



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE PUEBLA**



Facultad de Ciencias Químicas BUAP

**Facultad de Ciencias Químicas
Licenciatura en Químico Farmacobiólogo
Departamento de Bioquímica-Alimentos**

**Elaboración de películas comestibles a partir de suero de
leche fermentado por bacterias ácido lácticas.**

TESIS

**Que para obtener el título de:
Lic. en Químico Farmacobiólogo**

Presenta:

p.Q.F.B. María Fernanda Contreras López

Director de tesis:

D.C. Paola Hernández Carranza

Co-Director de tesis:

Dr. Carlos Enrique Ochoa Velasco

Octubre 2021

Dedicatoria

A Dios

Por la inmensa oportunidad de poder cumplir una de las metas más importantes de mi vida, por todas las bendiciones que me das y por todo el amor que me tienes.

Filipenses 4:13

Al ángel más importante que tengo, mi papá Leopoldo

Porque hasta el último día que estuviste conmigo, me demostraste el inmenso amor que me tienes, todo lo que soy y todo lo que hago es por ti, para hacerte sentir orgulloso hasta el cielo, porque sé que ésta meta era un sueño compartido y es dedicada especialmente para ti.

A mi mamá María Eugenia

Por ser mi fortaleza y mí ejemplo a seguir.

Por tu amor incondicional, por tu inmenso apoyo, por ser mí motor para cumplir todas mis metas, por tu enorme paciencia y por ser mi mayor ejemplo de valentía.

A mis hermanas Ilse y Brenda

Por su apoyo incondicional, por el amor que me dan, por ser siempre mis confidentes, por todas las palabras de aliento que me dieron desde el día uno de la carrera y por ser mi más grande ejemplo de que cuando anhelas algo con todo tu corazón, se cumple.

A mis amigos Jesús y Hugo

Por su valiosa amistad desde hace muchos años, por la confianza, las experiencias vividas, los buenos y malos momentos juntos y por creer siempre en mí.

A Scampy y Ruffus

Por todas las veces que se quedaron conmigo hasta tarde haciendo tarea, por todo el amor que me dieron cuando más lo necesitaba.

Con amor, Fernanda.

Agradecimientos

Al Departamento de Bioquímica – Alimentos de la Facultad de Ciencias Químicas de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla por permitirme utilizar sus instalaciones durante mi estancia y desarrollo del presente trabajo de tesis.

De manera muy especial le agradezco a la Dra. Paola Hernández Carranza por confiar en mí y permitirme formar parte de este trabajo de tesis, además de su apoyo en todo momento. Gracias por brindarme la confianza, por abrirme las puertas para trabajar con usted, por su calidad humana, por sus enseñanzas, por toda la paciencia que me tuvo, por su tiempo, dedicación, por brindarme sus conocimientos en la elaboración de este trabajo. Porque no sólo fue mi asesora de tesis, sino que también es un ejemplo para mí de lucha todos los días. Infinitas gracias por todo.

Al Dr. Carlos Enrique Ochoa Velasco, infinitas gracias por su dedicación, compromiso, paciencia, confianza, comprensión, por todos y cada uno de los conocimientos y experiencia transmitidos.

Al honorable Jurado de la presente tesis.

Dr. Raúl Ávila Sosa-Sánchez, Dra. Sandra Luz Cabrera Hilerio y Dr. Armando Mena Contla, un agradecimiento muy especial por formar parte de este trabajo, por el tiempo, dedicación para la revisión de este trabajo, por su conocimiento y por cada una de las observaciones que me dieron, pues me hicieron crecer como profesionalista.

Gracias a todas las personas que estuvieron a mi lado durante la formación de mi vida profesional, a toda mi familia por confiar en mí, por todo el apoyo que me brindaron, infinitas gracias por compartir éste sueño logrado.



