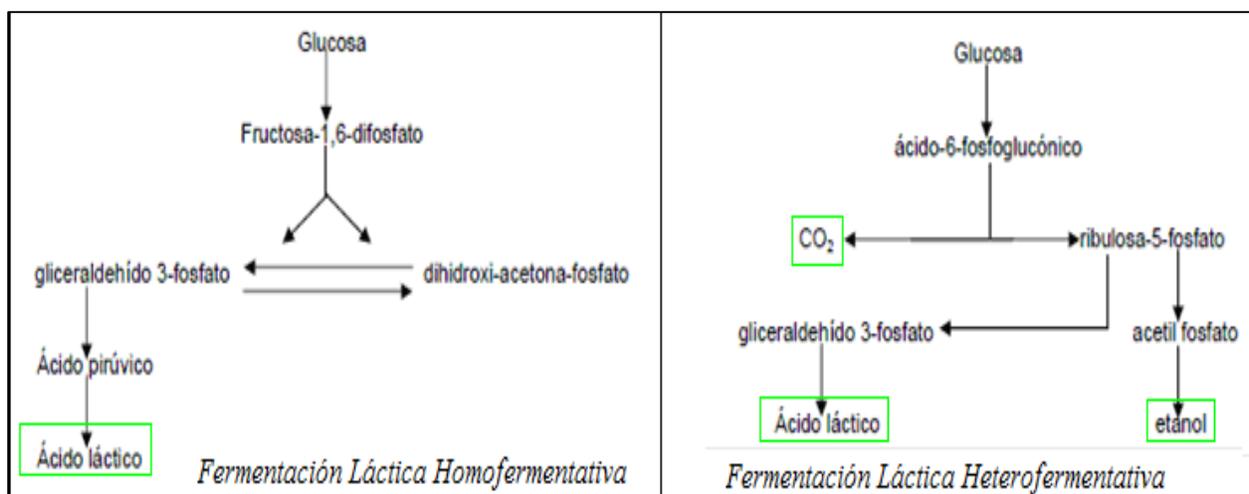
**Tabla 6.** Subdivisión taxonómica del género del ácido láctico

| Subgénero            | Forma y disposición celular | Modo de fermentación de la glucosa | Configuración del ácido láctico |
|----------------------|-----------------------------|------------------------------------|---------------------------------|
| <i>Streptococcus</i> | Cocos en cadena             | Homofermentativa                   | L-                              |
| <i>Leuconostoc</i>   | Cocos en cadena             | Heterofermentativa                 | D-                              |
| <i>Pediococcus</i>   | Cocos en tetrada            | Homofermentativa                   | DL-                             |
| <i>Lactobacillus</i> | Bacilos                     | Variable                           | Variable                        |

Fuente: Stanier *et al* (1992)

En general las BAL son cocos o bacilos Gram positivos, no esporulados, anaeróbicos, microaerófilicos o aerotolerantes; oxidasa y catalasa negativas, carecen de citocromos y no reducen el nitrato a nitrito (J. C. Ramírez *et al* ., 2011). Otra característica distintiva de las bacterias del ácido láctico es su elevada tolerancia a los ácidos, las cuales pueden crecer algunas a valores de pH tan bajos como 3.2, otras a valores tan altos como 9.6, y la mayoría crece a pH entre 4 y 4.5, permitiéndoles sobrevivir naturalmente en medios donde otras bacterias no aguantarían la aumentada actividad producida por los ácidos orgánicos (Stanier *et al* ., 1996).

De acuerdo a su metabolismo pueden ser homofermentativas convirtiendo la glucosa en ácido láctico, o también pueden ser heterofermentativas convirtiendo la glucosa en una mezcla equimolecular de ácido láctico, etanol y CO<sub>2</sub> (Figura 3). Las BAL homofermentativas descomponen la glucosa a partir de la ruta de Embden Meyerhof. Los heterofermentadores, en cambio no pueden usar esta ruta ya que carecen de una enzima clave, la fructosa difosfato aldolasa, que cataliza la escisión del azúcar-fosfato. Estos microorganismos catabolizan la glucosa a través de la ruta oxidativa de las pentosas fosfato. La diferencia entre las rutas metabólicas está en su rendimiento neto de ATP: dos moles por molécula de glucosa fermentada en la ruta homofermentativa y solo un mol a través de la ruta heterofermentativa (Stanier *et al* ., 1996).



**Figura 3.** Metabolismo Fermentativo de las BAL.

Fuente: Larpent, 1995.

#### 4.4.1 Las BAL y los alimentos

Las bacterias lácticas en relación con los alimentos, realizan un papel esencial en la conservación de estos, pero además contribuyen de manera fundamental a sus propiedades sensoriales, nutricionales e incluso ciertas sustancias producidas por ellas son consideradas como promotoras de la salud, también se les atribuye la modificación de textura, sabor y desarrollo de aromas en alimentos fermentados, en los cuales son implementados para la realización de yogurt y kumis entre otros (Leon, 2012). Estos efectos se le otorgan a la actividad metabólica que ejercen sobre proteínas, azúcares y lípidos, además de favorecer la digestión por parte del consumidor y a su vez aumentar la vida útil de los productos (Fernández, Chanci, Wilches, y Cardona, 2014). Por otro lado la aplicación de cepas biopreservantes así como de los extractos y metabolitos producidos por ellas, como sus ácidos orgánicos y bacteriocinas, han demostrado tener control sobre diversos microorganismos no deseados consiguiendo dar seguridad contra bacterias que puedan afectar la salud del consumidor (Vásquez, Suárez, y Zapata, 2009), al igual las leches fermentadas y su relación con las BAL han demostrado beneficios saludables como productos funcionales (Parra, 2010).

Un producto de gran importancia del metabolismo de las BAL en la industria de alimentos son las bacteriocinas. Las bacteriocinas son péptidos antimicrobianos producidos por un gran número de bacterias, incluyendo BAL, las cuales son producto del metabolismo primario y/o secundario (Agudelo, 2014). En la actualidad las bacteriocinas producidas por las bacterias lácticas son las que encierran un mayor interés ya que tienen el estatus de QPS (Qualified Presumption of Safety), es decir son consideradas como microorganismos seguros para la salud, ya que tanto ellas como sus metabolitos han sido consumidos en alimentos fermentados por innumerables generaciones sin que hubiera efectos adversos en la población (Camargo, Gómez, y Salazar Montoya, 2009, y Monroy, Castro, Fernández, y Mayorga, 2009). La actividad antimicrobiana de las bacteriocinas representa un gran potencial para la industria alimenticia ya que se pueden utilizar como conservadores biológicos puros que en un momento dado podrían reemplazar a los conservadores químicos ya que tienen la ventaja de ser proteínas que al biodegradarse no forman

compuestos secundarios (González, Gómez, y Jiménez, 2003). La mayoría de las bacteriocinas actúan sobre la membrana de células sensibles, desestabilizando y permeabilizando mediante la formación de canales o poros iónicos, que van a dar salida a compuestos como fosfato, potasio, aminoácidos, ATP, disminuyendo la síntesis de macromoléculas o alterando la fuerza motriz de protones necesaria para la producción de energía y síntesis de proteínas o ácido nucleicos, por consecuencia la muerte celular (González *et al.* , 2003 y Mondragon *et al.* , 2013).

Otro producto comúnmente implementado son los ácidos orgánicos producidos por estas. Las BAL producen ácido láctico por la fermentación de la glucosa y otras hexosas, así como también pueden producir ácido fórmico, ácido acético y etanol por la fermentación de otros sustratos. Estos ácidos una vez sintetizados se liberan al medio extracelular, donde además de contribuir a las características organolépticas, inhiben o retardan el desarrollo de un gran número de microorganismos alterantes y patógenos, entre los que se encuentran *Escherichia coli*, *Pseudomonas spp*, *Salmonella spp.* y *Clostridium spp* (Hernandez, Pantoja, y Turriago, 2002), por lo que son muy implementadas en la conservación de alimentos perecederos.

#### **4.5 *Echerichia Coli* y *Klebsiella***

*Escherichia coli* (*E. coli*) es una bacteria Gram negativa, que hace parte de la familia *Enterobacteriaceae*, se encuentra normalmente en el intestino del ser humano y de los animales de sangre caliente. Debido a su alta presencia en el intestino, la *E. coli* se utiliza como el indicador principal para detectar y medir la contaminación fecal en la evaluación de la inocuidad del agua y de los alimentos. Consideradas comensales inofensivos, las cepas de *E. coli* constituyen alrededor del 1% de la población microbiana normal del intestino (FAO, 2011).

Sin embargo, a pesar que la mayoría de las cepas de *E. coli* son inofensivas algunas de ellas, como *E. coli* (STEC) productora de toxina Shiga, pueden causar graves enfermedades a través de los alimentos contaminados, pues este es el medio por el que más se transmite al hombre principalmente, como productos de carne picada cruda o poco cocida, leche cruda, hortalizas y semillas germinadas crudas contaminadas (OMS, 2016, y Instituto Nacional de Salud (INS), 2015)

*E. coli* posee varios serotipos importantes en salud pública, como *E. coli* verotoxigénico y *E. coli* enterotoxigénico, este último es el causante principal de la enfermedad diarreica aguda en los países en vía de desarrollo. Se cree que cada año enferman por este virotipo 210 millones de personas y se estiman 380.000 muertes, la mayoría en pacientes pediátricos. Según la OMS la *E. coli* enterotoxigénico es también la principal etiología de la diarrea del viajero y comúnmente afecta a las tropas extranjeras de países desarrollados cuando están en misiones en países tropicales (Instituto Nacional de Salud (INS), 2015).

Las diferentes cepas de *E. coli* que producen enfermedades se clasifican de acuerdo con el tipo de síntomas que pueden producir en los seres humanos. Estos tipos de cepas se pueden dividir en seis grupos o variedades, a pesar de que las características no son exclusivas y pueden ser compartidas por más de un grupo. La *E. coli* shigatoxigénica (STEC) es una de estas variedades. Provoca síntomas que van desde una diarrea suave hasta una grave con sangre. En casi el 10% de

los pacientes (especialmente niños pequeños y adultos mayores), la infección puede transformarse en una enfermedad con riesgo vital, como el síndrome hemolítico urémico (SHU). En relación con la salud pública, la cepa de *E. coli* (O157:H7) es el serotipo EHEC más importante ligado a las enfermedades transmitidas por los alimentos, lo que se traduce en una alta incidencia de infecciones y muertes por EHEC cada año (FAO, 2011).

En cuanto a los microorganismos del género *Klebsiella* son bacilos gram-negativos inmóviles que pertenecen a la familia Enterobacteriaceae. El género *Klebsiella* está formado por varias especies, entre las que se encuentran *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *K. planticola* y *K. terrigena*. Están presente de forma natural en muchos ambientes acuáticos y pueden multiplicarse y alcanzar concentraciones elevadas en aguas ricas en nutrientes, como residuos de fábricas de papel, plantas de acabado textiles y operaciones de procesamiento de caña de azúcar. Estos microorganismos pueden proliferar en sistemas de distribución de agua, y se sabe que colonizan las arandelas de los grifos. También son excretados en las heces de muchas personas y animales sanos, y se detectan con facilidad en aguas contaminadas por aguas residuales (World Health Organization, 2003).

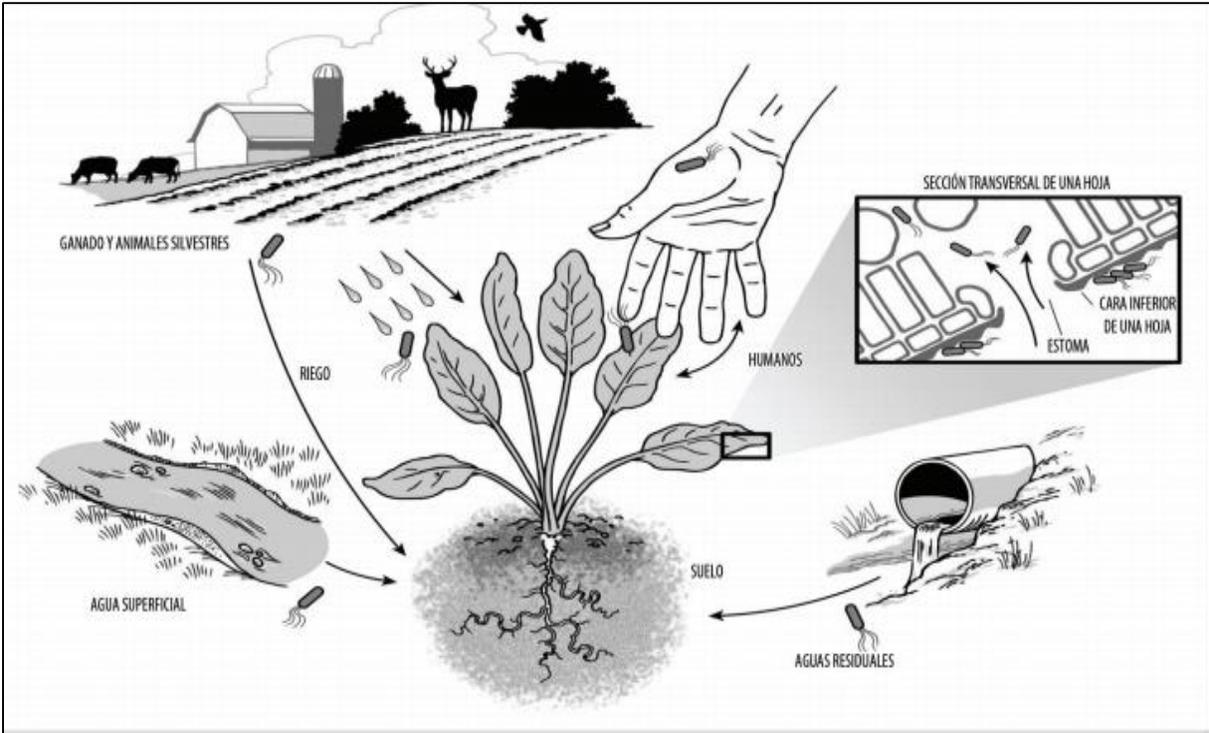
*K. pneumoniae* es un patógeno oportunista que puede causar enfermedades tales como sepsis, neumonía e infecciones del tracto urinario y de los tejidos blandos. La mayoría de las infecciones causadas por esta bacteria se presentan en personas que han estado en contacto con entidades asociadas al cuidado de pacientes, entre los cuales, los hospitalizados e inmunosuprimidos o con enfermedades son los más afectados (Alberto, Vargas, María, yToro, 2010).

*Klebsiella* ocupa el segundo lugar en la incidencia, sólo después de *E. coli*, como causa de bacteriemia por gram-negativo (A. García & Rodríguez, 2010), de igual manera la OMS, (2015) reporta que la mortalidad por pulmonía a *Klebsiella* es de alrededor del 50% debido a las enfermedades subyacentes del paciente como tabaquismo, alcoholismo y gripe entre otras.

#### **4.5.1 Los alimentos como fuentes de transmisión**

La epidemiología de la *E. coli* patógena transmitida por los alimentos varía alrededor del mundo, en la figura 4, se ilustra una posible vía de contaminación con *E. coli* (O157:H7) a través de la interacción entre animales, humanos y medioambiente, los alimentos pueden contaminarse de manera directa o por contaminación cruzada durante el crecimiento y cultivo (hortalizas), recolección (leche) o faenado (carne). Se puede producir una contaminación adicional durante la manipulación postcosecha, transporte, elaboración y manipulación no higiénica de alimentos durante su preparación (FAO, 2011).

La *E. coli* patógena transmitida por los alimentos paradójicamente ha aparecido en comunidades con un mejor desarrollo sanitario e higiénico, un caso importante de contaminación por *E. coli*, fue en Alemania en el 2011, en el cual las investigaciones epidemiológicas apoyan las hipótesis a que el origen del brote fue un alimento contaminado: semillas de fenogreco importadas de Egipto.



**Figura 4.** Vía de contaminación con *E. coli* (O157:H7) a través de la interacción entre animales, humanos, cultivos y medioambiente. *Fuente:* FAO (2011)

En Alemania, desde el 2 de mayo hasta el 13 de junio de 2011, se notificaron 3.224 casos de *Escherichia coli* productora de toxina Shiga (STEC) y síndrome hemolítico urémico (SHU). De los 781 casos notificados de SHU, 69% eran mujeres y el 88% eran mayores de 20 años. Del total de casos de síndrome hemolítico urémico fallecieron 22. De los 2.447 casos de STEC/no-SHU notificados en Alemania, 59% fueron mujeres y 87% de edad igual o superior a 20 años. De estos casos no-SHU fallecieron 13. Este brote en el mismo año se extendió por otros países europeos, notificándose 36 casos de STEC/SHU y 61 casos de STEC/no-SHU. Entre estos países destacaban Suecia, con 17 casos de SHU y 30 no-SHU, Dinamarca, con 8 y 12 respectivamente; y Holanda, con 4 y 4 (OMS, 2013, y Blanco, 2011)). Esto demuestra la gran responsabilidad que debe existir en la manipulación de alimentos, y la necesidad en la investigación de métodos que contribuya a controlar y evitar estos tipos de brotes.

En cuanto a Colombia, estudios para determinar la prevalencia y tipo de agentes infecciosos que causan la diarrea encontraron en una muestra de 129 niños menores de 5 años atendidos en Tunja, Boyacá, que el 13,9% de los casos es por causa de *Escherichia coli*, los cuales estaban asociados a prácticas de higiene y de alimentación. En otro estudio en población infantil (2006) en Chia, Colombia, con un tamaño de muestra de 100 niños se encontró a *E. coli* en el 75% de los casos, asociada a un pobre estatus nutricional (Ministerio de ambiente y desarrollo sostenible, 2012). En la tabla 7, se ilustra las principales enfermedades halladas por la secretaria distrital de Bogotá relacionadas con *E. coli*, encontrándose que en la mayoría de los casos los alimentos fueron las principales causas de los brotes de esta enfermedad, acompañada de ciertos factores como manipulación y procedencia de este.

**Tabla 7.** Principales enfermedades de *E. coli* transmitidas por alimentos

| <b>Enfermedad</b>   | <b>Signos y Síntomas</b>   | <b>Alimentos Implicados</b>  | <b>Factores contribuyentes</b>   |
|---|--|--|--|
| Gastroenteritis por <i>Escherichia coli</i> patógena                    | Dolores abdominales, diarrea, náuseas, vómitos, fiebre, escalofríos, cefalalgia, mialgia   | Diversos alimentos, agua   | Trabajadores infectados que tocan los alimentos, refrigeración insuficiente, cocción inapropiada, limpieza y desinfección deficiente del equipo  |
| Diarreas por <i>Escherichia coli</i> Enterohemorrágica o verotoxigénica | Diarrea acuosa seguida por diarrea sanguinolenta, dolor abdominal severo, sangre en la orina. Secuela: Síndrome urémico hemolítico | Hamburguesa, leche cruda, embutidos, yogur, lechuga, agua            | Hamburguesa hecha de carne de animales infectados, consumo de carne y leche cruda, inadecuada cocción, contaminación cruzada, personas infectadas que tocan los alimentos listos para el consumo, inadecuada desecación y fermentación de carnes.  |
| Diarrea por <i>Escherichia coli</i> Enteroinvasiva                      | Dolor abdominal severo, fiebre, diarrea acuosa, (usualmente con mucus y sangre presentes), tenesmo                                 | Ensaladas y otros alimentos que no son tratados higiénicamente, agua | Inadecuada cocción, personas infectadas que tocan alimentos listos para el consumo, no lavado de manos después de la defecación, almacenaje de alimentos a temperatura ambiente, guardar alimentos en el refrigerador en grandes contenedores, preparar alimentos varias horas antes de servirlos, inadecuado recalentamiento de los alimentos |
| Diarrea por <i>Escherichia coli</i> Enterotoxigénica                    | Diarrea acuosa profusa (sin mucus ni sangre) dolor   | Ensaladas y otros alimentos que no son subsecuentemente              | Inadecuada cocción, personas infectadas que tocan alimentos listos para el consumo, no lavado de manos después de la defecación, almacenaje de alimentos a temperatura ambiente.   |

Fuente: Secretaria Distrital de Salud de Bogotá, (2007)

#### **4.5.2 Resistencia a los antibióticos**

Uno de los métodos más comunes para el control de estas enfermedades es el tratamiento llevado a cabo con antibiótico, sin embargo, hay un incremento de resistencia por parte del agente patógeno a estos tipos de tratamientos. Esta resistencia se produce cuando las bacterias cambian, es decir sufren una mutación de tal manera que los antibióticos ya no funcionan en las personas

que los necesitan para tratar las infecciones (OMS y Organización Panamericana de la Salud [OPS], 2014).