OFICIO C.Q./CT 040P/2020

**C. MARÍA FERNANDA CONTRERAS LÓPEZ
PRESENTE**

Toda vez que se cuenta con la aprobación del Coordinador del Área de Bioquímica-alimentos, le comunico que su anteproyecto de Tesis denominado:

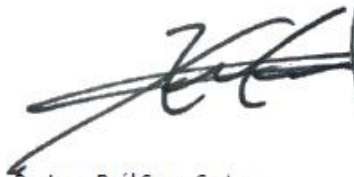
“Elaboración de películas comestibles a partir de suero de leche fermentado por bacterias ácido lácticas”

ha sido autorizado, siendo:

D.C. PAOLA HERNÁNDEZ CARRANZA, Director de tesis
D.C. CARLOS ENRIQUE OCHOA VELASCO, Codirector de tesis

Y con esta fecha se registra en los archivos de la Dirección de esta Facultad, para los fines legales que tenga lugar.

Atentamente
“Pensar bien, para vivir mejor”
H. Puebla de Z., 13 de noviembre de 2020


Dr. Jorge Raúl Cerna Cortez
Director Facultad de Ciencias Químicas



c.c.p. Archivo

Cadena digital:

ZZw(LV*Vv+Is,Wv*Ta.Zg\$Zvi!Yt*Lx%Pc*Zc*LbiYy+Rg.YkiLr)Bi(Pf*Vc)Zz(Vq*Zw(Cx%Vd/Sb/Ne*Zn.Jl!Qq(Mc&Jv,Iq#Jj*Km\$
Ko(Jj*Ty)Us%Uy.Vn%Nj(Ig%XL-Rt/Cd*Kb(Gl!Yb!Wy*Mm,Bz/Ml(Km*Up/Tk*Rb*Pw,PI-
Ap%It.Yo\$Eq\$Wg\$Ce/Gr.Cn+Uw%Sz+Ro#Uj+Gu)Mm%Ry(Ry)Dz+Sy\$Or(An.Vv)Xk#At*Db*Rh\$Dh-
Yq.Oa&Bn&Hn#k\$Jx*Vm*

Facultad
de Ciencias
Químicas

San Claudio No. 1, Edificio FCQ-4
Ciudad Universitaria, Col. San Manuel
Puebla, Pue. C.P. 72540
01 (222) 229 5500 Ext.7390



OFICIO C.Q./CT 033CR/2021

D.C. Raúl Ávila Sosa

D.C. Sandra Luz Cabrera Hilerio

D.C. Armando Mena Contla

Con toda atención comunico a Ustedes que se les propone como integrantes de la Comisión Revisora del trabajo de Tesis que presenta la pasante de la Licenciatura en Química Farmacobiólogo

María Fernanda Contreras López

cuyo título es:

"Elaboración de películas comestibles a partir de suero de leche fermentado por bacterias ácido lácticas"

realizada en el área de Bioquímica-Alimentos.

Asimismo, les solicitamos que a la brevedad posible emitan el dictamen correspondiente.

Atentamente

"Pensar bien, para vivir mejor"

H. Puebla de Z., 31 de agosto de 2021.

Dr. Jorge Raúl Cerna Cortez
Director Facultad de Ciencias Químicas



c.c.p. Archivo

Cadena Digital: 3Tc(Lw"Yn+Wa+Xr-Tc,Vc-Oz\$Zo.Zk%Vi(Ry(Tj+Eg-Hk+Pe#Gt/Aj/lm)Ru-Ev"Uq%Fp"Ek'Cd)Zm&Nv!Gb#Us\$Vj-Hj+P!Lm/El"Ov%Fg,Un&Yp"Tc#Od)Mk-Eu!Yb-Kh-Lu'Wd)Og(Uw/Xm"lp'Tz/Sm&Ht+Yf&Mh\$Ly)Io#Po-Op&Vn"DI%Vu(Fs'Qy)Gh\$Bb#Ut-Rv!Vh-lp)Xs%Av\$Fr-Lu-Uz/Ag"Bl\$Kc"lf\$Rj)Ce"Fi/Er"BF&Xf&Ao(Da%Hi/Lx(Jr,Lb,Nf