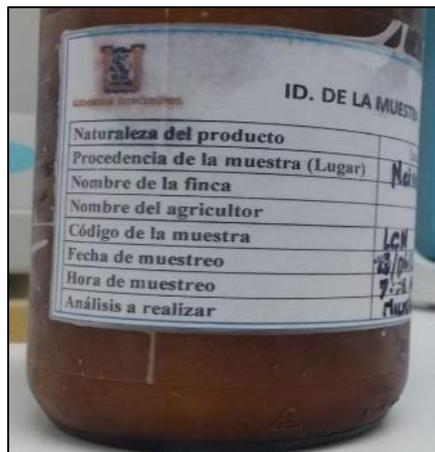
La OMS Señala que la resistencia está afectando a muchos agentes infecciosos distintos, pero se centra en la resistencia a los antibióticos en siete bacterias responsables de infecciones comunes graves, como la septicemia, la diarrea, la neumonía, las infecciones urinarias o la gonorrea. Un caso específico es la resistencia a las fluoroquinolonas, una de las clases de fármacos antibacterianos más utilizadas en el tratamiento de las infecciones urinarias por *E. coli* (World Health Organization, 2014). Por ejemplo, la *Klebsiella* es característicamente resistente a múltiples antibióticos, como la ampicilina y la carbenicilina, debido a la presencia de la  $\beta$  lactamasa SHV-1. Además se cree que la adquisición creciente de plásmidos R la está dotando de una resistencia farmacológica creciente a las cefalosporinas y a los aminoglucósidos (García y Rodríguez, 2010). La *Klebsiella pneumoniae*, propagada en todas las regiones del mundo, en algunos países ha logrado ser lo suficientemente resistente a los antibióticos carbapenémicos, que ya no son eficaces en más de la mitad de los pacientes con infecciones por *K. pneumoniae* (OMS, 2016).

Diferentes institutos de salud argumentan que sin antimicrobianos eficaces para prevenir y tratar las infecciones, intervenciones como el trasplante de órganos, la quimioterapia del cáncer, el tratamiento de la diabetes o la cirugía mayor (por ejemplo, las cesáreas o las prótesis de cadera) se convertirán en procedimientos de muy alto riesgo, por la gravedad a infecciones que no se puedan tratar con antibióticos (OMS y OPS, 2014), al igual que el tratamiento de enfermedades como diarreas agudas, que al no poder ser tratadas de manera eficaz, traería graves consecuencias en la vida de los pacientes. Una de las estrategias implementadas es reducir la cantidad de antibióticos y tratar de suplirlo con otro tipo de tratamiento, que logre contrarrestar estos procesos de contagio de las bacterias patógenas, velando por la continuidad al mayor plazo posible del éxito de la prevención y el tratamiento de las enfermedades infecciosas con medicamentos eficaces, seguros, de calidad garantizada, utilizados de forma responsable y accesibles a todas las personas que los necesiten (World Health Organization, 2014), para lo que se necesita de nuevas investigaciones en busca de estos recursos antimicrobianos.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1 Toma de muestras

Se recolectaron un total de 4 muestras de leche de cabra, 3 comercializadas en el municipio de Villavieja y una procedente del sur del municipio de Neiva. El 100% de las razas de cabra de las cuales se recolectaron las muestras de leche son tipo Saanen, con edades entre 1 y los 4 años, con una producción promedio de 1 litro/día. El procedimiento de toma de muestra se realizó de acuerdo a la NTC 666, (1996), en un envase de vidrio ámbar de un litro de capacidad, esterilizado previamente en autoclave SCI FINETECH, a 121 °C de temperatura y 15 atmosferas de presión, durante 15 minutos. Etiquetados debidamente para mostrar la naturaleza del producto, lugar y fecha de muestreo, el propósito de muestreo, nombre del agricultor y código de la muestra., transportadas en neveras de poliestireno expandido, con cierre totalmente hermético, manteniendo una temperatura ideal de 0 °C a 4°C, hasta llegar al lugar de destino, el laboratorio de microbiología de alimentos de la facultad de ingeniería de la universidad Surcolombiana, donde se almacenaron hasta el momento de su análisis.



**Figura 5.** Etiqueta de muestras

### 5.2 Encuesta a caprinocultores

Con el fin de conocer ciertas características del manejo de producción de leche de cabra en esta zona del departamento, se llevó a cabo una encuesta dirigida a las caprinocultores en las cuales se pretendía conocer la edad de las cabras, raza y alimentación principalmente, como se especifica en el anexo A.

### 5.3 Análisis Fisicoquímicos

En todas las muestras de leche de cabra recolectadas se determinaron pH, °Brix, acidez titulable, densidad, color, cenizas, viscosidad y solidos totales; los cuales permiten tener una caracterización previa de las muestras de leche de cabra obtenidos en el departamento del Huila. Cada una de las pruebas mencionadas se realizó por triplicado.

### 5.3.1 Determinación de pH

La determinación del PH se llevó a cabo mediante un potenciómetro OHAUS Starter 5000 (Figura 6). El equipo fue calibrado por medio de buffers adecuados (pH 4,00, pH 7,00 y pH 10,00) y luego se procedió directamente a la medición del valor del pH correspondiente a la muestra de cálculo.



**Figura 6.** Montaje de determinación de pH

### 5.3.2 Determinación de °Brix

La medición de los °Brix se realizó mediante un refractómetro ATAGO PR-201 alpha (Figura 7), con una previa calibración con agua destilada.



**Figura 7.** Montaje determinación de °Brix

### 5.3.3 Determinación de acidez titulable

La determinación de la acidez titulable se realizó mediante el protocolo establecido por la NTC 4978, (2001), la cual establece que para leche líquida se titula un volumen determinado de muestra para ensayo, con una solución de hidróxido de sodio 0,1 N, en presencia de fenolftaleína

como indicador (Figura 8). Para el presente estudio el volumen de la muestra tomado fue de 20 ml, a la cual se le agregaron 3 gotas de fenolftaleína al 1%, y se tituló con una solución de hidróxido de sodio 0,1 N hasta obtener un color rosa consistente por 30 segundos y un pH de 8,30 +/- 0,01, el cual fue medido con un potenciómetro OHAUS Starter 5000.

La acidez titulable fue expresada como porcentaje de ácido láctico/100 g de producto y se calculó según la ecuación 1:

$$\% \text{ ácido láctico/100 g de producto} = \frac{V \cdot 0,9}{m} \quad \text{Ecuación 1.}$$

Donde:

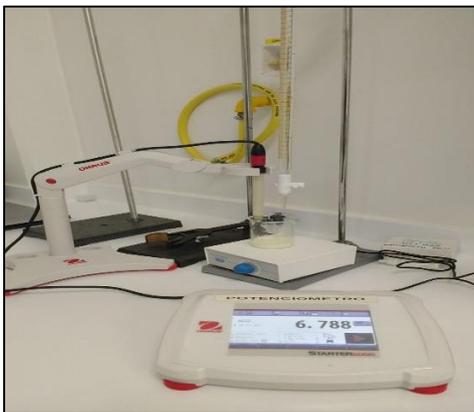
V= valor numérico del volumen, en ml, de la solución de hidróxido de sodio usada en la titulación.

m = es el valor numérico de la masa, en gramos, de la muestra para ensayo.

→ 0,9 es el factor de conversión para el ácido láctico, 1 ml de NaOH 0,1 N equivale a 0,009 de ácido láctico.

Los resultados se expresan en gramos de ácido láctico por 100 gramos de producto, con dos cifras decimales. Para convertir a grados °Dornic se multiplica por 100, teniendo en cuenta la relación:

1°D: 1 mg de ácido láctico en 10 ml de leche → 0,01% de ácido láctico = 1° Dornic.



**Figura 8.** Montaje determinación de acidez titulable

#### 5.3.4 Determinación de densidad

La determinación de la densidad se realizó mediante el método del picnómetro (Figura 9), para lo cual se pesó un picnómetro de 50 ml vacío, anotando su masa (M1), luego se llenó el picnómetro totalmente con agua (fluido de referencia), evitando la formación de burbujas en su interior, debido a que el agua sube por el capilar, es necesario secarlo antes de pesarlo y anotar su peso (M2). Posteriormente se enrasó el picnómetro con la muestra en estudio, la cual se mantuvo a una temperatura de 20 °C, y se procedió a pesar (M3). Las mediciones de peso se llevaron a cabo

en una balanza analítica OHAUS Pioneer, con cuatro decimales de precisión, y la densidad de las diferentes muestras se determinó mediante la siguiente ecuación 2:

$$\text{Densidad}_{20^{\circ}\text{C}} = \frac{M3-M1}{M2-M1} \quad \text{Ecuación 2}$$

Donde:

M1: Masa del picnómetro vacío

M2: Masa del picnómetro + agua

M3: Masa del picnómetro + la muestra



**Figura 9.** Montaje determinación de densidad

### 5.3.5 Determinación de color

Se determinó de acuerdo a la metodología descrita por McDermott et al., (2016), con un colorímetro Konica Minolta CR-410, evaluando de forma directa en una muestra de 70 ml los parámetros L, a, b, del sistema CIE (Comisión Internationale de l'Éclairage), al igual que los parámetros índices de blancura (WI) e índice de amarillo (YI). En donde L es la luminosidad y cuenta con un rango 0 al 100, siendo el 100 el blanco y 0 el negro. El parámetro “a” va de verde a rojo, con un rango de 60 a -60. El parámetro “b” va de amarillo a azul, con un rango similar al del parámetro “a”. Tanto YI y WI se determina de acuerdo a las siguientes ecuaciones 3 y 4:

$$\text{YI} = 142.86 \left[ \frac{b}{L} \right] \quad \text{Ecuación 3}$$

$$\text{WI} = 100 - \sqrt{(100 - L)^2 + a^2 + b^2} \quad \text{Ecuación 4.}$$



**Figura 10.** Calibración Equipo Konica Minolta



**Figura 11.** Montaje determinación de color

### 5.3.6 Determinación de cenizas

Se determinó por el método gravimétrico, descrito en la AOAC 923.03. Para lo cual un crisol se depositó en la estufa de desecación a 102 °C durante 1 hora, luego se sacó y dejó en el desecador, hasta enfriar a temperatura ambiente y se pesó (C1). Posteriormente se pesaron 10 gr de leche en una balanza analítica OHAUS Pioneer, los cuales se depositan en el crisol (C2), y se mantuvieron en baño maría a 100 °C entre 5 a 7 horas aproximadamente, en una estufa memmert modelo UF 55, hasta obtener secado por evaporación (Figura 12). El extracto seco, procedente del paso anterior, se incinero por calentamiento durante 2 horas y media en una mufla Terrígeno modelo D8, regulada a 525 °C. Pasado este tiempo se extrajeron y se dejaron enfriar en un desecador hasta temperatura ambiente, para posteriormente pesar en una balanza analítica OHAUS Pioneer de 4 decimales de precisión (C3).

El porcentaje de cenizas se determinó por la siguiente ecuación 5:

$$\% \text{ cenizas} = \frac{C3-C1}{C2-C1} * 100 \quad \text{Ecuación 5}$$

Donde:

- C1: Masa del crisol vacío
- C2: Masa del crisol + la muestra
- C3: Masa el crisol + cenizas



**Figura 12.** Montaje determinación de cenizas

### 5.3.7 Determinación de sólidos totales y contenido de humedad

Se determinó por el método establecido por la NTC 4979, (2001), con arena de mar o cuarzo. Se pesaron 10 gramos de arena de mar en un capsula, con una barra agitadora, la cual se llevó durante una hora a 102 °C en una estufa memmert modelo UF 55, pasado este tiempo se dejó enfriar en un desecador (Figura 13). La muestra de leche se llevó a una temperatura de 20 °C a 25 °C, se mezcló completamente para obtener una distribución homogénea de la grasa a través de la muestra. Se pesaron en la cápsula anteriormente preparada 5 ml de esta.

Posteriormente la cápsula con la muestra para ensayo sin tapa, se llevó a baño de agua en ebullición por 30 minutos, permitiendo siempre que el fondo de la cápsula estuviera lo más expuesto y directamente calentado por el vapor. Pasado este tiempo se calentó otra vez la capsula con su tapa al lado, en la estufa a 102 °C, por aproximadamente 1 hora. A continuación, se le pone la tapa a la capsula e inmediatamente se transfirió al desecador, hasta llegar a temperatura ambiente, para luego ser pesado en una balanza analítica OHAUS Pioneer. Este procedimiento anterior se repitió hasta que la diferencia en masa entre dos pesadas consecutivas no excedió 1 mg, y se registró la masa mínima obtenida.

El contenido de sólidos totales expresado como porcentaje en masa, se calculó según la ecuación 6:

$$Tc = (m2 - m0)/(m1 - m0) \times 100 \quad \text{Ecuación 6}$$

Donde:

Tc = Sólidos totales

m0 = Masa en gramos, de la capsula con la tapa, la varilla de mezclado y la arena.

m1 = Masa, en gramos, de la cápsula con la tapa, la varilla de mezclado, la arena y muestra antes del secado.

m2= Masa, en gramos, de la cápsula con el residuo, junto con la tapa, la varilla de mezclado y la arena, después del secado, en el caso de la leche.

En cuanto al contenido de agua en la muestra se determinó por medio de la siguiente ecuación 7:

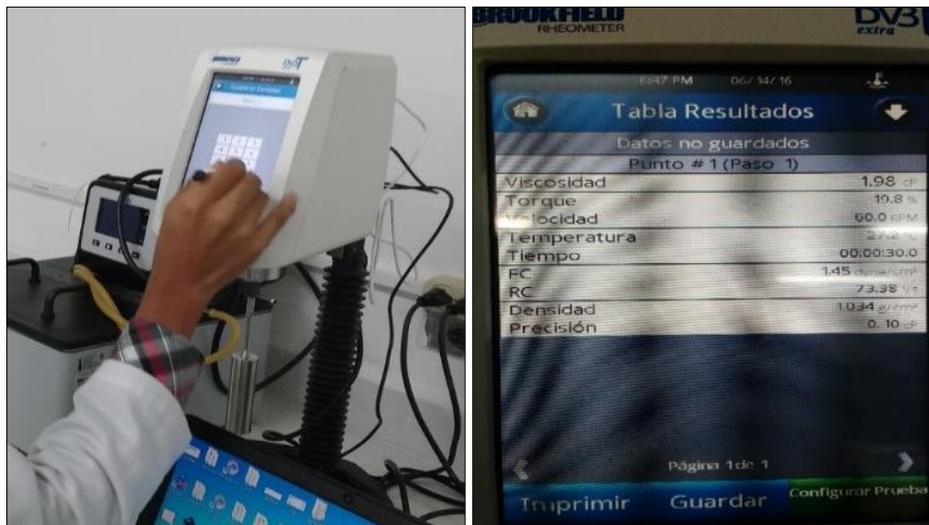
$$\% \text{ humedad} = \frac{m1 - m2}{m1 - m0} \times 100 \quad \text{Ecuación 7}$$



**Figura 13.** Montaje determinación de solidos totales

### 5.3.1 Determinación de viscosidad

Se determinó de acuerdo a la metodología propuesta por Melgarejo, (2014), implementando el reómetro digital Brookfield DV-I (Brookfield Engineering Laboratorios Inc.), tomando la viscosidad de manera puntual en una muestra de 16 ml, durante 30 segundos a una velocidad de 60 rpm, con el eje ULA, el cual es el de viscosidades ultra bajas. Con las mismas características de volumen de muestra y eje se tomaron mediciones a diferentes velocidades, en un rango de 45 rpm a 120 rpm, con un aumento de 15 rpm cada 10 s, para poder establecer la relación entre el esfuerzo y el cizallamiento.

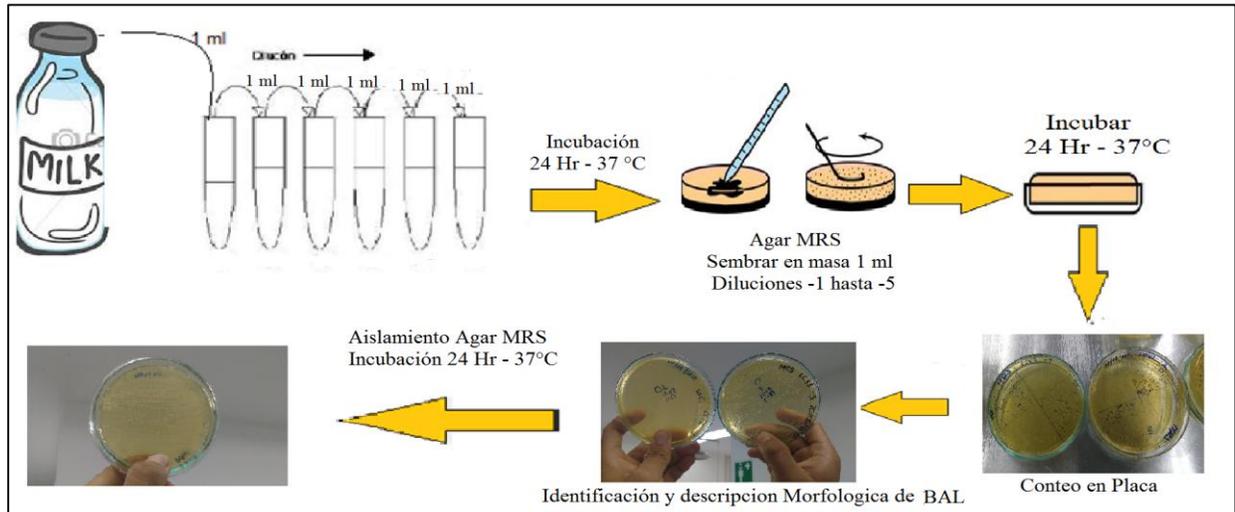


**Figura 14.** Montaje determinación de viscosidad

### 5.4 Aislamiento y caracterización de BAL de leche de cabra

Se inoculo 1 ml de cada una de las muestras de leche de cabra en tubos de ensayo con 9 ml de caldo MRS (Anexo B), realizando diluciones seriadas, los cuales se incubaron a 37 °C, durante

24 horas. Posteriormente se inoculo 1 ml de cada una de las diluciones en agar MRS (Anexo B), implementado una siembra por masa, y se llevaron a incubación por 24 horas a 37°C, en una Incubadoras Heratherm de Thermo Scientific-IMH60-S. Pasado este tiempo se realizó recuento UFC/ml en placa, y se aislaron colonias representativas de cada muestra, las cuales se propagaron nuevamente en medio de cultivo MRS, y se les llevo a cabo caracterización fenotípica, tinción de Gram, catalasa, oxidasa, movilidad y producción HS<sub>2</sub>.



**Figura 15.** Aislamiento de BAL

#### 5.4.1 Tinción de GRAM

Se realizó de acuerdo a la NTC 4092, (2009). A partir de un cultivo de 18 h a 24 h, se toma una alícuota y se expandió en un portaobjetos totalmente estéril y se hizo la fijación con llama. La película bacteriana se cubrió con cristal violeta, permitiendo la reacción durante 1 min. Luego se lavó ligeramente con agua el portaobjetos inclinado durante pocos segundos.

Posteriormente se agregó lugol, durante un minuto. Se lavó ligeramente con agua el portaobjetos inclinando durante pocos minutos. A continuación, se cubrió con una película de etanol (95 %) sobre el portaobjetos inclinado durante un período no mayor a 30 segundos hasta que ya no se observó ninguna coloración violeta. Luego se enjuago ligeramente con agua el portaobjetos inclinado con el fin de eliminar el etanol, y se cubrió el portaobjetos con fucsina durante 3 minutos.

#### 5.4.1 Prueba de Catalasa

Esta prueba bioquímica se implementó para comprobar la presencia del enzima catalasa que se encuentra en la mayoría de las bacterias aerobias y anaerobias facultativas que contienen citocromo. Mediante un asa de siembra estéril se transfirió el centro de una colonia pura de 24 horas y se depositó en un portaobjetos totalmente estéril. Después se agregó con una pipeta Pasteur una gota de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30%. La presencia de gas o efervescencia indico positivo para catalasa y su ausencia catalasa negativo.

### 5.4.2 Prueba de Oxidasa

El procedimiento consistió en transferir con un asa de siembra estéril el centro de una colonia pura de 24 horas a tiras de papel que contienen reactivo para amino-N-dimetil-anilina. La coloración azul indico resultado positivo para oxidasa, y la ausencia de cambio de color oxidasa negativo.