Facultad
de Ciencias
Químicas

San Claudio No. 1, Edificio FCQ4
Ciudad Universitaria, Col. San Manuel
Puebla, Pue. C.P. 72540
01 (222) 229 5500 Ext. 7390



OFICIO C.Q./CT 033A/2021

Dr. Jorge R. Cerna Cortez
Director Facultad de Ciencias Químicas
Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

Los que suscriben, integrantes de la Comisión Revisora de Tesis de la alumna de la Licenciatura en Químico Farmacobiólogo

María Fernanda Contreras López

realizada en el área de Bioquímica-Alimentos, comunican a Usted la autorización para la publicación del Trabajo de tesis bajo la dirección de la D.C. Paola Hernández Carranza y del D.C. Carlos Enrique Ochoa Velasco, con el siguiente título:

"Elaboración de películas comestibles a partir de suero de leche fermentado por bacterias ácido lácticas"

Se extiende la presente, para los usos que al interesado convengan el día 21 de septiembre de 2021.

Atentamente
"Pensar bien, para vivir mejor"
H. Puebla de Z., a 22 de septiembre de 2021

D. C. Raúl Ávila Sosa
PRESIDENTE

D. C. Sandra Luz Cabrera Hilerio
SECRETARIO

D. C. Armando Mena Contla
VOCAL

c.c.p. Archivo
Cadena digital:

9Gv)Id%Dk.Og)Uh'Hv!Rq!Wc,Nj+Ke#Fi*Lc/Ld+Up!Dh/Hm#Jh'Vr*Jv!Qn"Pw%Ne%Vv\$Zc'Rw"Yz/UI(Hr,No,Iq)Nh'Kw\$Ye.Be+TI"
At"TI"Wb(Ps)Jy#Jg/Hq"Fe'Pd,Ny(Mh!Ov+Yu*Zd/Qi*Oh,Kx*Ez*Xt,Zm\$Qn+Cc#Zm+Qr\$Rj-SxjLLg%Qz!Pn+Fd-
Rq,Fr'Jd)Bq'Gm(GP'Vb!Ab'Zu-Hx-Vj'Ir-Ir!Om#Uo-Ch&Nu\$Se*Tc)Ov)Is-Qi"Fe#Xs+Eg+Bj/

Facultad
de Ciencias
Químicas

San Claudio No. 1, Edificio FCQ-9
Ciudad Universitaria, Col. San Manuel
Puebla, Pua. C.P. 72540
01 (222) 229 6500 Ext. 7390

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN.....	9
1. INTRODUCCIÓN.....	10
2. ANTECEDENTES.....	11
2.1 Bacterias ácido lácticas.....	11
2.1.1 Clasificación.....	12
2.1.2 Género <i>Lactobacillus</i>	12
2.1.3 Tipos de fermentación por BAL.....	15
2.1.3.1 Homofermentativas.....	15
2.1.3.2 Heterofermentativas.....	16
2.1.3.3 <i>Lactobacillus rhamnosus</i>	17
2.1.3.4 <i>Lactobacillus acidophilus</i>	18
2.2 Suero de leche.....	18
2.2.1 Composición nutricional del suero de leche.....	19
2.2.1.1 Suero de leche dulce.....	19
2.2.1.2 Suero de leche ácido.....	20
2.2.2 Aplicaciones del suero de leche.....	23
2.2.2.1 Productos cárnicos.....	23
2.2.2.2 Hidrolizados.....	23
2.2.2.3 Productos lácteos.....	24
2.2.2.4 Productos de panadería y confitería.....	24
2.3 Películas comestibles.....	24
2.3.1 Composición de películas comestibles.....	25
2.3.1.1 Polisacáridos.....	25
2.3.1.1.1 Almidón.....	26
2.3.1.2 Plastificantes.....	28
2.3.1.2.1 Glicerol.....	28
2.3.1.3 Otros aditivos.....	29
2.3.2 Métodos de elaboración de películas comestibles.....	30
2.3.3 Uso de películas comestibles.....	30
3. JUSTIFICACIÓN.....	31
4. OBJETIVOS.....	32
4.1 Objetivo general.....	32
4.2 Objetivos particulares.....	32
5. DIAGRAMA DE TRABAJO.....	33
6. MATERIAL Y MÉTODOS.....	34
7. METODOLOGÍA.....	36
7.1 Reactivación de microorganismos.....	36
7.2 Obtención, análisis y tratamiento del suero de leche.....	36
7.3 Caracterización de microorganismos indicadores de la calidad en el suero de leche.....	36
7.4 Fermentación por bacterias ácido lácticas en suero de leche.....	37
7.5 Parámetros de crecimiento.....	37
7.6 Elaboración de películas.....	38
7.7 Análisis estadístico.....	38
8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	39