### 5.4.3 Prueba de Movilidad y producción de HS<sub>2</sub>

Mediante tubos de ensayo dispuestos con medio de cultivo SIM (Anexo B), se realizó una siembra por punzación profunda usando aguja de inoculación recta, abarcando un tercio de la profundidad del medio de cultivo desde la superficie, y posteriormente se llevó a incubación por 24 horas a 37 °C, en una incubadora Heratherm de Thermo Scientific-IMH60-S. Para movilidad la presencia de turbidez o crecimiento más allá de la línea de crecimiento se tomó como resultado positivo, un crecimiento localizado solamente en la línea de siembra se reportó como resultado de movilidad negativo. Para la producción de sulfuros se tuvo en cuenta la presencia de precipitados de color oscuro.

### 5.4.4 Prueba de Citrato de Simons

Mediante tubos de ensayo dispuestos con medio de cultivo Citrato de Simons (Anexo B), en forma de pico de flauta, se realizó una siembra en la superficie, llevando a incubación en una incubadora Heratherm de Thermo Scientific-IMH60-S, por 24 horas a 37 °C. Los resultados se interpretaron positivos si en el pico de flauta se evidenciaba un crecimiento con un cambio de coloración del medio de cultivo a azul intenso.

## 5.5 Evaluación de la capacidad antimicrobiana de las BAL

Las cepas de los patógenos *E. coli* y *Klebsiella* se obtuvieron de los aislamientos llevados a cabo en alimentos contaminados por (Perez, 2015), en el trabajo de investigación análisis microbiológico de alimentos preparados en la vía pública en los alrededores de la universidad Surcolombiana mediante el estudio de coliformes. Para esta investigación en particular se utilizaron una cepa obtenida de los aislamientos, especificados en la tabla 8.

**Tabla 8.** Cepas de patógenos

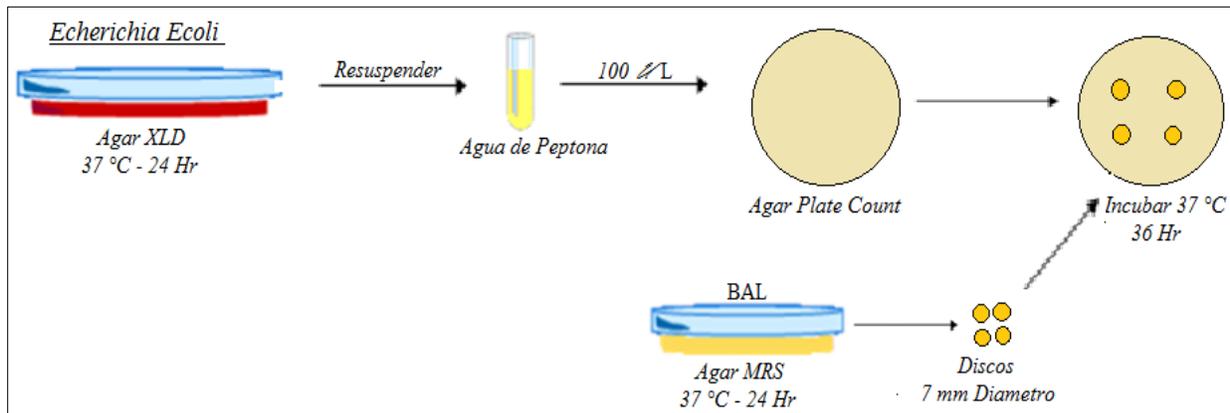
| <b>Cepa</b>       | <b>Procedencia</b>                                   | <b>Nomenclatura</b>   |
|-------------------|--|-----------------------|
| <i>E. coli</i>    | Restaurante de salud de la universidad Surcolombiana | <i>E. coli</i> RS     |
| <i>E. coli</i>    | Ají de venta ambulante                               | <i>E. coli</i> AVA    |
| <i>Klebsiella</i> | Salpicón cafetería de la facultad de salud           | <i>Klebsiella</i> CSS |
| <i>Klebsiella</i> | Arepa venta ambulante                                | <i>Klebsiella</i> AVA |

### 5.5.1 Capacidad antimicrobiana en presencia de células

Se empleó la técnica descrita por Amorocho, (2011) para evaluar la inhibición de *E. coli* en presencia de células BAL. Estas cepas se sembraron en medio XLD (Anexo B), y se incubaron

por 24 horas a 37 °C. Después de incubación, cada cepa se resuspendió en Agua de peptona (Anexo B), de las cuales se tomó una alícuota de 100 µl y se extendió sobre una placa de agar Plate Count (PCA) (Anexo B) con un asa estéril.

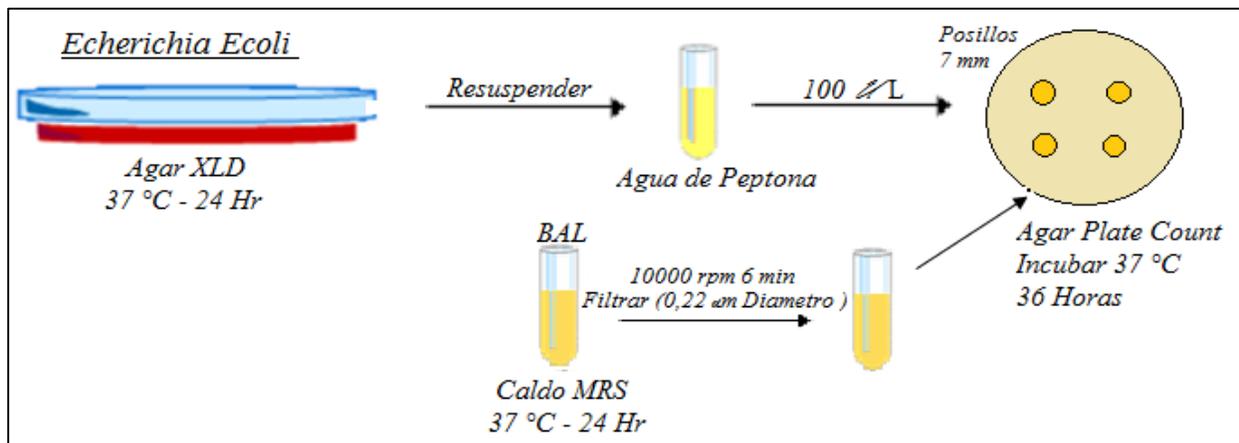
De cada cepa ácido láctica se obtuvieron discos de 7 mm de diámetro cortándolos directamente con un sacabocados estéril de un cultivo en masa de 24 horas en agar MRS. Los discos se depositaron sobre la placa de agar PCA donde previamente se había extendido el patógeno. Las placas se incubaron a 37°C durante 36 horas en una incubadora Heratherm de Thermo Scientific-IMH60-S, realizando lecturas de los halos de inhibición a las 16, 24 y 36 horas de incubación. Los ensayos se realizaron por triplicado.



**Figura 16.** Evaluación de la actividad antimicrobiana en presencia de células

### 5.5.2 Capacidad antimicrobiana en ausencia de células

Se empleó la técnica descrita por Amorocho, (2011), en la cual a partir de un cultivo de 24 horas de cada cepa láctica en agar MRS, se inoculó una alícuota en tubos de 9 ml de caldo MRS que se incubó a 37°C en una incubadora Heratherm de Thermo Scientific-IMH60-S. Después de 24 horas, se tomó una alícuota de 5 ml del cultivo líquido, que se centrifugó a 6.000 rpm, durante 10 minutos. Con el propósito de eliminar las células, el sobrenadante obtenido se esterilizó mediante el uso de filtros con membrana de nitrocelulosa y 0.22 µm de diámetro.



**Figura 17.** Evaluación de la actividad antimicrobiana en ausencia de células

Mediante un sacabocados estéril, se diseñaron pocillos de 7 mm de diámetro en placas de agar PCA donde previamente se había extendido el patógeno. En cada pocillo se adicionó 60 µl de cada sobrenadante, realizando ensayos a pH ácido y a pH 7 ajustando con NaOH 1N. Las placas se incubaron a 37°C, durante 36 horas en una incubadora Heratherm de Thermo Scientific-IMH60-S, realizando lecturas de los halos de inhibición a las 16, 24 y 36 horas de incubación. Los ensayos se realizaron por triplicado.

## **5.6 Sensibilidad a antibióticos**

Se emplearon 2 antibióticos para probar la sensibilidad de las cepas de BAL, aisladas. Las concentraciones implementadas fueron de 80 mg/ 400 mg / 5 ml de Trimetoprim Sulfametoxazol y 250 mg/ 5 ml de cefalexina.

Se sembró una alícuota de cada una de las cepas seleccionadas en caldo MRS sin agitación incubándolas a 37°C durante 24 horas en una incubadora Heratherm de Thermo Scientific-IMH60-S. Pasado el tiempo de incubación se sembraron 0.1 ml del cultivo de caldo MRS a placas con Agar MRS. Los antibióticos se impregnaron en discos de papel filtro de 8 mm de diámetro, esterilizados en auto clave SCI FINETECH. Posteriormente estos discos se depositaron con una pinza estéril en las placas inoculadas con las cepas aisladas, y se llevaron a incubación a 37°C por 24 horas en una incubadora Heratherm de Thermo Scientific-IMH60-S. Pasado el tiempo de incubación se realizó lectura y registro de los halos de inhibición. Los ensayos se realizaron por duplicado.

## **5.7 Análisis estadístico**

Se realizó un análisis de varianza simple (ANOVA) para los datos de inhibición en cada uno de los tratamientos y entre tratamientos. El F-test en la tabla ANOVA comprueba si existe alguna diferencia significativa entre medias. En caso de presentarse valores atípicos se elige el test no paramétrico de Kruskal-Wallis que compara las medianas en lugar de las medias. Al igual se realizaron Pruebas de ANOVA factorial para observar las interacciones de la inhibición y tipo de tratamiento, tiempo y tipo de cepa BAL. Las diferencias entre medias o medianas fueron consideradas significativas cuando  $p < 0.05$ . Utilizando el paquete estadístico StatGraphics Plus 5.1 para Windows (Manugistics, Inc., Rockville MD, USA.), y en todos los análisis se verificaron los supuestos para la aplicación de ANOVA, en todos los casos se utilizó las pruebas LSD Fisher, con un nivel de confianza del 95%.

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1 Zonas de muestreo

se recolectaron un total de 4 muestras de leche de cabra, como se especifica en la tabla 9. Las zonas pertenecientes a la recolección de las muestras LCV1 y LCV2, eran zonas áridas, con suelos erosionados y alta pendientes, humedad entre 55% y 65%, temperaturas entre 28°C y 29,5°C, con vegetación prevaleciente de cactus y arbustos espinosos (Pela, tachuelo, dinde). Las zonas correspondientes a la toma de muestras LCV3 y LCN1, correspondían a terrenos más llanos y con una mayor presencia de forrajes verdes, humedad entre 60% y 70%, con temperaturas de 25°C y 27 °C.

**Tabla 9.** Procedencia muestras de leche de cabra

| Municipio  | Nombre del lugar      | Nomenclatura |
|------------|-----------------------|--------------|
| Villavieja | El Rincón del Cabrito | LCV1         |
| Villavieja | Estadero la Tatacoa   | LCV2         |
| Villavieja | Chicuhali             | LCV3         |
| Neiva      | ---                   | LCN1         |

### 6.2 Propiedades fisicoquímicas de las muestras de leche de cabra

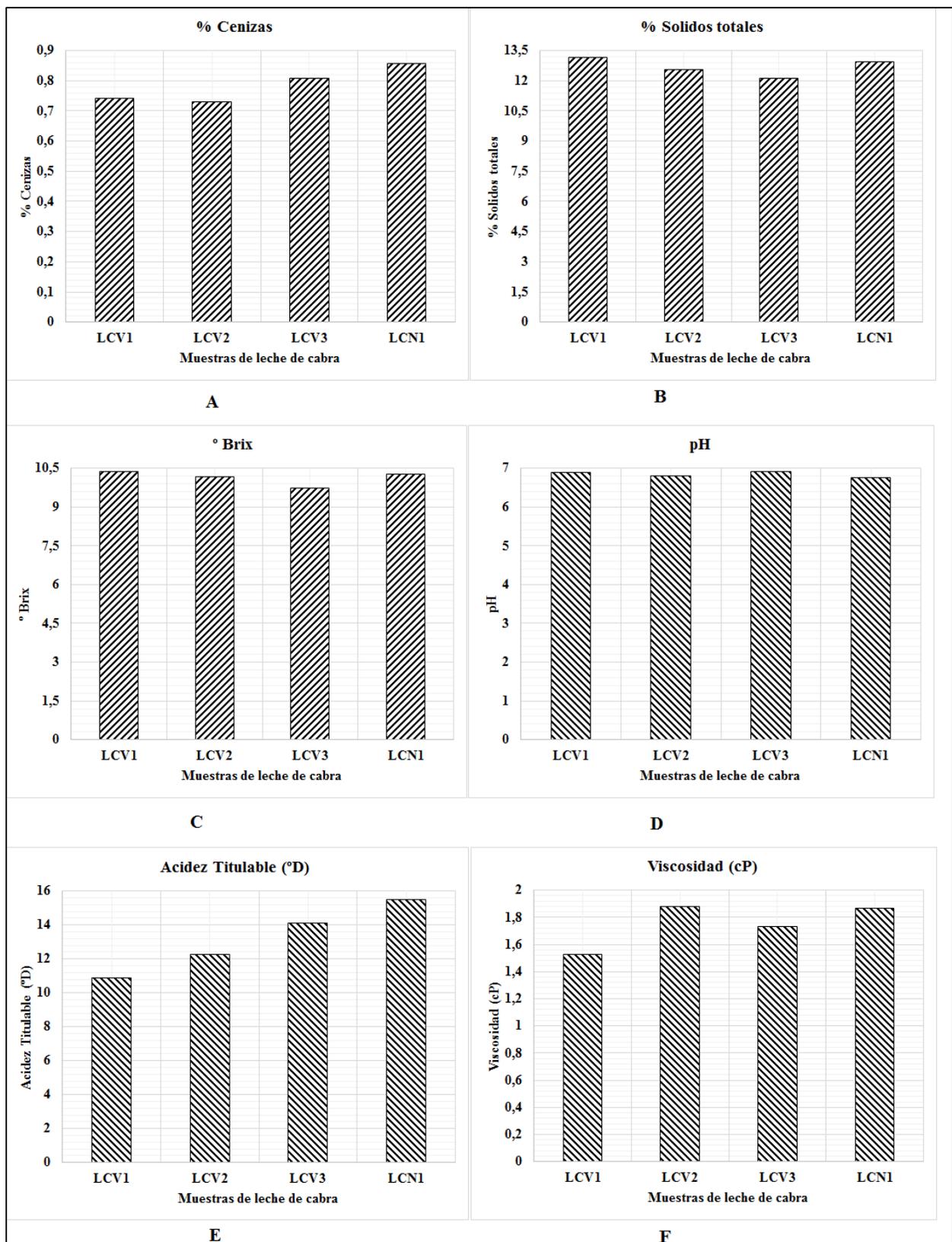
Las propiedades fisicoquímicas de las muestras de la leche de cabra se muestran en la tabla 10. Los valores hallados de pH, densidad, % solidos totales y % cenizas, están dentro los rangos reportados en estudios de leche cabra por Quiles y Hevia, 1994., Chacon, 2005., Ludeña, Peralta, y Arroyo, 2006., Vega *et al* ., 2007., Flores *et al* ., 2009., y Bedoya *et al* ., 2012, considerados como valores normales para la leche producida por este tipo de rumiantes.

**Tabla 10.** Propiedades físico químicas de las muestras de leche de cabra

| Muestra de leche | Densidad (g/ml) | pH   | °Brix | Acidez Titulable (°Dornic) | %Solidos totales | %Cenizas | Viscosidad (Cp) | Conteo de BAL UFC/ml  |
|------------------|-----------------|------|-------|----------------------------|------------------|----------|-----------------|-----------------------|
| LCV1             | 1,028           | 6,88 | 10,37 | 10,87                      | 13,14            | 0,74     | 1,53*           | 7 x 10 <sup>5</sup>   |
| LCV2             | 1,035           | 6,80 | 10,17 | 12,24                      | 12,55            | 0,73     | 1,88*           | 3,2 x 10 <sup>4</sup> |
| LCV3             | 1,033           | 6,90 | 9,73  | 14,09                      | 12,13            | 0,81     | 1,73*           | -                     |
| LCN1             | 1,035           | 6,76 | 10,27 | 15,29                      | 12,95            | 0,85     | 1,87            | -                     |

\*Los valores de viscosidad corresponden a temperatura ambiente 25 °C – 27 °C

En general como se ilustra en la figura 18, todas las muestras presentas gran similaridad en las caracteristicas fisico quimicas, exceptuando % cenizas (A) la acidez titulable (E), la viscosidad (F), y el recuento de UFC/ml de BAL, las cuales evidencia una diferencia entre muestras. En cuanto a la acidez titulable, las muestras LCV1 y LCV2 no se encuentran en los valores normalente respportados para la leche de cabra, los cuales corresponden a rangos entre 14 °D y 16 °D, para considerarse de buena calidad, sin embargo esto puede deberse a que las propiedades fisico quimicas pueden variar de acuerdo al tipo de raza, edad de la cabra y edad lactancia donde se ha encontrado que el ácido lactico decrece a medida que avanza el estado de lactancia (Chacon, 2005).



**Figura 18.** Propiedades fisicoquímicas de las muestras de leche de cabra

Por otro lado la composición de la leche es el resultado de varios factores extrínsecos e intrínsecos, siendo el de la nutrición animal el factor con mayor importancia, ya que variaciones de la dieta pueden traer cambios importantes en la producción y composición de la leche (Salvador y Martínez, 2007). En este ámbito en el presente estudio se encontró que el 100% de las cabras de las cuales se tomaron las muestras de leche son alimentadas diariamente con sal y miel de purga, pero difieren en el modo de pastoreo y tipo de vegetación en su dieta diaria. Donde las mayores diferencias se encuentran en el consumo de vegetación como el pela (*Acacia farnesiana*), el cardo y matarraton (*Gliricidia sepium*), administradas en la dieta de las LCV1 y LCV2, pero ausentes en las otras, en las cuales predomina el uso de forrajes verdes y el guasimo (*Guazuma ulmifolia*). Otra diferencia es el tipo de manejo en el pastoreo, en las LCN1 y LCV3, se realiza compartido en corral y libre pastoreo en zonas llanas, donde predomina las gramíneas forrajeras, mientras en las otras dos el único manejo es el del libre pastoreo en zonas áridas y de altas pendientes.

Estas características mencionadas anteriormente, pueden tener su influencia directa en relación con propiedades como la acidez titulable, el crecimiento final de las BAL y % de cenizas, ya que estas propiedades están determinadas, por factores genéticos (especie, raza, variedad) y medioambientales (Sanz *et al.*, 2003., Chacon, 2005., Salvador & Martínez, 2007., y Bedoya *et al.*, 2012).

Generalmente el crecimiento de BAL está asociado a un alto valor de acidez titulable, sin embargo, en el presente estudio se encontró que en los valores más bajos de acidez titulable presentaron un mayor crecimiento de BAL, los cuales correspondieron a las muestras LCV1 y LCV2. Esto puede ser debido a los factores descritos anteriormente, como también a que las BAL de estos tipos de muestras son consideradas “indígenas”, dificultando su producción en masa, la falta de condiciones de anaerobiosis, por ejemplo puede ser fundamental, ya que su sensibilidad al oxígeno puede ser muy variable según las cepas: desde anaerobia estricta, aerotolerante e insensible (Mora y García, 2007).

En cuanto al color en la tabla 11, se muestran los parámetros experimentales encontrados con el colorímetro Konica minolta CR-410 y los parámetros WI y YI calculados a partir de las coordenadas CIE; el análisis estadístico permite observar diferencias estadísticamente significativas en las coordenadas a\* y b\* en función de las muestras, de igual manera los parámetros YI y WI presentaron diferencias estadísticamente significativas.

**Tabla 11.** Parámetros experimentales y calculados de las coordenadas CIELab para cada una de las muestras de leche de cabra

| Muestra | parámetros experimentales |                     |                      | Parámetros calculados |                     |
|---------|---------------------------|---------------------|----------------------|-----------------------|---------------------|
|         | L                         | b                   | a                    | WI                    | YI                  |
| LCN1    | 74,63 <sup>a</sup>        | 10,893 <sup>a</sup> | -2,973 <sup>ab</sup> | 72,146 <sup>a</sup>   | 20,856 <sup>a</sup> |
| LCV1    | 79,09 <sup>a</sup>        | 9,483 <sup>b</sup>  | -3,2 <sup>b</sup>    | 76,8136 <sup>ab</sup> | 17,129 <sup>b</sup> |
| LCV2    | 77,107 <sup>a</sup>       | 11,153 <sup>a</sup> | -3,09 <sup>b</sup>   | 74,331 <sup>ab</sup>  | 20,663 <sup>a</sup> |
| LCV3    | 76,303 <sup>a</sup>       | 9,827 <sup>b</sup>  | -2,55 <sup>a</sup>   | 74,216 <sup>b</sup>   | 18,40 <sup>c</sup>  |

Los valores encontrados de luminosidad (L), a\* y b\*, estos se encuentran por debajo de los rangos encontrados por otros autores como Bernabé, (2016), quien reportó datos entre rangos de 85- 86, -0.85 y -0.89, 5 y 7, respectivamente para cada parametro. Estas diferencias encontradas puede ocurrir debido a que estos parametros dependen, en el caso de la luminosidad de los glóbulos de grasa y las micelas de caseína, que dispersan la luz, concentraciones que estan influenciadas por los factores geneticos y medio ambientales de los rebaños de cabra.

Los estudios sobre viscosidad de la leche de cabra reportados son escasos, aunque algunos autores como Park, (2007) Miocinovic *et al* ., (2016) han informado que los valores para este tipo de producto se encuentran entre 2,12 Cp y 2,2 Cp, considerandose mucho mayor a la de la vaca de 1,7 cp, otorgada por las diferencias en el contenido de solidos totales. Los valores encontrados en las muestras de cabra estan en el rango de 1,5 Cp y 1,9 Cp, discrepando de los reportados anteriormente, sin embargo hay que tener en cuenta que la viscosidad se ve afectada por el estado y las concentraciones de grasa, proteína, temperatura, pH, y la edad de la producción de leche; la relacion de este conjunto de factores puede alterar de una manera drastica los valores esperados de viscosidad para la leche (Quiles y Hevia, 1994). De igual manera los resultados mostraron que el comportamiento de este fluido es de un liquido newtoniano, lo que significa que el esfuerzo cortante ejercido es proporcional a la velocidad de cizallamiento (Anexo C).

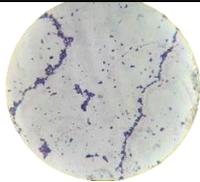
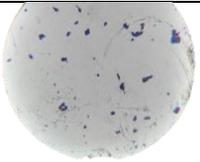
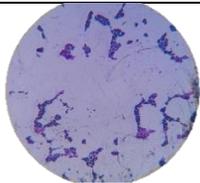
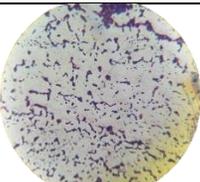
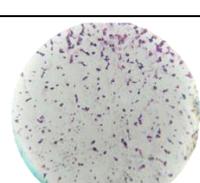
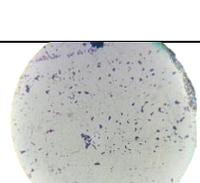
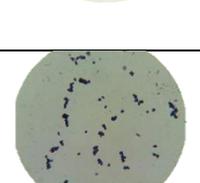
### 6.3 Aislamiento de BAL

De las muestras recolectadas se aislaron un total 8 bacterias, de las cuales, de acuerdo a las pruebas bioquímicas de comprobación, se encontró que 7 de ellas se pueden considerar como posibles cepas BAL. En la tabla 12 se presenta la caracterización morfológica de las BAL en placa y las respectivas tinciones de las colonias obtenidas durante el muestreo. Los resultados correspondieron a bacterias Gram positivas, con una morfología en su mayoría de cocos de un diámetro de 0,4 a 2 mm.

Todas las 7 cepas dieron respuesta negativa a oxidasa, producción de sulfuros, movilidad y a la utilización de citrato como única fuente de energía-carbono, como lo ilustra la tabla 13. Estos resultados son congruentes con las características propias de las BAL, ya que son microorganismos inmóviles, incapaces de sintetizar ATP por respiración, es decir no sintetizan citocromos y otros enzimas que contengan grupos hemo (Stainer *et al* ., 1992), dando como resultado catalasa negativa y en su gran totalidad oxidasa negativa, en tanto que al metabolismo del citrato como única fuente de carbono-energía en las BAL, el resultado negativo puede corresponder a que las BAL, consiguen metabolizar el citrato, pero no lo usan como fuente de energía, sino que solo es metabolizado en presencia de azúcar fermentable como la lactosa (Romero y Shelly, 2004).

En cuanto a los resultados de catalasa, 4 de las 7 BAL aisladas presentaron una catalasa débil, esto puede ser debido a que cierto tipo de BAL, son capaces de tomar grupos hemos externos, llegando a formar una catalasa no hemica denominada *pseudocatalasa*, que consigue combinarse con la hemina aportada de forma exógena, produciendo unos resultados similares a las propiedades de la enzima catalasa (Stainer *et al* ., 1992).

**Tabla 12.** Identificación de las colonias BAL de las muestras de leche de cabra

| <i>Colonia</i> | <i>Descripción en placa</i>  | <i>Imagen Microscopio</i>  | <i>Gram</i> | <i>Morfológica</i>         |
|----------------|--|--|-------------|----------------------------|
| <b>Av2</b>     | Forma circular, de elevación convexa, con borde entero, superficie lisa, pigmentación blanca y un diámetro de 1,2 mm                       |    | Gram +      | Cocos en cadena            |
| <b>Bv2</b>     | Forma circular, de elevación convexa, con borde entero, superficie lisa, pigmentación blanca y un diámetro de 1 mm                         |    | Gram +      | Cocobacilares              |
| <b>Cv2</b>     | Forma circular, de elevación convexa, con borde entero, superficie lisa, pigmentación blanca y un diámetro de 0,6 mm                       |    | Gram +      | Cocos (cadenas y sarcina ) |
| <b>Dv1</b>     | Forma circular, de elevación convexa, con borde entero, superficie lisa, pigmentación blanca, consistencia cremosa y un diámetro de 1 mm   |   | Gram +      | Cocos en cadena            |
| <b>Ev1</b>     | Forma circular, de elevación convexa, con borde entero, superficie lisa, pigmentación blanca, consistencia cremosa y un diámetro de 0,4 mm |  | Gram +      | Diplococos                 |
| <b>Fv1</b>     | Forma circular, de elevación convexa, con borde entero, superficie lisa, pigmentación blanca, consistencia cremosa y un diámetro de 1 mm   |  | Gram +      | Cocos en cadena            |
| <b>Hv2</b>     | Forma circular, de elevación convexa, con borde entero, superficie lisa, pigmentación beis, consistencia cremosa y un diámetro de 2 mm     |  | Gram +      | Cocos (sarcina)            |

**Tabla 13.** Características cepas lácticas aisladas

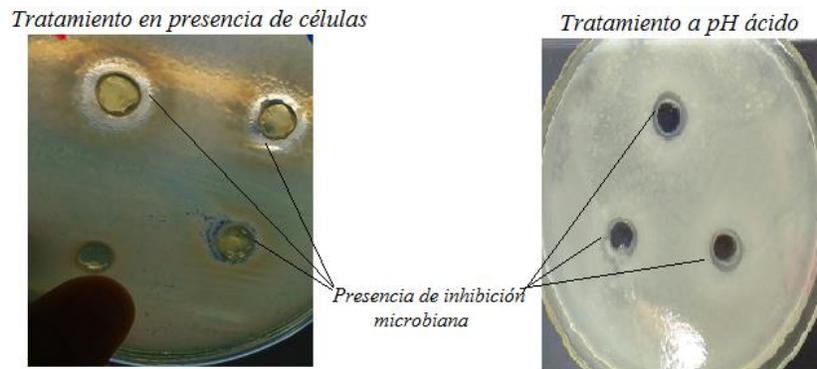
| <i>Colonia</i> | <i>Catalasa</i> | <i>Oxidasa</i> | <i>Movilidad</i> | <i>Producción HS<sub>2</sub></i> | <i>citrato única fuente carbono- Energía</i> |
|----------------|-----------------|----------------|------------------|----------------------------------|--|
| <b>Av2</b>     | -               | -              | -                | -                                | -  |
| <b>Bv2</b>     | -               | -              | -                | -                                | -  |
| <b>Cv2</b>     | -               | -              | -                | -                                | -  |
| <b>Dv1</b>     | +/-             | -              | -                | -                                | -  |
| <b>Ev1</b>     | +/-             | -              | -                | -                                | -  |
| <b>Fv1</b>     | +/-             | -              | -                | -                                | -  |
| <b>Hv2</b>     | +/-             | -              | -                | -                                | -  |

#### 6.4 Potencial antimicrobiano de BAL aisladas

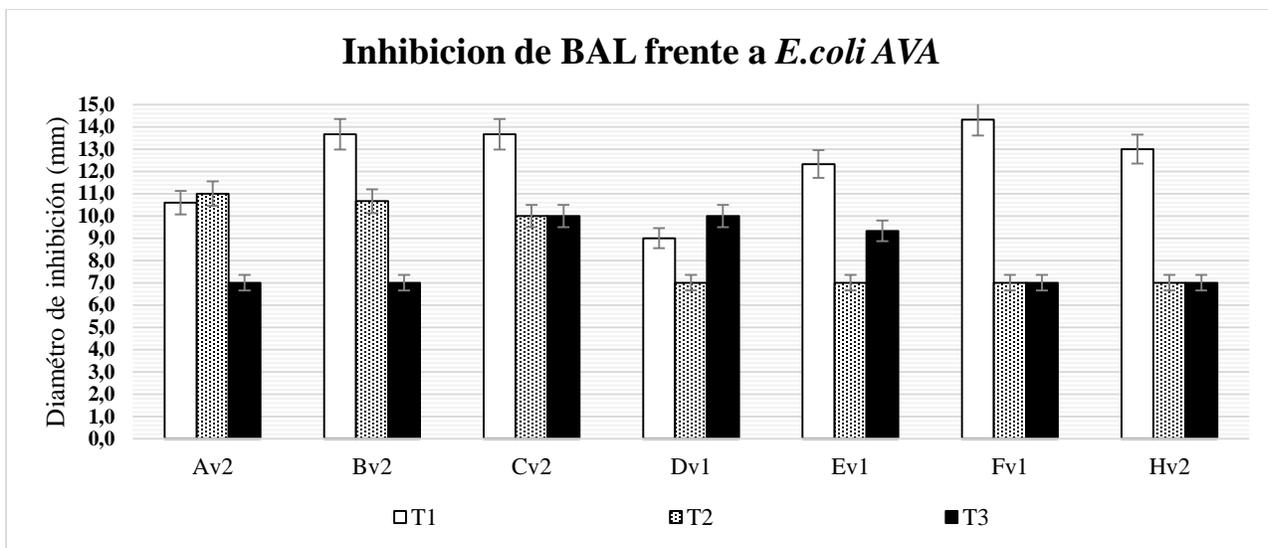
Los resultados de inhibición de las diferentes cepas lácticas aisladas frente a los patógenos obtenidos de alimentos contaminados *Echericha Coli* y *Klebsiella*, se muestran en el anexo D. Se emplearon los métodos de discos para evaluar la presencia de células, y el de sobrenadante en pocillo a pH ácido y pH neutro, para evaluar la acción de los ácidos orgánicos y metabolitos producidos por las BAL, como las bacteriocinas, en un total de 12 ensayos, con 2 cepas de *E. coli* y 2 de *Klebsiella*.

##### 6.4.1 Actividad antimicrobiana frente a *E. coli*.

Los resultados de actividad antimicrobiana evidencian que existe una capacidad antimicrobiana de las cepas aisladas frente *E. coli*, encontrándose que el 100% de las bacterias expresaron actividad antimicrobiana frente a *E. coli* AVA y *E. coli* RS, en el método de discos, y solo un 42% y 28%, presentaron actividad en los tratamientos con pH ácido y pH neutro respectivamente, frente a los dos cepas de *E. coli*, destacándose la colonia Cv2 la cual evidencio actividad antimicrobiana frente *E. coli* AVA, en los tres tratamientos, como en se ilustra en la figura 20.



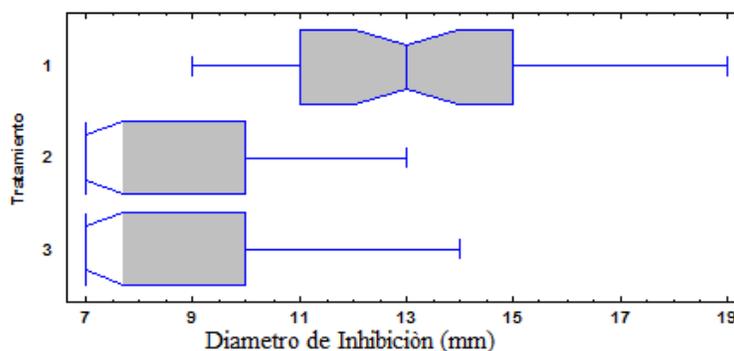
**Figura 19.** Ensayo de Inhibición, cepa BAL Cv2 frente a *E. coli* AVA



**Figura 20** Actividad antimicrobiana de las BAL aisladas de leche de cabra en presencia de células. (T1) y ausencia de células a pH ácido (T2) y pH neutro (T3)

Por lo anterior se demuestra que el mejor comportamiento de inhibición de las BAL frente a *E. coli* se manifestó en el tratamiento de presencia de células, con una media de diámetro de inhibición de 13,07 +/- 2,4. En la evaluación del efecto inhibitorio de los ácidos orgánicos (T2) y de metabolitos producidos por las BAL aisladas (T3), se mantuvo unas medias de inhibición de 8,4 +/- 1,9 y 8,3 +/- 2,1.

El análisis estadístico, mediante la aplicación del test de Kruskal-Wallis entre los métodos presencia, ausencia de células a pH ácido y neutro mostraron que existen diferencias estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ) entre los métodos utilizados (Figura 21). Los porcentajes y las frecuencias de inhibición de las BAL estudiadas en cada tratamiento se muestran en la tabla 14. De igual forma para determinar los porcentajes de eficacia de cada cepa láctica frente al patógeno en los tres métodos, se asignaron valores de 1 a los casos donde hubo inhibición y 0 en los casos de no inhibición. De este modo, no se encontraron diferencias significativas entre cepas lácticas; aunque, si hubo diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) al aplicar el estadístico Chi-cuadrado de Pearson a los resultados de inhibición de las cepas lácticas frente a las cepas de *E. coli*.



**Figura 21.** Comparación entre métodos aplicados a la inhibición de las BAL frente a *E. coli*. 1= Presencia de células, 2= Ausencia de células pH Acido, 3=Ausencia de células pH Neutro.

En el tratamiento de pH neutro las cepas BAL Dv1 y Fv1 fueron las únicas que lograron hacerlo frente a *E. coli* RS, de igual manera estas dos cepas presentaron inhibición en frente *E. coli* AVA junto con la cepa Cv1, mientras en el tratamiento a pH ácido las cepas que ejercieron capacidad antimicrobiana fueron Bv2 y Ev1 frente a *E. coli* RS, mientras las cepas Av2, Bv2 y Cv2 lo hicieron frente a *E. coli* AVA.

**Tabla 14.** Porcentaje de inhibición de las BAL aisladas de leche de cabra frente a las cepas de *E. coli*

|                           |               | Inhibición frente a <i>E. coli</i> AVA |        | Inhibición frente a <i>E. coli</i> RS |        |
|---------------------------|---------------|--|--------|---------------------------------------|--------|
|                           |               | No Inhibe                              | Inhibe | No Inhibe                             | Inhibe |
| Presencia de células (T1) | Numero de BAL | 0                                      | 7      | 0                                     | 7      |
|                           | % Del método  | 0%                                     | 100%   | 0%                                    | 100%   |
| pH Ácido (T2)             | Numero de BAL | 4                                      | 3      | 4                                     | 3      |
|                           | % Del método  | 56,2%                                  | 42,8%  | 57%                                   | 43%    |
| pH Neutro (T3)            | Numero de BAL | 4                                      | 3      | 4                                     | 3      |
|                           | % Del método  | 56,2%                                  | 42,8%  | 57%                                   | 43%    |

Chi-cuadrado de Pearson de 32,15  $p < 0.05$  (El  $\chi^2$  muestra que existe diferencia entre los métodos)

En cuanto a la capacidad inhibitoria de BAL aisladas de leche de cabra también fue efectiva frente a *E. coli* en el estudio llevado a cabo por López, (2010), donde se aislaron 5 cepas de muestras de suero de leche de cabra y sus derivados, y el de Carrera, (2015), quien evidencio capacidad inhibitoria de bacteriocinas producidas por BAL aisladas de diferentes muestras de leche, entre ellas de cabra, frente a diferentes patógenos como *E. coli*.

Otros estudios, donde se han aislado BAL de alimentos, como los llevados a cabo por Cruz, (2006) Montoya, Estrada, y Gutiérrez, (2006) Villarreal, Carrasco, Russell, y Simonetta, (2011), Gaitan, (2013), también se ha comprobado actividad antimicrobiana frente *E. coli*. En el presente estudio se encontró que el 100 % de las BAL tiene acción antimicrobiana frente a las cepas de *E. coli* testadas, siendo este el método de mejor comportamiento, resultados que son similares a los obtenidos por Montoya *et al*., (2006) quienes comprobaron que los extractos obtenidos de los *L. plantarum* y *L. brevis* presentan una acción bactericida frente a *Salmonella* sp. y *E. coli*; teniendo una mejor acción inhibitoria los extractos crudos producidos por la *L. plantarum*, de igual manera Del Campo *et al*., (2008) encontró una mayor presencia de inhibición a *E. coli* en el método de presencia de células, concluyendo que la presencia de las BAL es necesaria para inhibir a este tipo de patógenos, efecto que se puede atribuir a la capacidad de las BAL para adaptarse al medio, competir por nutrientes, y/o a la presencia de dióxido de carbono, no permitiendo el desarrollo de otros microorganismos.

Villarreal *et al*., (2011) encontró en los ensayos de cinética de muerte celular una reducción significativa de las cepas de *E. coli* O157:H7 estudiadas, en ensayos con sobrenadante libre de células, de igual manera Jurado, Jarrín, y Parreño, (2015), encontró que el sobrenadante obtenido de *Lactobacillus plantarum* mostró buen potencial para inhibir el crecimiento de las bacterias patógenas evaluadas, entre ellas *E. coli*; y García, Gutiérrez, Bedoya, y Montoya, (2016),

encontraron que el sobrenadante obtenido del cultivo de *Lactococcus lactis* manifestó un efecto inhibitorio sobre *E. coli*.