8.1	Caracterización de suero.....	39
8.2	Parámetros de crecimiento, acidez y pH de bacterias lácticas en suero de leche y caldo MRS	40
8.3	Parámetros de crecimiento.....	46
8.4	Formación de películas a partir de suero de leche fermentado.....	47
10.	CONCLUSIONES.....	49
11.	RECOMENDACIONES	50
12.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Morfología de <i>Lactobacillus</i>	13
Figura 2.	Fermentación homoláctica (Axxelson, 1993).....	15
Figura 3.	Fermentación heteroláctica (Axxelson, 1993).	16
Figura 4.	Ruta de fermentación de la glucosa de <i>Lactobacillus rhamnosus</i> (Narayanan <i>et al.</i> , 2004).....	17
Figura 5.	Estructura de la amilosa (Dombrink-Kurtzman, 1997).....	27
Figura 6.	Estructura de la amilopectina (Dombrink-Kurtzman, 1997).....	27
Figura 7.	Estructura del glicerol (Calderón, 2014).	28
Figura 8.	Diagrama de trabajo para la elaboración de películas comestibles a partir de suero de leche fermentado por bacterias ácido lácticas del género <i>Lactobacillus</i>	33
Figura 9.	Valores de pH generados por bacterias lácticas inoculadas en suero de leche.....	41
Figura 10.	Valores de pH generados por bacterias lácticas inoculadas en caldo MRS.	42
Figura 11.	Acidez (% de ácido láctico) de bacterias lácticas inoculadas en suero de leche.....	43
Figura 12.	Acidez (% ácido láctico) de bacterias lácticas inoculadas en caldo MRS.	43
Figura 13.	Crecimiento de bacterias lácticas inoculadas en suero de leche.	45
Figura 14.	Crecimiento de bacterias lácticas inoculadas en caldo MRS.	45
Figura 15.	Películas comestibles a partir de suero de leche fermentado por <i>L. acidophilus</i> (izquierda) y <i>L. rhamnosus</i> (derecha)..	47

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición del suero de leche.	21
Tabla 2. Diferencias entre la coagulación ácida y enzimática del suero de leche.	22
Tabla 3. Equipos utilizados en la metodología.	34
Tabla 4. Métodos y referencias que se utilizaron.	35
Tabla 5. Caracterización del suero lácteo.	40
Tabla 6. Parámetros de crecimiento de <i>Lactobacillus</i> en suero de leche y medio MRS.	46

RESUMEN

Hoy en día, se elaboran películas o recubrimiento comestibles a partir de polisacáridos, proteínas y lípidos o por una mezcla de estos, las películas son utilizadas como materiales en la conservación de alimentos, además pueden ser acarreadores de aditivos y nutrientes alimenticios. El objetivo de este trabajo fue elaborar películas comestibles a partir de suero de leche fermentado por bacterias ácido lácticas del género *Lactobacillus*.