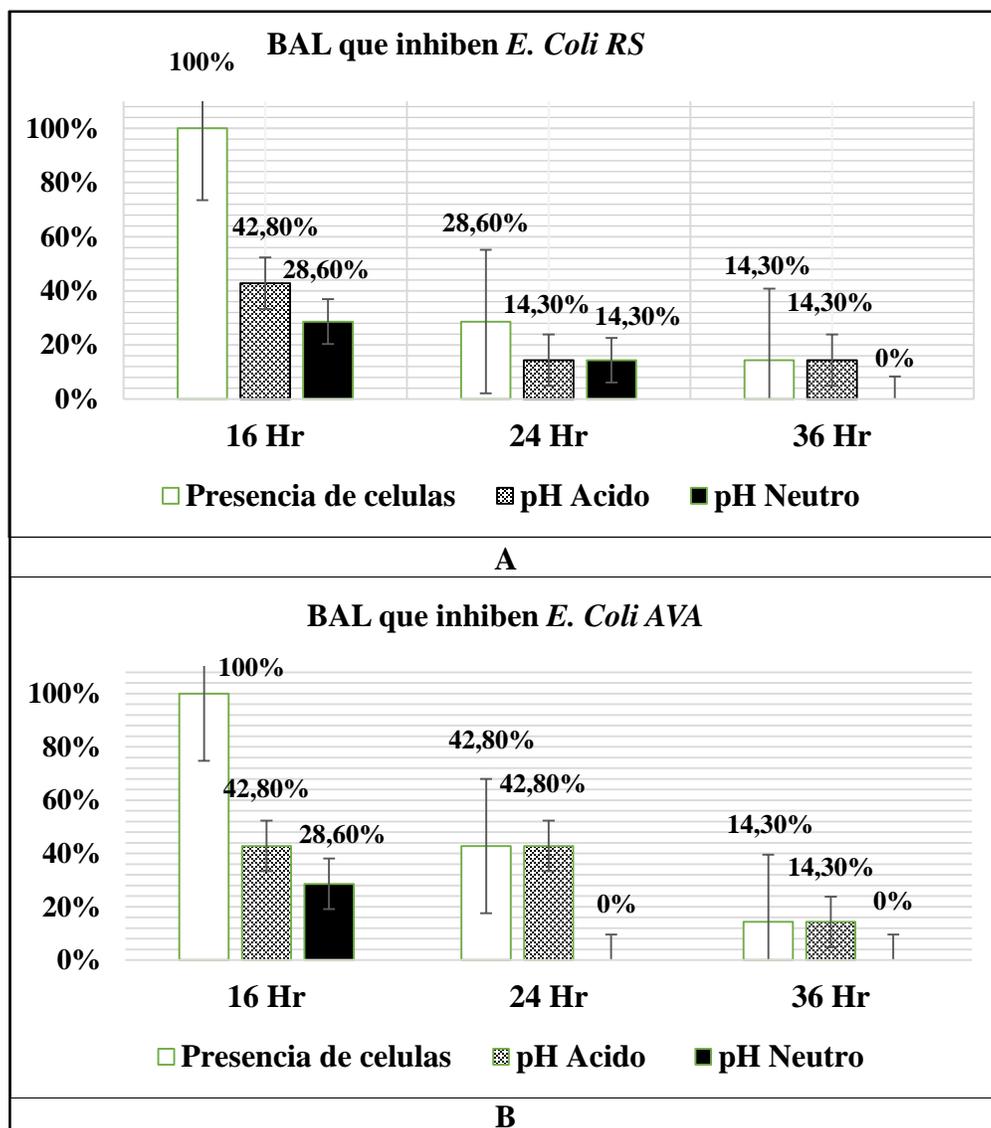
En el presente estudio uno de los tratamientos con mejor desempeño frente a las cepas de *E. coli*, en ausencia de células, fue el implementado a pH ácido, en el cual se evaluaron la producción de ácidos orgánicos. Esto puede deberse a que en las bacterias existe algo denominado homeostasis, la tendencia de una célula a sostener un equilibrio químico a pesar de las fluctuaciones en el ambiente, causando su alteración se da una destrucción de las células microbianas. Las proteínas, los ácidos nucleicos y fosfolípidos pueden ser alterados estructuralmente por los cambios de pH (Rodríguez, 2011), realizados por disminución del pH del medio, que consigue aumentando la proporción de ácidos orgánicos en su forma no disociada, siendo esta la que posee una mayor actividad inhibitoria debido a su naturaleza lipofílica, ya que pueden atravesar la membrana celular, por difusión pasiva, disociándose en el citoplasma (Vásquez, S.; Suárez, H. y Zapata, 2009).

Una vez dentro, el ácido se disocia y presenta un doble mecanismo de acción: El hidrogenión: reduce el pH de citoplasma, lo que obliga a la célula a incrementar sus gastos energéticos a fin de mantener su equilibrio osmótico, mientras el anión, perjudica la síntesis de DNA, evitando la replicación de los microorganismos (Gómez y Vásquez, 2011). Así por un lado interfieren con funciones celulares, como puede ser la translocación de sustrato y la fosforilación oxidativa, provocando un bombeo de protones hacia el interior de las células y una posible desestabilización de la membrana, lo que incrementa los protones en el interior celular. Cuando la concentración de protones excede la capacidad tampón del citoplasma se transportan hacia el exterior mediante bomba de protones, reduciendo de esta manera las reservas energéticas de la célula. Cuando estas reservas se agotan, la bomba de protones se detiene y se provoca el descenso del pH interno, lo cual causa a su vez desnaturalización de las proteínas y desestabilización de otros componentes estructurales y funcionales de las células, interfiriendo así con la viabilidad (Hernandez *et al.* , 2002).

#### **6.4.2 Comportamiento de la actividad antimicrobiana con relación al tiempo, tipo de cepa BAL y tipo de tratamiento frente a *E. coli***

Según el análisis estadístico mediante el ANOVA de doble vía, se encontró que existen diferencias significativas entre la media de diámetros de inhibición del tratamiento llevado a cabo en presencia de células y los llevados a cabo en ausencia de células en el transcurrir del tiempo, lo que indica que el tipo de tratamiento está directamente relacionado con la capacidad antimicrobiana de las cepas lácticas aisladas en el tiempo.

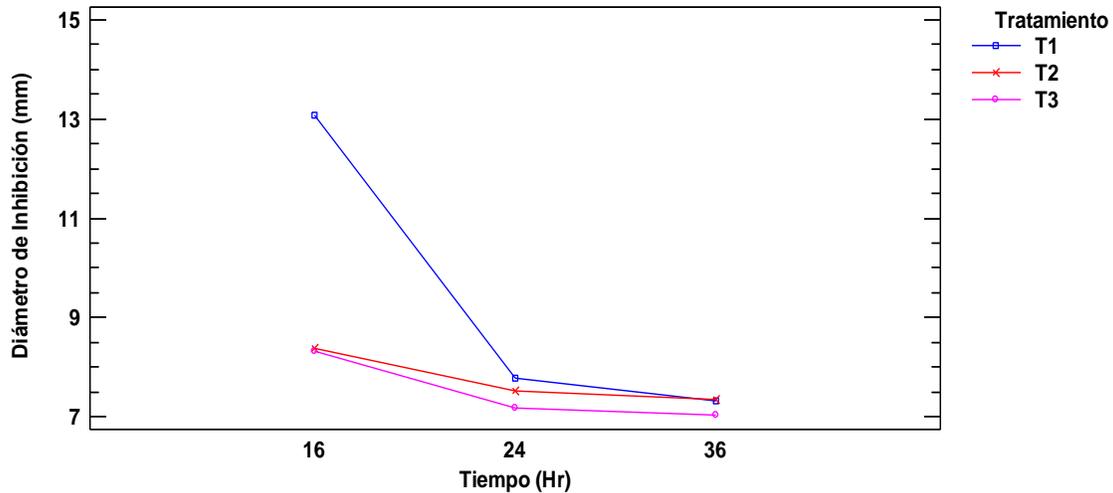
En la figura 22 se describen la inhibición de las cepas lácticas frente a *E. coli*, observándose que el 100% de las BAL aisladas tuvieron actividad antimicrobiana a las 16 horas en el T1, disminuyendo en 72,2 % esa capacidad inhibitoria a las 24 horas y llegando a ser solamente de un 14% al cabo de las 36 horas, de igual manera ocurrió con los otros dos tipos de tratamientos, sobresaliendo el efecto de los ácidos orgánicos quienes mantenían su acción inhibitoria en un 14% a las 36 horas, al igual que el T1, frente a los dos tipos de patógenos.



**Figura 22.** inhibición de las BAL aisladas de leche de cabra frente a las cepas de *E. coli* a las 16, 24 y 36 horas

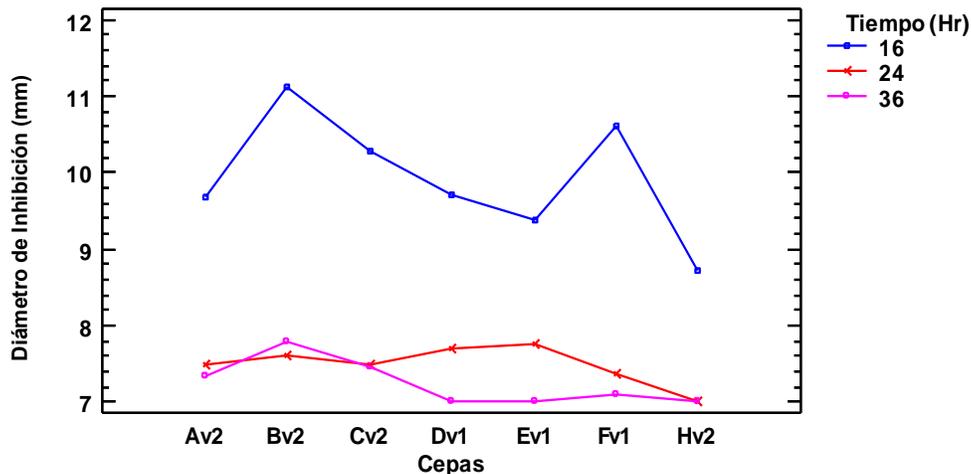
Lo anterior indica que el tiempo influye en la capacidad inhibitoria de cada uno de los tratamientos y de las cepas BAL. En la figura 23 se ilustra el progreso del tipo de tratamiento en el tiempo, se evidencia que el T1, tiene una excelente capacidad inhibitoria a las 16 horas, pero posterior a ese tiempo desciende drásticamente, y pasadas las 36 horas los tres tratamientos tiene un diámetro medio de inhibición similar, lo que evidencia la influencia del tiempo en el efecto de cada una de las cepas aislada y del tipo de tratamiento implementado, siendo las 16 horas el tiempo donde se encuentra el mejor comportamiento de cada uno de los factores frente al patógeno *E. coli*. Aunque son escasos los estudios relacionados con la evolución bactericida en el tiempo, estudios como el de Villarreal *et al* .,( 2011) hallaron que incubando las cepas de *E. coli* O157:H7 durante 24 horas en presencia del sobrenadante libre de células obtenido de cultivos de *L. casei* 206/1, éste ejerce una acción bacteriostática durante las primeras 12 horas de propagación, no permitiendo que el patógeno se desarrolle, efecto que se puede evidenciar en

este estudio a las 16 horas. Por otro lado Montoya *et al.* , (2006) observo en la evaluación con extractos centrifugados de *L. plantarum* frente a *Salmonella* y *E. coli* una disminución de la actividad con el tiempo de capacidad antimicrobiana,



**Figura 23.** Variación del diámetro de los tratamientos con respecto al tiempo frente a las cepas *E. coli*

T1= Presencia de células, T2= Ausencia de células pH Acido, T3=Ausencia de células pH Neutro, Analizando el desarrollo de las diferentes cepas y tratamientos en el tiempo, se evidencia que en las primeras 16 horas se obtienen los picos más altos de inhibición, sobresaliendo las cepas Bv2 y Fv1, mientras a las 24 y 36 horas los diámetros disminuyen drásticamente, donde todas las cepas tienden a no tener capacidad inhibitoria, sobresaliendo de manera tenue las cepas BAL Av2, Bv2 y Cv2 las cuales todavía mantiene un diámetro mínimo de inhibición, en relación con las demás cepas BAL el cual es nulo (Figura 24), esta acción de inhibición a esta cantidad de tiempo puede considerarse bactericida por parte de los mecanismos de acción de las cepas BAL, resultado de gran importancia para implementación de estas bacterias en la industria para controlar la viabilidad del patógeno *E. coli* .



**Figura 24.** Variación del diámetro de las cepas de BAL con respecto al tiempo frente a las cepas de *E. coli* .

De igual manera esto permite comprobar que la capacidad inhibitoria es limitada de acuerdo al tipo de tratamiento y tipo de bacteria láctica usada, pero es el tiempo el factor de mayor importancia en el efecto de estos dos factores, posiblemente debido a que pasado estas horas es probable que las cepas *E. coli* se hallan consolidado en su fase estacionaria de crecimiento donde ha logrado alcanzar cambios en su metabolismo general, como el aumento de compuestos de reserva y de osmoprotección, la remodelación de la envoltura celular y la expresión diferencial de genes, que contribuyen a que las células en esta fase estacionaria mantengan la viabilidad y muestren mayor resistencia a diversos factores de estrés, radiación ultravioleta, peróxido de hidrógeno, calor, antibióticos y concentraciones salinas elevadas (Ramírez, Contreras, y Gómez, 2005).

### 6.5 Potencial antimicrobiano de BAL aisladas frente a *Klebsiella*

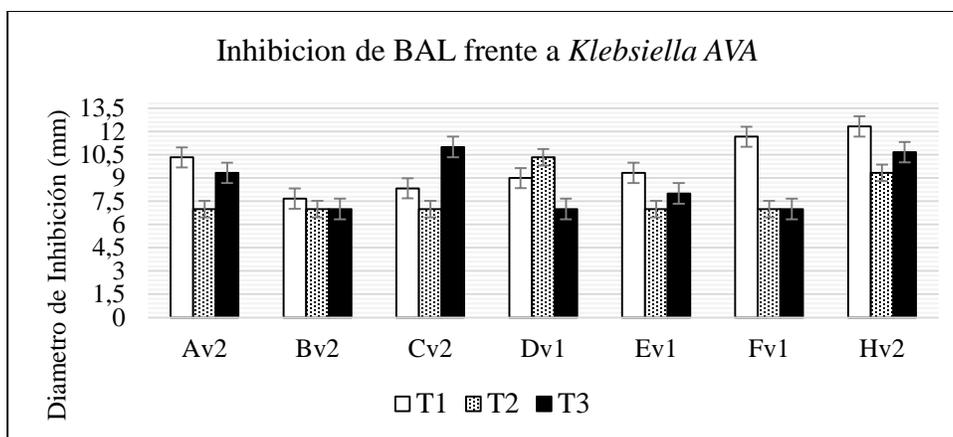
Los resultados evidencian que existe capacidad antimicrobiana de las cepas aisladas frente *Klebsiella*, el 100% de las cepas lácticas expresaron efecto inhibitorio frente a *Klebsiella* AVA y *Klebsiella* CSS, en el tratamiento en presencia de células. El método de ausencia de células mostro que solo un 29% de las cepas lácticas aisladas ejerce actividad antimicrobiana frente a *Klebsiella* AVA, mientras frente a *Klebsiella* CSS no registró ninguna actividad antimicrobiana por parte de las BAL. En el tratamiento de pH neutro un 57% y 43% de las cepas lácticas ejercieron actividad antimicrobiana frente a *Klebsiella* AVA y *Klebsiella* CSS, respectivamente.

**Tabla 15.** Porcentaje de inhibición de las BAL aisladas de leche de cabra frente a las cepas de *Klebsiella*

|                           |               | Inhibición frente a <i>Klebsiella</i> AVA |        | Inhibición frente a <i>Klebsiella</i> CSS |        |
|---------------------------|---------------|---|--------|---|--------|
|                           |               | No Inhibe                                 | Inhibe | No Inhibe                                 | Inhibe |
| Presencia de células (T1) | Numero de BAL | 0   | 7      | 0   | 7      |
|                           | % Del método  | 0%  | 100%   | 0%  | 100%   |
| pH Ácido (T2)             | Numero de BAL | 5   | 2      | 7   | 0      |
|                           | % Del método  | 71%                                       | 29%    | 100%                                      | 0%     |
| pH Neutro (T3)            | Numero de BAL | 3   | 4      | 4   | 3      |
|                           | % Del método  | 43%                                       | 57%    | 57%                                       | 43%    |

Chi-cuadrado de Pearson 33,67 y de 36,4  $p < 0.05$  (El  $\chi^2$  muestra que existen diferencia entre los métodos)

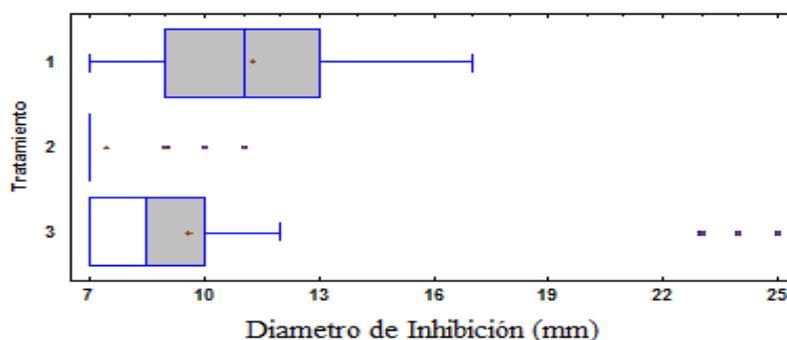
Entre las cepas lácticas se destaca Hv2 la cual evidencio actividad antimicrobiana frente *Klebsiella* AVA, en los tres tratamientos con medias de inhibición de 12.3, 10.7 y 9.3 mm, como en se ilustra en la figura 25.



**Figura 25.** Actividad antimicrobiana de las BAL aisladas de leche de cabra en presencia de células. (T1) y ausencia de células a pH ácido (T2) y pH neutro (T3)

El análisis estadístico, mediante la aplicación del test de Kruskal-Wallis entre los métodos presencia, ausencia de células a pH ácido y neutro mostraron que hay diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) entre los métodos utilizados (Figura 26), también se observa valores atípicos en el T2 y T3, dados por que los diámetros de inhibición de cada una de las cepas fueron variables e irregulares, es decir no tuvieron diámetros semejantes entre ellas, destacándose los diámetros de la colonia Ev1, la cual presentó un diámetro promedio de 24 mm en el T3.

De igual forma para determinar los porcentajes de eficacia de cada cepa láctica frente al patógeno en los tres métodos, se asignaron valores de 1 a los casos donde hubo inhibición y 0 en los casos de no inhibición. Mediante la aplicación del test de Kruskal-Wallis no se encontraron diferencias significativas entre cepas lácticas, Aunque, si hubo diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) al aplicar el estadístico Chi-cuadrado de Pearson a los resultados de inhibición de las cepas lácticas frente a las cepas de *Klebsiella*. En el tratamiento de pH ácido las cepas BAL Dv1 y Hv2 fueron las únicas que mostraron inhibición frente a *Klebsiella AVA*, de igual manera estas dos cepas presentaron inhibición en frente *E. coli AVA* junto con la cepa Cv1, mientras en el tratamiento a pH neutro las cepas que ejercieron capacidad antimicrobiana fueron Av2, Cv2, Ev1 y Hv2 frente a *Klebsiella AVA*, mientras las cepas Av2, Cv2 y Fv1 lo hicieron frente a *Klebsiella CSS*. Los porcentajes y las frecuencias de inhibición de las BAL estudiadas en cada tratamiento se muestran en la tabla 15.



**Figura 26.** Comparación entre métodos aplicados a la inhibición de las BAL frente a *Klebsiella*  
1= Presencia de células, 2= Ausencia de células pH Acido, 3=Ausencia de células pH Neutro.

Otros estudios también han demostrado la capacidad inhibitoria de las BAL frente a *Klebsiella*, como los llevados a cabo por M. López y Domingo, (2007) utilizando el método de la estría evidencio capacidad inhibitoria de tres cepas de probióticos (dos aislamientos de *Lactobacillus* spp. y uno de *Lactococcus lactis subsp. lactis*) sobre cepas de *Klebsiella*, *H. pylori*, *Staphylococcus spp.*, y *E. coli*. Ramírez, (2005) mediante cepas de bacterias ácido lácticas aisladas de productos lácteos artesanales, utilizando el método de discos, registro actividad antimicrobiana frente a diferentes cepas de *Klebsiella*, por otro lado Montiel, (2010), encontró que *Bifidobacterium bifidus* a una concentración de  $34 \times 10^8$  ufc/ml, presenta inhibición frente a *Klebsiella pneumoniae*.

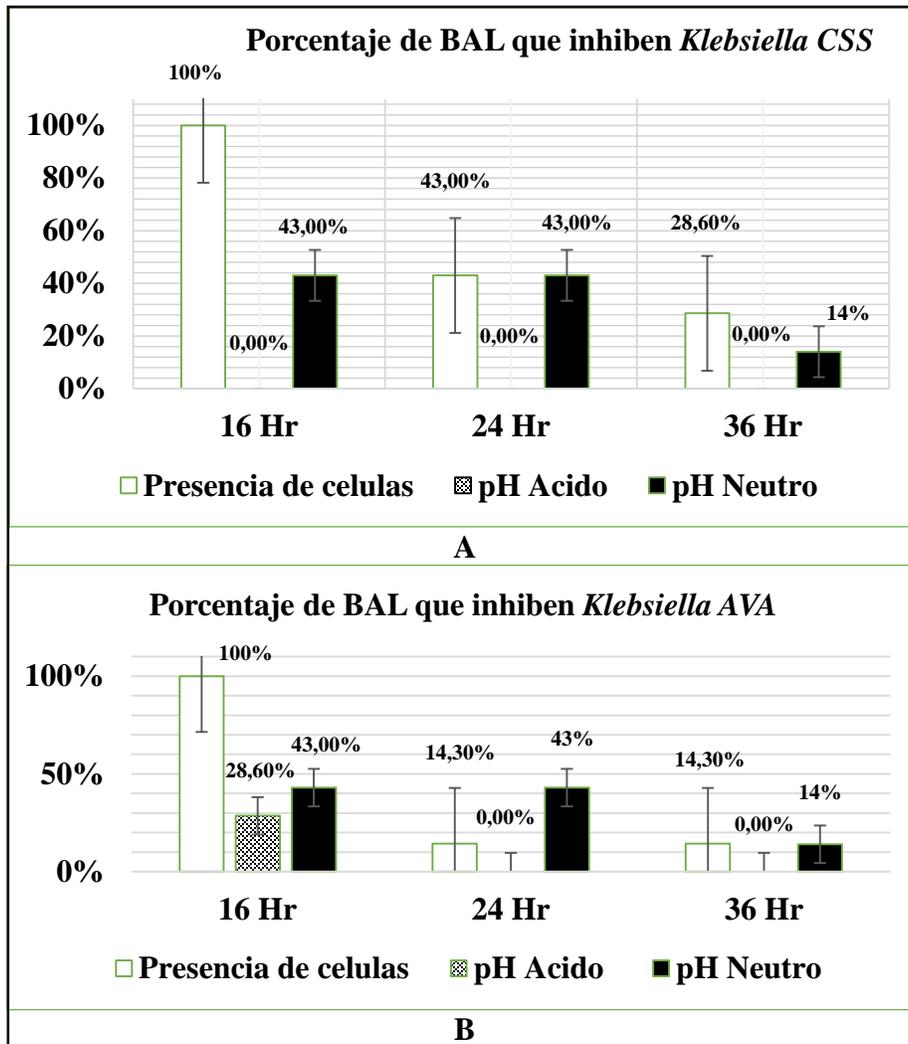
El mejor comportamiento de inhibición de las BAL frente a *Klebsiella* se manifestó en el tratamiento de presencia de células, con una media de diámetro de inhibición de  $11,3 \pm 2,8$ . En el método de ausencia de células se destacó el efecto de los metabolitos producidos por las BAL (T3) frente a las cepas de *Klebsiella*, con una media de inhibición  $9,5 \pm 4,3$ , mientras la media de inhibición del tratamiento de los ácidos orgánicos (T3) fue de  $7,4 \pm 1$ . El comportamiento del efecto antimicrobiano del tratamiento a sobrenadante a pH 7 se le atribuye a las bacteriocinas debido a que el mantener pH constante mediante la neutralización de los ácidos producidos durante el proceso de fermentación, ha demostrado tener un efecto en la estabilidad, solubilidad y en la adsorción de las bacteriocinas en la membrana citoplasmática y en la superficie de los sistemas de cultivo (Londoño, Torres, López, y Velez, 2015).

Las bacteriocinas actúan en células sensibles, desestabilizan y permeabilizan la membrana citoplasmática por medio de la formación de poros transitorios o canales iónicos que causan la disrupción o reducción de la fuerza motriz de la célula debido a la interacción con polímeros aniónicos que constituyen la pared celular (Camargo *et al* ., 2009). Los péptidos de las bacteriocinas se unen a la membrana citoplasmática a través de uniones electrostáticas con los fosfolípidos cargados negativamente, luego se insertan a la membrana con una reorientación que depende del potencial de membrana, el cual está influenciado por el pH y la composición fosfolipídica. Los monómeros de bacteriocina forman agregados proteicos que resultan en la formación del poro con la consecuente salida de iones (principalmente potasio y magnesio), pérdida de la fuerza motriz de protones (FMP), salida de ATP y aminoácidos. La fuerza motriz de protones juega un papel central en la síntesis de ATP, en el transporte activo y el movimiento bacteriano, por lo tanto, se inhibe la síntesis de macromoléculas y la producción de energía dando como resultado la muerte celular, (González *et al* ., 2003., Mondragon *et al* ., 2013., Agudelo, 2014., y Fernández, Chanci, Wilches, Cardona, 2014).

Al comparar los resultados de inhibición entre cepas patógenas, se destaca que un mayor número de las BAL tienen efecto inhibitorio frente *Klebsiella* y un número más reducido lo tienen frente a las cepas de *E. coli*. Aunque en todas las cepas de patógenos testados se destacó el tratamiento en presencia de células, en el caso *Klebsiella* también se destacó el tratamiento a pH 7 y en el caso de *E. Coli* el tratamiento de ácidos orgánicos.. Es factible que las condiciones “*in vitro*” repercutan en el crecimiento del patógeno y en su respuesta frente a las BAL. También se evidencia una mayor actividad de las cepas Av2, Bv2 y Cv2 en relación a la *E. coli* y de las cepas Dv1, Ev1, Fv1 y Hv2 en relación a *Klebsiella*.

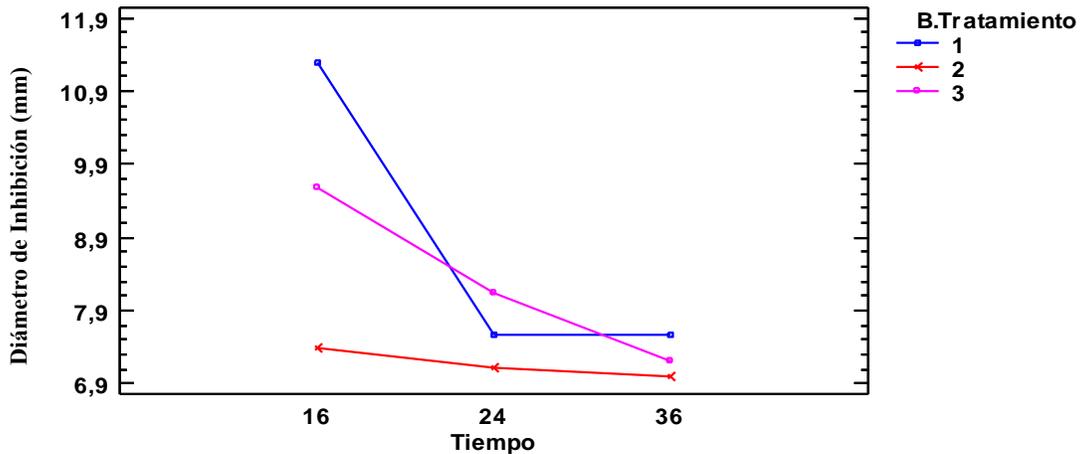
**6.5.1 Comportamiento de la actividad antimicrobiana con relación al tiempo, tipo de cepa BAL y tipo de tratamiento frente a *Klebsiella***

Mediante el ANOVA de doble vía, se encontró que existen diferencias significativas entre la media de diámetros de inhibición del tratamiento llevado a cabo en presencia de células y los llevados a cabo en ausencia de células en el transcurrir del tiempo. En la figura 27 se describen el porcentaje de inhibición de las cepas lácticas frente a las dos cepas patógenas de *Klebsiella*, en el tiempo, observándose que el 100% de las BAL aisladas tuvieron actividad antimicrobiana a las 16 horas en el T1, disminuyendo en 57% y 86% esa capacidad inhibitoria a las 24 horas frente a *Klebsiella* SCC y *Klebsiella* AVA respectivamente y llegando a ser solamente de un 14% al cabo de las 36 horas frente a las dos cepas de *Klebsiella*. También se evidencia una mejor evolución en el tiempo del tratamiento a pH neutro (T3), con respecto al llevado a cabo a pH ácido (T2), manteniendo su acción inhibitoria en un 14% a las 36 horas, al igual que el T1, frente a las dos cepas de *Klebsiella*.



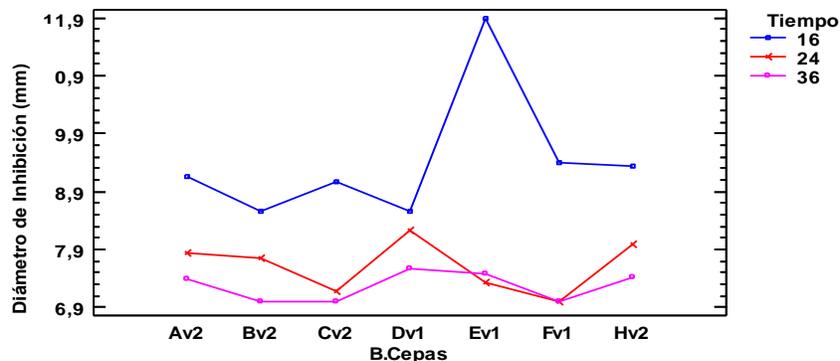
**Figura 27.** Porcentaje de inhibición de las BAL aisladas de leche de cabra frente a las cepas de *Klebsiella* a las 16, 24 y 36 horas

Analizando la evolución de los diámetros en el tiempo con respecto al tipo de tratamiento se pudo evidenciar que este un factor influyente en la capacidad inhibitoria de las BAL aisladas frente a las cepas de *Klebsiella* testadas. El mejor comportamiento de inhibición para los tres tipos de tratamiento se encuentra a las 16 horas, y a pesar que el tratamiento en presencia de células tiene un descenso drástico pasadas las 24 horas, es el que mantiene la mejor media de inhibición a las 36 horas de transcurrido el tiempo del experimento (figura 28).



**Figura 28.** Variación del diámetro de las cepas de BAL con respecto al tiempo frente a las cepas de *Klebsiella*.

El desarrollo de las diferentes cepas y tratamientos en el tiempo, se evidencia que en las primeras 16 horas se obtienen los picos más altos de inhibición en las cepas BAL Ev1, Fv1 y Hv2, sin embargo a las 24 y 36 horas los diámetros disminuyen drásticamente, donde todas las cepas tienden a no tener capacidad inhibitoria, exceptuando las cepas Dv1, Ev1 y Hv2, las cuales mantienen los picos más altos de inhibición frente a los patógenos testados (Figura 29), lo que comprueba que la capacidad inhibitoria que presentan las BAL frente a las cepas de *Klebsiella*, es limitada también al tipo de bacteria láctica usada, donde el tiempo influye de manera importante, también demuestra una posible viabilidad del patógeno que a pesar de ser afectado por el mecanismo de acción de las BAL, en las primeras horas logra adaptarse y continuar su crecimiento.

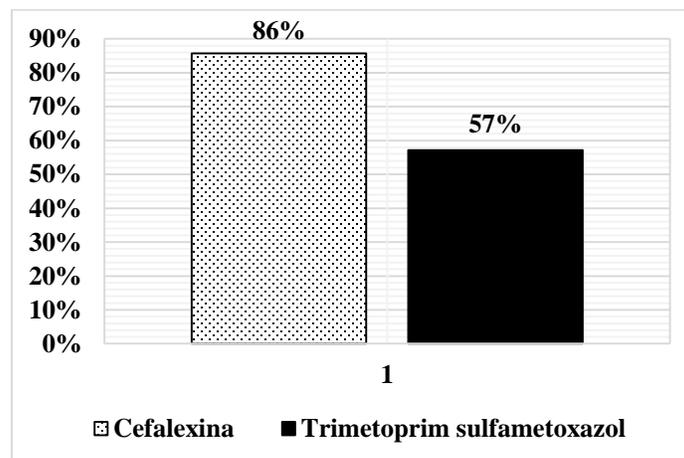


**Figura 29.** Variación del diámetro de los tratamientos con respecto al tiempo frente a las cepas de *Klebsiella*.

## 6.6 Sensibilidad a los antibióticos

Se implementaron dos tipos de antibióticos para conocer la sensibilidad a estos por parte de las BAL aisladas, ya que esto permite tener un criterio para indicar las posibles aplicaciones como probióticos, siendo coadyuvante en los tratamientos de infecciones gastrointestinales. Los antibióticos implementados fueron Cefalexina y Trimetoprim sulfametoxazol. La Cefalexina es un antibiótico perteneciente a la familia de los betalactámicos y del grupo de las cefalosporinas, se utiliza casi exclusivamente por la vía oral. Es bactericida *in vitro* a través del mecanismo de inhibición de la síntesis de la pared bacteriana. Posee un espectro de acción amplio, siendo alternativa para infecciones del tracto urinario, incluida prostatitis aguda, causadas por *Escherichia coli*, *Pr. mirabilis* y *Klebsiella sp.* Por su parte Trimetoprim sulfametoxazol, es usado generalmente para contrarrestar diarreas bacterianas. Este interfiere selectivamente con la biosíntesis de los ácidos nucleicos y las proteínas de las bacterias. El Sulfametoxazol inhibe la síntesis bacteriana de la dihidrofolato compitiendo por el sitio de unión de la enzima con el ácido para-aminobenzoico (PABA).

Por otra parte, el análisis de los perfiles de resistencia a antibióticos es una información valiosa en el caso de bacterias con potencial probiótico. La mayoría de estas bacterias son de origen animal o humano, por tanto, el uso indiscriminado de antibióticos ha generado un incremento de estos genes de resistencia en las mismas, esta resistencia puede estar relacionada con genes localizados en el cromosoma, los plásmidos o los transposones. Es necesario por ello, desarrollar ensayos normalizados para establecer perfiles de resistencia en bacterias ácido lácticas, por ello se recomienda que las bacterias lácticas implementadas en alimentos no contengan genes transmisibles que codifiquen la resistencia a medicamentos utilizados con fines clínicos (FAO y OMS, 2006). En el ensayo realizado se evidenció que un 86% de las cepas BAL aisladas presentan sensibilidad a Cefalexina y un 57% a Trimetoprim sulfametoxazol (Figura 30). Esto quiere decir que un 14% y 43% de las BAL presentan resistencia a estos antibióticos, y en una implementación como suplementos probióticos no representarían seguridad, hasta no realizar estudios más detallados capaces de determinar la naturaleza intrínseca o adquirida de los determinantes de resistencia, al igual que comprobar si esta resistencia tiene la capacidad de transferirse y en qué medida esto podría convertirse en un riesgo para la salud del consumidor.



**Figura 30.** Porcentaje de sensibilidad de las cepas BAL a antibióticos

## 7. APLICABILIDAD EN EL SECTOR

La investigación desarrollada permite establecer que existe un potencial en el producto de leche de cabra comúnmente comercializada de forma informal, otorgándole un valor agregado, y una base científica para el planteamiento de estrategias en pro del desarrollo de este sector en la región. El haber encontrado microorganismo presentes en este producto con un posible potencial probiótico permite inferir que el producto de leche de cabra posee unas cualidades que, en el futuro mediante las estrategias debidas, puede llegar a ser de gran importancia, no solo como alimento funcional, si no para la seguridad alimentaria, en zonas donde generalmente es explotada por pequeños productores y estratos de escasos recursos.

El aislamiento de estos microorganismos con posible potencial probiótico, representan una gran importancia para la industria de alimentos, pues abre la puerta para la participación de estos en la elaboración de alimentos modificados, otorgándoles la posibilidad de conservarse mucho más tiempo, o también para ser cultivos iniciadores, pues una de las características de muchas de las cepas que forman parte de los cultivos iniciadores es producir ciertos factores que inhiben el desarrollo de otros microorganismos (Beldarraín *et al* ., 2008).

Al igual también al poseer estas características, es probable que los productos obtenidos a partir de leche de cabra posean algún potencial probiótico, otorgándole un valor agregado no solo a un producto sino a toda una cadena de productos, sin embargo, hace falta estudios para corroborar tal posibilidad.

## 8. CONCLUSIONES

Se encontraron variaciones en los valores de viscosidad, acidez titulable y el crecimiento de las bacterias láctica, de la leche de cabra obtenida de Villavieja y Neiva, mostrando que pueden estar directamente relacionadas con la zona de pastoreo de las cabras y el tipo de dieta que estas llevan en el tiempo de lactancia, de acuerdo a los datos obtenidos en la encuesta aplicada.

Se aislaron 7 BAL, que crecimiento en medio selectivo MRS para el grupo mencionado, de coloración blanco mate en placa, Gram positivas, con morfología cocoide, agrupadas en cadena, de las cuales 3 fueron catalasa negativa, y otras cuatro se consideraron con presencia de una enzima pseudocatalasa.

Se evidencio que existe capacidad antimicrobiana frente a las cepas de *E. coli* testadas, por parte de cada una de las BAL aisladas, al igual que los productos originados a partir del metabolismo de estas, donde a las 16 horas, el 100% de las BAL aisladas presentaron efecto inhibitorio en el T1, el 42,8% de BAL a pH ácido y el 28 % a pH neutro, sobresaliendo el efecto del BAL en el tratamiento en presencia de células, que se mantuvo en un 14% al cabo de las 36 horas, para los dos tipos de cepas *E. coli*.

De igual manera existe capacidad antimicrobiana *in vitro* frente a las cepas de *Klebsiella* testadas, por parte de cada una de las BAL aisladas, evidenciándose el mejor comportamiento por parte del tratamiento de presencia de células de los tres tratamientos, donde a las 16 horas el 100% de las BAL aisladas presentaron efecto inhibitorio, el cual se redujo a un 28% y 14% al cabo de 36 horas para *Klebsiella* AVA y *Klebsiella* CSS, respectivamente.

En el tratamiento de ausencia de células sobresalió el de pH neutro frente al patógeno *Klebsiella*, en el cual un 57% y 43% de las cepas lácticas ejercieron actividad antimicrobiana frente a *Klebsiella* AVA y *Klebsiella* CSS, respectivamente, manteniendo esa capacidad en un 14% al cabo de las 36 horas. Mientras el de los ácidos orgánicos para este tipo de patógeno, mostro que solo un 29% de las cepas lácticas aisladas ejerce actividad antimicrobiana frente a *Klebsiella* AVA, mientras frente a *Klebsiella* CSS no registró ninguna actividad antimicrobiana por parte de las BAL, y a las 24 horas su efecto era nulo. En *E. coli* el efecto de los ácidos orgánicos tuvo mejor comportamiento que el de pH neutro, manteniendo su efecto en un 14% a las 36 horas; mientras las medias de los diámetros de inhibición para el tratamiento neutro se redujeron en un 100%.

Se destaca la acción de las cepas lácticas Cv2 y Hv2, las cuales lograron tener efecto inhibitorio frente a las cepas patógenas *E. coli* AVA y *Klebsiella* AVA, respectivamente, en los tres tratamientos evaluados.

De igual manera los resultados permiten asegurar que la evolución del efecto inhibitorio frente a las cepas patógenas testadas, varía de acuerdo al tipo de cepa láctica y el tipo de tratamiento, el cual disminuye en el transcurrir del tiempo, pues aunque el T1 tiene un comportamiento sobresaliente, con relación a los demás tratamientos, al transcurrir las horas los diámetros de inhibición de cada uno de ellos son similares, siendo el tiempo de 16 horas donde se presenta la

mayor inhibición en cada uno de los tratamientos y en cada una de las cepas lácticas, logrando evidenciar que los valores finales de inhibición dependen del tipo de cepa y el tipo de tratamiento.

De acuerdo al estudio *in vitro* realizado se encontró que hay un potencial probiótico de las cepas BAL aisladas de leche de cabra producida en el norte del departamento del Huila, que se desconoce y podría ser fundamental para el desarrollo de nuevas innovaciones y tecnología de este producto en la región.

## **9. RECOMENDACIONES**

Realizar estudios más profundos como resistencia a las bilis y sales biliares, resistencia al paso gastrointestinal y adhesión a la mucosa, que permitan precisar el verdadero potencial probiótico de las BAL presentes en la leche de cabra comercializadas en el norte del departamento de Huila. De igual manera los estudios llevados a cabo posteriormente deben permitir llegar hasta una identificación de especie, al igual que la aplicación de pruebas bioquímicas y la sensibilidad a otros tipos de antibióticos comúnmente usados.

Es importante poder establecer de una manera más clara, la relación existente entre la dieta de las cabras, la zona de geográfica y actividades de manejo que influyan en la viabilidad de las BAL presentes en la leche de cabra, mediante una recolección de datos más a detalle, para buscar estrategias que permitan mejorar estas condiciones y potencializar este producto en la región.

Generar Innovación y desarrollo de los productos derivados de la leche de cabra producida en el departamento del Huila.

## 10. REFERENCIAS

- Agudelo, N. (2014). *Estado del arte de la obtención de bacteriocinas a partir de bacterias ácido lácticas y su aplicación en la industria de alimentos*. Retrieved from <http://repository.upb.edu.co:8080/jspui/handle/123456789/1409>
- Albenzio, M., Santillo, A., Avondo, M., Nudda, A., Chessa, S., Pirisi, A., & Banni, S. (2015). Nutritional properties of small ruminant food products and their role on human health. *Small Ruminant Research*, 135, 3–12. <http://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2015.12.016>
- Alberto, J., Vargas, L., María, L., & Toro, E. (2010). Epidemiología Y Mecanismos De Resistencia, 23(2), 157–165.
- Amorocho, C. M. (2011). *Caracterización y potencial probiótico de bacterias lácticas aisladas de leche de oveja Guirra*. Universidad Politecnica de Vlaencia.
- Arribas, B., Rodríguez, M. E., Camuesco, D., Zarzuelo, A., & Gálvez, J. (2008). Aplicaciones terapéuticas de los probióticos. *Ars Pharmaceutica*, 49(1), 5–30.
- Ashwell, M. (2004). *ILSI Europe: Conceptos sobre los alimentos funcionales*. ILSI Europe concise Monograph series. <http://doi.org/ISBN 1-57881-157-0>
- Bedoya, O., Rosero, R., & Posada, S. (2012). Composición de la leche de cabra y factores nutricionales que afectan el contenido de sus componentes.
- Beldarraín, T., Cepero, Y., Brucelas, A., Santos, R., Ramos, M., Moya, Y., ... Vergara, N. (2008). Caracterización De Cultivos Iniciadores En Productos Cárnicos, 18(2), 8. Retrieved from <http://www.oceandocs.org/bitstream/handle/1834/4896/Tatiana Beldarrain.pdf?sequence=1>
- Blanco, J. (2011). Brote de Alemania causado por Escherichia coli enteroagregativa y enterohemorrágica O104:H4 Stx2a, pp. 17–19.
- Camargo, I., Gómez, S., & Salazar, V. (2009). Impact of bacteriocins and their relevance as preservatives in the food industry. *Teoría Y Praxis Investigativa*, 4(2), 27–32. Retrieved from <http://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=3726666&info=resumen&idioma=ENG>
- Cámpora, C. (2016). Alimentos funcionales : tecnología que hace la diferencia. *RIA. Revistas de Investigaciones Agropecuarias*, 42(2), 131–137.
- Carrera, M. (2015). *Evaluación del potencial antimicrobiano de cepas de bacterias ácido lácticas aisladas de diferentes muestras de leche*. Universidad Autónoma agraria Antonio Narro.
- Chacon, A. (2005). Aspectos Nutricionales De La Leche De Cabra. *Agronomía Mesoamericana*, 16(2), 239–252.
- Clark, S., & Sherbon, J. W. (2000). Alpha(s1)-casein, milk composition and coagulation properties of goat milk. *Small Ruminant Research*, 38(2), 123–134. [http://doi.org/10.1016/S0921-4488\(00\)00154-1](http://doi.org/10.1016/S0921-4488(00)00154-1)
- Collado, M. (2004). *Caracterización de cepas del género Bifidobacterium con carácter probiótico*. Universidad Politecnica de Vlaencia.
- Cortes, A. (2015). Situación del recurso ovino y caprino en colombia, (Roncallo 2002).
- Cruz, J. G. (2006). *Aislamiento Y Caracterizacion Bioquimica De Levaduras Y Bacterias Acidolacticas Productoras De Sustancias Antimicrobianas De Interes Industrial Presentes En El "Suero Costeño."* Universidad de la sabana.
- Cueto, M. C., Acuña, Y., & Valenzuela, J. (2010). Evaluación in Vitro Del Potencial Probiótico De Bacterias. *Actual Biology*, 32(93), 129–138.
- Del campo, M. C., Gómez, H., & Alaníz, R. (2008). Bacterias ácido lácticas con capacidad

- antagónica y actividad bacteriocinogénica aisladas de quesos frescos. *E-Gnosis*, 6, 1–17.
- FAO. (2011). Prevención de la E.coli en los alimentos. *El Marco de Gestión de Crisis Para La Cadena Alimentaria (FCC)*, 0–15.
- FAO, E., & OMS, E. (2006). Probióticos en los alimentos Propiedades saludables y nutricionales y directrices para la evaluación. *Estudios FAO Alimentación Y Nutrición*, 85, 52. Retrieved from file:///C:/Users/Acer/Documents/paty/homework1/PROBIOTICOS OPS 2006.pdf
- Fernández, K. J., Chanci, I. C., Wilches, L., & Cardona, J. A. (2014). Caracterización De Los Metabolitos De Bacterias Ácido Lácticas Y Efecto Inhibidor De Las Bacteriocinas En Microorganismos Patógenos En Alimentos: Revisión Sistemática De La Literatura, 2008-2012 / Characterization of Metabolites of Lactic Acid Bacteria an. *Biosalud*, 13(1), 45. Retrieved from <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=edssci&AN=edssci.S1657.95502014000100006&lang=es&site=eds-live&scope=cite>
- Ferrer, B., & Dalmau, J. (2001). Alimentos funcionales: probióticos. *Acta Pediátrica Española*, 59(3), 150–155. Retrieved from <http://www.inocua.org/site/Archivos/investigaciones/Alimfuncionalprobioticos.pdf>
- Flores, M. A., Pérez, L. R., Basurto-Sotelo, M., & Jurado, M. R. (2009). La leche de cabra y su importancia en la nutrición. *Tecnociencia Chihuahua*, 3(2), 107–113.
- Fooks, L. J., Fuller, R., & Gibson, G. R. (1999). Prebiotics, probiotics and human gut microbiology. *International Dairy Journal*, 9(1), 53–61. [http://doi.org/10.1016/S0958-6946\(99\)00044-8](http://doi.org/10.1016/S0958-6946(99)00044-8)
- Ford, A., & Dahl, W. (2011). Alimentos Funcionales. *IFAS Extension University of Florida*, 1–4.
- Frau, F., Font, G., Paz, R., & Pece, N. (2012). Composición físico-química y calidad microbiológica de leche de cabra en rebaño bajo sistema extensivo en Santiago del Estero (Argentina). *Revista de La Facultad de Agronomía, La Plata*, 111(1), 1–7.
- Gaitan, D. M. (2013). *Aislamiento y evaluación de bacterias ácido lácticas con capacidad antagonica a partir de productos carnicos madurados artesanalmente*. Pontificia Universidad Javeriana. Retrieved from <http://intellectum.unisabana.edu.co/bitstream/handle/10818/4760/130497.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- García, A., & Rodríguez, F. (2010). Enterobacterias. *Medicine*, 10(51), 3426–31. [http://doi.org/10.1016/S0304-5412\(10\)70056-1](http://doi.org/10.1016/S0304-5412(10)70056-1)
- García, E., Gutiérrez, L., Bedoya, O., & Montoya, O. (2016). Evaluación in vitro de la actividad antimicrobiana de cepas ácido lácticas comerciales sobre bacterias causantes de mastitis bovina. *Alimentos Hoy*, 24(38), 79–93.
- Gómez, J. S., & Vásquez, G. (2011). Aplicación de agentes antimicrobianos orgánicos en la inhibición de Salmonella spp en harinas de pescado exportación”. *Repositorio de La Escuela Superior Politécnica Del Litoral*, (1).
- Gonzales, C., Manrique, C., & Grajales, H. (2015). Formulación de un modelo conceptual para la gestión de la información en la producción de ovinos y caprinos -1. Analisis de los sistemas de gestión y definición de las fronteras del modelo. *Revista FMVZ-UN*, 62, 1–33. <http://doi.org/10.3989/ris.2010.10.11>
- González, B., Gómez, M., & Jiménez, Z. (2003). Bacteriocinas De Probióticos. *Revista Salud Publica Y Nutricion*, 4(2), 8. Retrieved from <http://www.medigraphic.com/pdfs/quirurgicas/rmq-2008/rmq084c.pdf>
- González, C. A., Grajales, H. A., Manrique, C., & Téllez, G. (2011). Gestión de la información

- en los sistemas de producción animal -una mirada al caso de la ovino-caprinocultura-. *Rev.Med.Vet.Zoot*, 58(Iii), 176–193. Retrieved from [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0120-29522011000300005&lang=es](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-29522011000300005&lang=es)
- Guarner, F., Khan, A., Garisch, J., Eliakim, R., Gangl, A., Thomson, A., ... Lemair, T. (2011). Guía Práctica de la Organización Mundial de Gastroenterología: Probióticos y prebióticos. *Organizacion Mundial de Gastroenterología*.
- Haghi, F., Zeighami, H., Naderi, G., Samei, A., Roudashti, S., Bahari, S., & Shirmast, P. (2015). Detection of major food-borne pathogens in raw milk samples from dairy bovine and ovine herds in Iran. *Small Ruminant Research*, 131, 136–140. <http://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2015.08.005>
- Hasler, C. M., Bloch, A. S., Thomson, C. a, Enrione, E., & Manning, C. (2009). Position of the American Dietetic Association: Functional foods. *Journal of the American Dietetic Association*, 109(4), 735–746. <http://doi.org/10.1016/j.jada.2004.03.015>
- Haza, A. (1995). *Obtencion de anticuerpos monoclonales frente a las caseinas de la leche de cabra y su utilizacion en la diferenciacion de mezclas lácteas y quesos*. Universidad complutense de Madrid, Facultad de veterinaria.
- Hernandez, C., Pantoja, L., & Turriago, S. (2002). *Evaluacion de la presencia de bacteriocinas en cultivos de bacterias ácido lácticas*. Universidad de la Sabana, Bogota.
- Hernandez-Mendoza, A., Robles, V. J., Angulo, J. O., De La Cruz, J., & Garcia, H. S. (2007). Preparation of a whey-based probiotic product with *Lactobacillus reuteri* and *Bifidobacterium bifidum*. *Food Technology and Biotechnology*, 45(1), 27–31.
- Holzapfel, W., Haberer, P., Snel, J., & Schillinger, U. (1998). Descripción general de la flora intestinal y los probióticos. *International Journal of Food Microbiology*, 41, 85–101. [http://doi.org/10.1016 / S0168-1605 \(98\) 00044-0](http://doi.org/10.1016 / S0168-1605 (98) 00044-0)
- Instituto Nacional de Salud, G. de E. de, & INS, R. en I. de A. (2015). Perfil de riesgo de *Escherichia coli* enterotoxigénica y verotoxigénica en queso fresco. *Documentos Evaluación de Riesgo En Inocuidad de Alimentos*, 1, 1–102. <http://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Jurado, H., Jarrín, V., & Parreño, J. (2015). CRECIMIENTO DE *L. plantarum* y EFECTO SOBRE *E. coli*, *S. typhimurium*, *C. perfringens*, y *S. aureus*. *Bioteología En El Sector Agropecuario Y Agroindustrial*, 13(2), 57–66. [http://doi.org/10.18684/BSAA\(13\)57-66](http://doi.org/10.18684/BSAA(13)57-66)
- Leon, M. F. (2012). “Evaluación in vitro de Cepas de Bacterias Ácido Lácticas Nativas con Potencial Probiótico.” *Universidad de La Republica, Faculta de Ciencias*.
- Lizeldi, B., Luna, D., & Vazquez, C. (2005). Probioticos ¡Una alternativa para la salud!
- Londoño, N. A., Torres, M. M., López, C. A., & Velez, L. M. (2015). Bacteriocinas Producidas Por Bacterias Ácido Lácticas Y Su Aplicación En La Industria De Alimentos. *Alimentos Hoy*, 23(36), 63–72. Retrieved from <http://www.alimentoshoy.acta.org.co/index.php/hoy/article/view/356>
- López, C. (2010). *Aislamiento e identificación de microorganismos probióticos a partir de leche de cabra y sus derivados*. Universidad autónoma agraria “Antonio Narro”. Departamento de ciencia y tecnologia de alimentos.
- López, M., & Domingo, D. (2007). Antibioticoterapia con probióticos. *Revista Espanola de Quimioterapia*, 20(2), 170–181.
- Lourens, A., & Viljoen, B. C. (2001). Yogurt as probiotic carrier food. *International Dairy Journal*, 11(1-2), 1–17. [http://doi.org/10.1016/S0958-6946\(01\)00036-X](http://doi.org/10.1016/S0958-6946(01)00036-X)

- Manzano A., C., Estupiñán G., D., & Poveda E., E. (2012). Efectos Clínicos de los Probióticos: qué dice la evidencia. *Revista Chilena de Nutrición*, 39(1), 98–110. <http://doi.org/10.4067/S0717-75182012000100010>
- Martin, P., Szymanowska, M., Zwierzchowski, L., & Leroux, C. (2004). Response of anestrous ewes to the ram effect after follicular wave synchronization with a single dose of estradiol-17beta. *Reproduction, Nutrition, Development*, 44(6), 89–98. <http://doi.org/10.1051/rnd>
- McDermott, A., Visentin, G., McParland, S., Berry, D. P., Fenelon, M. A., & De Marchi, M. (2016). Effectiveness of mid-infrared spectroscopy to predict the color of bovine milk and the relationship between milk color and traditional milk quality traits. *Journal of Dairy Science*, 99(5), 3267–73. <http://doi.org/10.3168/jds.2015-10424>
- Melgarejo, H. (2014). *Influencia del perfil de ácidos grasos de la leche de oveja sobre la calidad del yogur firme, evaluado a lo largo de la vida útil Trabajo. Universidad de Valladolid.*
- Millone, M., Olagnero, G., & Santana, E. (2011). Alimentos funcionales: análisis de la recomendación en la práctica diaria Functional foods: analysis of the recommendation in the daily practice. *Diaeta (B.Aires)*, 29(7), 7–15.
- Ministerio de ambiente y desarrollo sostenible. (2012). *Diagnostico nacional de salud ambiental.*
- Miocinovic, J., Miloradovic, Z., Josipovic, M., Nedeljkovic, A., Radovanovic, M., & Pudja, P. (2016). Rheological and textural properties of goat and cow milk set type yoghurts. *International Dairy Journal*, 58, 43–45. <http://doi.org/10.1016/j.idairyj.2015.11.006>
- Montoya, C., Estrada, M., & Gutiérrez, R. (2006). Evaluación In Vitro del efecto bactericida de cepas nativas de Lactobacillus sp. contra Salmonella sp. y Escherichia coli. *Mundo Lácteo Y Carnico2*, 11–16. <http://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1998.tb12915.x>
- Montiel, A. (2010). *Evaluación in vitro de acción de cultivos probióticos (Bifidobacteria) sobre cepas de enterobacterias (E. coli, Klebsiella pneumoniae y Enterobacter) nosocomiales con resistencia microbiana. Universidad Nacional de Colombia.*
- Montoya, D., Bayona, J., Orozco, J., Cabrales, F., Ramos, E., Gutierrez, L., ... Hincapié, O. (2007). Caracterización de especies menores en Colombia.pdf. *SENA*.
- Mora, N., & García, A. (2007). Susceptibilidad De Bacterias Ácido Lácticas ( Bal ) Frente a Diversos. *Universidad Autónoma Del Estado de Hidalgo*, 127.
- Morand-Fehr, P., Boutonnet, J. P., Devendra, C., Dubeuf, J. P., Haenlein, G. F. W., Holst, P., ... Capote, J. (2004). Strategy for goat farming in the 21st century. *Small Ruminant Research*, 51(2), 175–183. <http://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2003.08.013>
- Moreno, D., & Grajales, H. (2014). Caracterización del proceso administrativo y de mercado en los sistemas ovinos del trópico alto colombiano. *Rev Ciencia Animal*, (7), 85–98.
- NTC 4092. (2009). *Microbiología de alimentos y productos para alimentación animal. Requisitos generales y directrices para análisis microbiológicos.*
- NTC 4978. Leche y productos lácteos. determinacion de la acidez titulable – metodo de referencia -. – ICONTEC Tienda (2001).
- NTC 4979. (2001). Leche y productos lácteos. determinacion del contenido de solidos totales en leche, crema de leche, leche evaporada, leche condensada azucarada, arequipe, dulce de leche, helados y queso. – METODO DE REFERENCIA -. – ICONTEC Tienda.
- NTC 666. Leche y productos lácteos. guia para muestreo (1996). ICONTEC.
- Organización Mundial de la Salud. (2013). OMS | Brote de síndrome hemolítico urémico en Alemania. *WHO*. Retrieved from [http://www.who.int/csr/don/2011\\_05\\_27/es/](http://www.who.int/csr/don/2011_05_27/es/)
- Organización Mundial de la Salud. (2015). OMS | Escherichia coli. *WHO*.
- Organización Mundial de la Salud. (2016). OMS | Resistencia a los antimicrobianos. *WHO*.

- Organización Mundial de la salud y Organización Panamericana de la Salud. (2014). OPS OMS | Países de las Américas deben actuar ahora para proteger a las personas de las bacterias resistentes a los antibióticos. *OMS/OPS*. Retrieved from [http://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_content&view=article&id=9512%3A2014-countries-americas-share-risk-antibiotic-resistance-must-act-now-protect-health&Itemid=1926&lang=es](http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=9512%3A2014-countries-americas-share-risk-antibiotic-resistance-must-act-now-protect-health&Itemid=1926&lang=es)
- Park, Y. W. (2007). Physico-chemical characteristics of goat and sheep milk. *Small Ruminant Research*, 68(1-2), 73–87. <http://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2006.09.015>
- Parra, R. (2010). Bacterias Ácido Lácticas: papel funcional en los alimentos. *Facultad de Ciencias Agropecuarias*, 8, 93–105.
- Quiles, A., & Hevia, M. (1994). Propiedades Físicas de la Leche de Cabra. In *Leche de cabra* (pp. 53– 55).
- Ramírez, J. C., Ulloa, P., Velázquez, M., Ulloa, J., & Arce, F. (2011). Bacterias lácticas: Importancia en alimentos y sus efectos en la salud. *Revista Fuente*, 2(7), 16. Retrieved from [http://www.hablemosclaro.org/repositorio/biblioteca/b\\_305\\_bacterias\\_lacticas\\_importancia\\_en\\_alimentos.pdf](http://www.hablemosclaro.org/repositorio/biblioteca/b_305_bacterias_lacticas_importancia_en_alimentos.pdf)
- Ramírez, J., Contreras, G., & Gómez, M. C. (2005). La fase estacionaria en la bacteria *Escherichia coli*. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 47(3-4), 92–101.
- Ramírez, M. (2005). *Actividad inhibitoria de cepas de bacterias ácido lácticas frente a bacterias patógenas y deterioradoras de alimentos*. Universidad autonoma del estado del Hidalgo. Retrieved from [http://dgsa.uaeh.edu.mx:8080/bibliotecadigital/bitstream/handle/231104/236/Actividad\\_inhibitoria\\_de\\_cepas\\_de\\_bacterias.pdf?sequence=1](http://dgsa.uaeh.edu.mx:8080/bibliotecadigital/bitstream/handle/231104/236/Actividad_inhibitoria_de_cepas_de_bacterias.pdf?sequence=1)
- Rodríguez, E. (2011). Uso de agentes antimicrobianos naturales en la conservación de frutas y hortalizas. *Ra Ximhai*, 7(1), 153–170.
- Rodríguez, J. M. (2015). Probióticos: Del laboratorio al consumidor. *Nutricion Hospitalaria*, 31, 33–47. <http://doi.org/10.3305/nh.2015.31.sup1.8705>
- Romero, R., & Shelly, J. (2004). Productos lácteos: tecnología. Retrieved from [https://books.google.com.co/books?id=HUugK6Ep\\_JkC&printsec=frontcover&dq=productos+lacteos++del+castillo&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwiF47Ot97jQAhWGTSYKHVCAAjkQ6AEIGTAA#v=onepage&q=productos+lacteos+del+castillo&f=false](https://books.google.com.co/books?id=HUugK6Ep_JkC&printsec=frontcover&dq=productos+lacteos++del+castillo&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwiF47Ot97jQAhWGTSYKHVCAAjkQ6AEIGTAA#v=onepage&q=productos+lacteos+del+castillo&f=false)
- Saenz, Y., Collado, M. y D. J. (2003). Probióticos: criterios de calidad y orientaciones para el consumo. *Acta Pediátrica Española*, 61(9), 476–482.
- Salvador, A., & Martínez, G. (2007). Factores que afectan la producción y composición de la leche de cabra: Revisión bibliográfica. *Revista de La Facultad de Ciencias*, 48(2), 61–76. Retrieved from <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=2950290>
- Sánchez, F. (2016). Bacterias ácido-lácticas contra microorganismos patógenos. *Agencia Informativa Conacyt, Coahuila*.
- Sánchez, L., & Tromps, J. (2014). Caracterización in vitro de bacterias ácido lácticas con potencial probiótico . *Revista de Salud Animal* , 36 (2), 124–129.
- Sanz, M. ., Fernandez, J. ., Torre, G., Ramos, E., Carmosa, F. ., & Boza, J. (2003). Calidad de la leche de los pequeños rumiantes1. *Anales de La Real Academia de Ciencias Veterinarias de Andalucía Oriental*, 16(1), 155–166. Retrieved from [ftp://ftp.sagarpa.gob.mx/CGCS/Documentos/caprinos/Leche/calidad de la leche de los pequeños rumiantes.pdf](ftp://ftp.sagarpa.gob.mx/CGCS/Documentos/caprinos/Leche/calidad+de+la+leche+de+los+pequeños+ruminantes.pdf)
- Secretaria Distrital de Salud de Bogotá. (2007). Guía para la atención de brotes de ETA

- (enfermedades transmitidas por alimentos), 1–6.
- Siew, C. N., Hart, A. L., Kamm, M. A., Stagg, A. J., & Knight, S. C. (2009). Mechanisms of action of probiotics: Recent advances. *Inflammatory Bowel Diseases*, *15*(2), 300–310. <http://doi.org/10.1002/ibd.20602>
- Silanikove, N., Leitner, G., Merin, U., & Prosser, C. G. (2010). Recent advances in exploiting goat's milk: Quality, safety and production aspects. *Small Ruminant Research*, *89*(2-3), 110–124. <http://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2009.12.033>
- Slačanac, V., Božanić, R., Hardi, J., Rezessyné szabó, judit, lučan, M., & Krstanović, V. (2010). Nutritional and therapeutic value of fermented caprine milk. *International Journal of Dairy Technology*, *63*(2), 171–189. <http://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2010.00575.x>
- Stanier, R., Igraham, J., Wheelis, M., & Painter, P. (1996). *Microbiología* (2nd ed.). Reverté. Retrieved from <https://books.google.com.co/books?id=2u-6Q2XCMDgC&printsec=frontcover&dq=STANIER+MICROBIOLOGIA&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwj4mVVN-rjQAhXCSCYKHTp8AdQQ6AEIGTAA#v=onepage&q=STANIER+MICROBIOLOGIA&f=false>
- Tambekar, D. ., & Bhutada, S. . (2010). An Evaluation of probiotic potential of lactobacillus Sp . From milk of domestic animals and commercial a Vailable probiotic preparations in prevention of enteric bacterial infections. *Recent Research in Science and Technology*, *2*(10), 82–88.
- Taranto, M., Médici, M., & Font, G. (2005). Alimentos funcionales probióticos. *Química Viva*, *4*, 26–34.
- Tormo, R. (2006). Probióticos. Concepto y mecanismos de acción. *Anales de Pediatría*, *04*, 30–41. Retrieved from <http://www.analesdepediatria.org/es/probioticos-concepto-mecanismos-accion/articulo/13092364/>
- Vargas, D. cristina moreno. (2013). Nivel De Desarrollo Tecnológico De Los Sistemas De Producción Ovinos Y Caprinos En Las Regiones Centro, Norte Y Valles Interandinos De Colombia. *Tesis De Maestría. Universidad Nacional De Colombia. Bogota - Colombia.*, 107.
- Vásquez, S.; Suárez, H. y Zapata, S. (2009). Utilización De Sustancias Antimicrobianas Producidas Por Bacterias Acido Lácticas En La Conservación De La Carne. *Revista Chilena Nutrición*, *36*(1), 64–71. <http://doi.org/10.4067/S0717-75182009000100007>
- Villarreal, F., Carrasco, M. S., Russell-white, K., & Simonetta, A. C. (2011). Artículo original Efecto inhibitor de lactobacillus casei 206/1 contra Escherichia coli O157:H7. *Revista de La Sociedd Venezolana de Micobiología*, (31), 37–41.
- World Health Organization WHO-OMS. (2014). Antimicrobial resistance. *Bulletin of the World Health Organization*, *61*(3), 383–94. <http://doi.org/10.1007/s13312-014-0374-3>
- World Health Organization. (2003). Heterotrophic plate counts and drinking-water safety. Retrieved from <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Heterotrophic+Plate+Counts+and+Drinking-water+Safety#8>  
<http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Heterotrophic+plate+counts+and+drinking-water+safety#8>

## 11. ANEXOS

### Anexo A. Encuesta a caprinocultores

**UNIVERSIDAD SURCOLOMBIANA**  
**ENCUESTA PRODUCTORES DE LECHE CABRA NORTE DEL DEPARTAMENTO**  
**DEL HUILA “CARACTERIZACIÓN Y MANEJO DE LA PRODUCCION CAPRINA”**

|               |                          |                      |
|---------------|--------------------------|----------------------|
| <b>Fecha:</b> | <b>Nombre productor:</b> | <b>Nombre Finca:</b> |
|---------------|--------------------------|----------------------|

**Localización (descripción):**

---

---

|                |                   |                  |               |             |                        |  |
|----------------|-------------------|------------------|---------------|-------------|------------------------|--|
| <b>Vereda:</b> | <b>Municipio:</b> | <b>T</b><br>(°C) | <b>HR (%)</b> | <b>msnm</b> | <b>EE</b><br><b>NN</b> |  |
|----------------|-------------------|------------------|---------------|-------------|------------------------|--|

**1. Raza de la cabra**

---

**2. Edades de la cabra**

|                                     |  |
|-------------------------------------|--|
| <b>Cabras entre 0 – 6 meses</b>     |  |
| <b>Cabras entre 6 – 12 meses</b>    |  |
| <b>Cabras entre 1 año – 4 años</b>  |  |
| <b>Cabras entre 5 años – 9 años</b> |  |
| <b>Cantidad de cabras en total</b>  |  |

**3. ¿Entre cuáles de las anteriores edades se encuentra las mayores productoras de leche?  
(especificar cantidad litros)**

---

**4. ¿Cuál es la productividad media diaria por animal? (en litros de leche)**

---

**5. ¿Cuál es la productividad media diaria del tambo?**

---

**6.Cuál de los siguientes manejos implementa:**

a) Cabaña   b) libre pastoreo   c) corral

Otros, ¿Cuáles? \_\_\_\_\_

**7. Qué tipo de alimentación implementa:**

| <i>Tipo de alimento</i> | <i>Si / No</i> | <i>Periodicidad</i> |
|-------------------------|----------------|---------------------|
| Reserva de forraje      |                |                     |
| Granos                  |                |                     |
| Concentrados            |                |                     |
| Avena                   |                |                     |
| Salvado                 |                |                     |
| Cebada                  |                |                     |

Otros, ¿cuáles? \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_

**8. Aplicación de Antiparásitos:**

|  |                | <b>Si / No</b> | <b>Periodicidad</b> | <b>Antiparásito</b> |
|--|----------------|----------------|---------------------|---------------------|
| <b>Aplicación preventiva de antiparasitarios</b> | <b>Externa</b> |                |                     |                     |
|  | <b>Interna</b> |                |                     |                     |

**9. Que vacunas implementa, ¿cada cuánto?**

| <b>Tipo de vacuna</b> | <b>Periodicidad</b> |
|-----------------------|---------------------|
|                       |                     |
|                       |                     |
|                       |                     |

**10. ¿En el libre pastoreo que plantas consume?**

\_\_\_\_\_

**11. ¿Disponibilidad de agua y sal, periodicidad?**

Sal: \_\_\_\_\_

Agua: \_\_\_\_\_

**12.Cuál es el tipo de ordeño:**

- a) Manual      B) Mecánico

**10) edad del destete:**

|                 |  |
|-----------------|--|
| Hasta 4 días    |  |
| 5 a 30 días     |  |
| 1 mes a 2 meses |  |
| 2 a 5 meses     |  |
| Más de 5 meses  |  |

**13. Edad de reproducción y tipo de reproducción (inseminación, natural):**

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

## 14. ¿Enfermedades padecidas?

---

### 15. Circuito de comercialización:

|                   |           |  |           |  |
|-------------------|-----------|--|-----------|--|
| Comercio Informal |           |  |           |  |
| Cooperativa       |           |  |           |  |
| Industria         | Artisanal |  | Productos |  |
|                   | Técnico   |  | Productos |  |

### Anexo B. Medios de cultivo

#### Medios líquidos

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

#### Agua de Peptona (Merck KGaA, ref. 64271 Darmstadt, Alemania)

Se disuelve 25,5 g en un litro de agua desmineralizada pH: 7,0±0,2 a 25°C

Composición para un litro de agua destilada.

---

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

---

#### Caldo MRS (Merck KGaA, ref. 64271 Darmstadt, Alemania)

Se disuelve 52,5 g en un litro de agua desmineralizada pH : 5,7± 0,2

Composición para un litro de agua destilada:

---

|                            |        |
|----------------------------|--------|
| Peptona de Caseína         | 10.0 g |
| Extracto de carne          | 10.0 g |
| Extracto de levadura       | 4.0 g  |
| D(+) – glucosa             | 20.0 g |
| Dipotasio hidrogenofosfato | 2.0 g  |
| Tween 80                   | 1.0 g  |
| Diamonio hidrogenocitrato  | 2.0 g  |
| Sodio acetato              | 5.0 g  |
| Magnesio sulfato           | 0.2 g  |
| Manganeso sulfato          | 0.04 g |

---

## Medios de cultivo solidos

### Agar MRS (Merck KGaA, ref. 64271 Darmstadt, Alemania)

Se disolvieron 68,2 g en 1 litro de agua desmineralizada se esterilizo a 121°C durante 15 minutos en autoclave y atempero a 50°C y posteriormente, se vertió en placas estériles. pH:5,7 ± 0,2 a 25°C

#### Composición para un litro de agua destilada:

---

|                            |        |
|----------------------------|--------|
| Peptona de Caseína         | 10.0 g |
| Extracto de carne          | 10.0 g |
| Extracto de levadura       | 4.0 g  |
| D(+) – glucosa             | 20.0 g |
| Dipotasio hidrogenofosfato | 2.0 g  |
| Tween 80                   | 1.0 g  |
| Diamonio hidrogenocitrato  | 2.0 g  |
| Sodio acetato              | 5.0 g  |
| Magnesio sulfato           | 0.2 g  |
| Manganeso sulfato          | 0.04 g |
| Agar                       | 14 gr  |

---

### Agar ENDO (DIBICO, México)

Se disolvieron 41,5 g en 1 litro de agua desmineralizada se esterilizo a 121°C durante 15 minutos en autoclave y atempero a 45°C y posteriormente, se vertió en placas estériles. pH:7,4 ± 0,2 a 25°C.

#### Composición para un litro de agua destilada:

---

|                    |         |
|--------------------|---------|
| Agar               | 15 gr   |
| Fosfato dipotasico | 3.5 gr  |
| Fucsina básica     | 0,5 gr  |
| Lactosa            | 10.0 gr |
| Peptona de carne   | 10.0 gr |
| Sulfito de sodio   | 2.5 gr  |

---

### Agar XLD (DIBICO, México)

Se disolvieron 55 gr en 1 litro de agua desmineralizada, se dejó reposar 15 y luego se llevó a calentar hasta ebullición, se dejó atemperar, y se vertió en placas estériles. pH:7,4 ± 0,2 a 25°C.

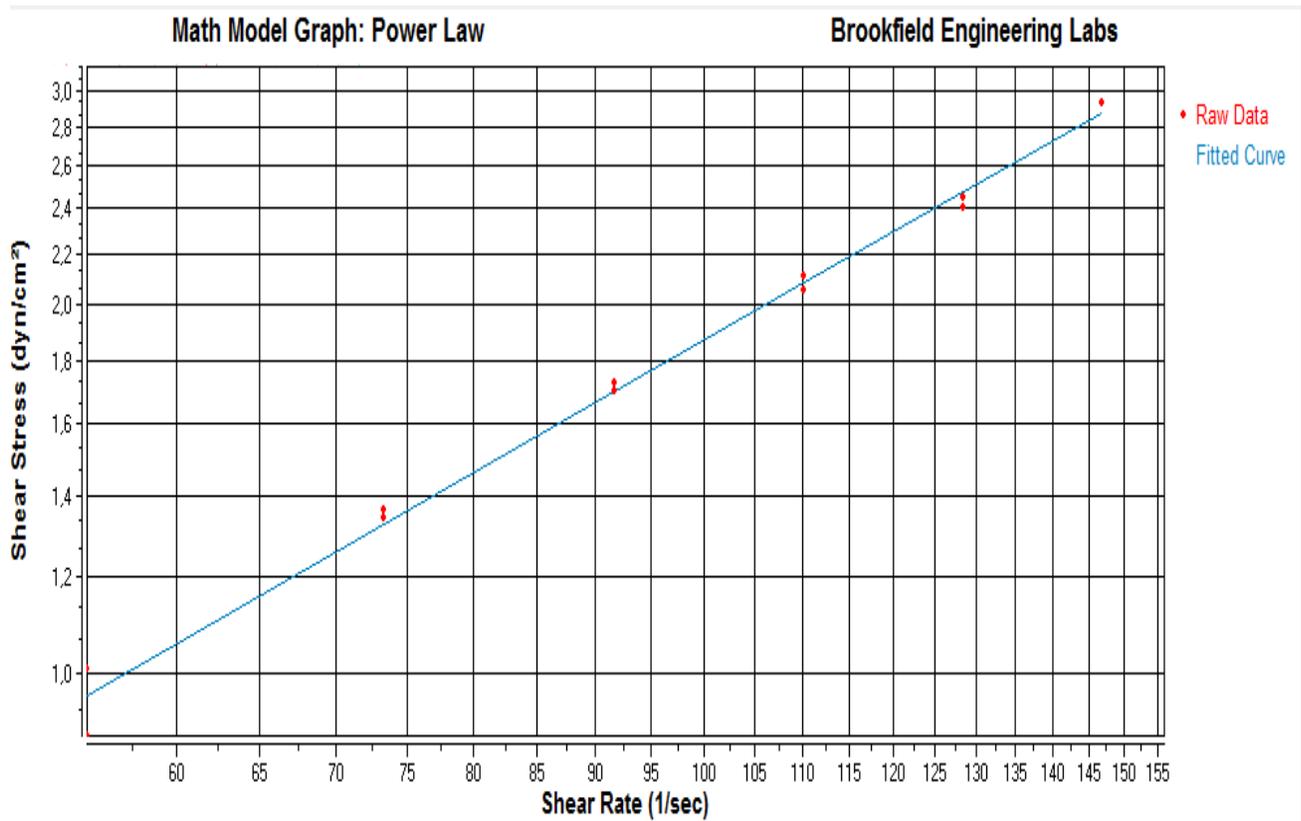
Composición para un litro de agua destilada:

---

|                           |         |
|---------------------------|---------|
| Agar                      | 13.5 gr |
| Cloruro de sodio          | 5 gr    |
| Citrato férrico de amonio | 0.8 gr  |
| Desoxicolato de sodio     | 2.5 gr  |
| Extracto de levadura      | 3.0 gr  |
| Lactosa                   | 7.5 gr  |
| Rojo de fenol             | 5.0 gr  |
| L-lisina                  | 0.08 gr |
| Sacarosa                  | 7.5 gr  |
| Tiosulfato de sodio       | 6.8 gr  |
| Xilosa                    | 3.5 gr  |

---

**Anexo C.** Grafica esfuerzo de corte vs Velocidad de cizallamiento.



**Figura 31.** Curva de viscosidad. Esfuerzo cortante vs Velocidad de cizallamiento

Anexo D. Actividad antimicrobiana de las BAL frente a las cepas patógenas

| Capacidad de Inhibición frente a patógenos discos |                            |                           |                            |                           |                            |                           |                            |                           |
|---|----------------------------|---------------------------|----------------------------|---------------------------|----------------------------|---------------------------|----------------------------|---------------------------|
| Colonia   | <i>E. coli</i> RS          |                           | <i>E. coli</i> AVA         |                           | <i>Klebsiella</i> AVA      |                           | <i>Klebsiella</i> CSS      |                           |
|   | Diámetro promedio<br>16 hr | Desviación Estándar (+/-) |
| Av2   | 15,3                       | 0,6                       | 10,6                       | 2,6                       | 10,3                       | 1,2                       | 11,3                       | 0,6                       |
| Bv2   | 16,3                       | 3,1                       | 13,7                       | 1,2                       | 7,7                        | 1,2                       | 15,0                       | 2,0                       |
| Cv2   | 13,0                       | 2,0                       | 13,7                       | 1,2                       | 8,3                        | 1,2                       | 11,0                       | 0,0                       |
| Dv1   | 13,0                       | 2,0                       | 9,0                        | 0,0                       | 9,0                        | 0,0                       | 11,0                       | 0,0                       |
| Ev1   | 11,0                       | 2,0                       | 12,3                       | 1,2                       | 9,3                        | 0,6                       | 17,0                       | 0,0                       |
| Fv1   | 16,3                       | 1,2                       | 14,3                       | 3,1                       | 11,7                       | 1,2                       | 14,3                       | 2,3                       |
| Hv2e  | 11,3                       | 0,6                       | 13,0                       | 0,0                       | 12,3                       | 2,3                       | 9,7                        | 2,3                       |

| Capacidad de Inhibición frente a patógenos Sobrenadante pH Acido |                            |                           |                            |                           |                            |                           |                            |                           |
|--|----------------------------|---------------------------|----------------------------|---------------------------|----------------------------|---------------------------|----------------------------|---------------------------|
| Colonia  | <i>E. Coli</i> RS          |                           | <i>E. Coli</i> AVA         |                           | <i>Klebsiella</i> AVA      |                           | <i>Klebsiella</i> CSS      |                           |
|  | Diámetro promedio<br>16 hr | Desviación Estándar (+/-) |
| Av2  | 7,0                        | 0,0                       | 11,0                       | 1,0                       | 7,0                        | 0,0                       | 7,0                        | 0,0                       |
| Bv2  | 12,0                       | 1,0                       | 10,7                       | 1,2                       | 7,0                        | 0,0                       | 7,0                        | 0,0                       |
| Cv2  | 8,0                        | 1,7                       | 10,0                       | 0,0                       | 7,0                        | 0,0                       | 7,0                        | 0,0                       |
| Dv1  | 7,0                        | 0,0                       | 7,0                        | 0,0                       | 10,3                       | 0,6                       | 7,0                        | 0,0                       |
| Ev1  | 9,7                        | 2,3                       | 7,0                        | 0,0                       | 7,0                        | 0,0                       | 7,0                        | 0,0                       |
| Fv1  | 7,0                        | 0,0                       | 7,0                        | 0,0                       | 7,0                        | 0,0                       | 7,0                        | 0,0                       |
| Hv2e   | 7,0                        | 0,0                       | 7,0                        | 0,0                       | 9,3                        | 0,6                       | 7,0                        | 0,0                       |
| Iv2e   | 7,0                        | 0,0                       | 7,0                        | 0,0                       | 7,0                        | 0,0                       | 7,0                        | 0,0                       |

| Capacidad de Inhibición frente a patógenos Sobrenadante pH Neutro |                            |                           |                            |                           |                            |                           |                            |                           |
|---|----------------------------|---------------------------|----------------------------|---------------------------|----------------------------|---------------------------|----------------------------|---------------------------|
| Colonia   | <i>E. Coli</i> RS          |                           | <i>E. Coli</i> AVA         |                           | <i>Klebsiella</i> AVA      |                           | <i>Klebsiella</i> CSS      |                           |
|   | Diámetro promedio<br>16 hr | Desviación Estándar (+/-) |
| Av2   | 7,0                        | 0,0                       | 7,0                        | 0,0                       | 9,3                        | 0,6                       | 10,0                       | 0,0                       |
| Bv2   | 7,0                        | 0,0                       | 7,0                        | 0,0                       | 7,0                        | 0,0                       | 7,7                        | 0,2                       |
| Cv2   | 7,0                        | 0,0                       | 10,0                       | 0,0                       | 11,0                       | 0,0                       | 10,0                       | 0,0                       |
| Dv1   | 12,3                       | 0,6                       | 10,0                       | 0,0                       | 7,0                        | 0,0                       | 7,0                        | 0,0                       |
| Ev1   | 7,0                        | 0,0                       | 9,3                        | 2,1                       | 24,0                       | 1,0                       | 7,0                        | 0,0                       |
| Fv1   | 12,0                       | 2,0                       | 7,0                        | 0,0                       | 7,0                        | 0,0                       | 9,3                        | 0,6                       |
| Hv2e  | 7,0                        | 0,0                       | 7,0                        | 0,0                       | 10,7                       | 1,2                       | 7,0                        | 0,0                       |
| Iv2e  | 7,0                        | 0,0                       | 9,3                        | 0,6                       | 7,0                        | 0,0                       | 7,0                        | 0,0                       |

## **CONGRESOS**

**AUTORES:** Yeison Fernando Barrios Rodríguez, Claudia Milena Amorocho, Nelson Gutiérrez Guzmán

**TITULO:** Evaluación de la actividad antimicrobiana de bacterias ácido lácticas aisladas de leche de cabra frente a *Escherichia coli*

**TIPO DE PARTICIPACIÓN:** Conferencia

**CONGRESO:** VII Congreso Latinoamericano y del caribe de estudiantes de Ingeniería Agrícola “CLEIA”

**LUGAR DE CELEBRACIÓN:** Universidad Autónoma de Chapingo – México

**AÑO:** 2016