Se utilizó suero de leche como medio de crecimiento de bacterias lácticas, se pasteurizó a 65°C durante 30 min, y posteriormente se inoculó con *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus rhamnosus*, cada 12 h durante 36 h se midió el pH, acidez y la población microbiana. Se utilizó caldo MRS como medio de crecimiento control.

La solución para las películas se elaboró a partir del suero fermentado usando almidón al 5% y glicerol al 1%, la solución fue calentada a 68°C durante 5 min, posteriormente se vertió en cajas Petri estériles y se dejaron secar en un deshidratador de alimentos a 50°C durante 120 min.

Los resultados mostraron que ambos *Lactobacillus* crecieron tanto en suero como en el medio MRS. Los parámetros de crecimiento para *L. acidophilus* después de 36 h en suero de leche fueron: pH 4.19 ± 0.02 , % de ácido láctico 0.36 ± 0.01 , población 3.43×10^8 UFC/mL; para *L. rhamnosus* pH 4.48 ± 0.03 , % de ácido láctico 0.45 ± 0.10 , población 3.73×10^8 UFC/ mL; en caldo MRS para *L. acidophilus* fueron pH 4.30 ± 0.18 , % de ácido láctico 1.26 ± 0.01 , población 1.95×10^8 UFC/mL; para *L. rhamnosus* fueron pH 4.16 ± 0.11 , % de ácido láctico 1.44 ± 0.20 , población 1.12×10^9 UFC/mL. Finalmente, se obtuvieron películas de apariencia elástica, delgada y un tanto opaca.

En conclusión, el suero de leche es un medio alternativo para el desarrollo y proliferación de bacterias ácido lácticas, y es útil para la elaboración de películas que pueden ser usadas en alimentos.

1. INTRODUCCIÓN

La industria láctea es uno de los sectores industriales alimenticios más importantes, debido a que en México se producen cerca de 400,000 toneladas de queso generando gran cantidad de suero (CANILEC, 2020), del total de suero de leche que se produce, el 40% se destina para consumo animal, mientras que el 60% que resta, es desechado sin tratamiento previo al medio ambiente creando un serio problema ambiental (Parra, 2009).

El suero de leche es un líquido obtenido durante la etapa de coagulación de la leche mediante enzimas proteolíticas, las cuales actúan sobre las caseínas, creando una fragmentación, hacen que se desestabilicen y finalmente precipiten. El suero contiene proteínas (lactoalbúminas y lactoglobulinas), sales minerales, vitaminas hidrosolubles y lactosa. Por su elevado contenido nutricional se ha propuesto el uso de este producto en diversas formas como son: concentrados, fórmulas infantiles, producción de etanol, ácidos orgánicos, biomasa microbiana y bebidas fermentadas, a partir de bacterias lácticas (Guimarães *et al.*, 2020).

Las bacterias ácido lácticas son microorganismos que producen ácido láctico como producto principal de su metabolismo, por lo que han sido usadas para elaborar alimentos fermentados que generan beneficios a la salud humana. Hoy en día, se incorporan en diversos alimentos, como yogurt, kéfir, quesos, etc. (Ayivi *et al.*, 2020), además son usadas dentro de recubrimientos comestibles por su capacidad probiótica y antimicrobiana (Gregirchak *et al.*, 2020).

Por lo anterior, el objetivo de este trabajo es elaborar películas comestibles a partir de suero de leche fermentado por bacterias ácido lácticas del género *Lactobacillus*.

2. ANTECEDENTES

2.1 Bacterias ácido lácticas

Las bacterias ácido lácticas (BAL) son microorganismos al que pertenecen diversos géneros, con características fisiológicas, metabólicas y morfológicas en común. Las BAL presentan forma de cocos, bacilos o coco-bacilos, son Gram positivos, no son esporulados, son inmóviles, anaeróbicos y microaerófilicos; en su detección bioquímica dan catalasa y oxidasa negativas, carecen de citocromos, y generan como producto principal de la fermentación de carbohidratos ácido láctico (Carr *et al.*, 2002; Vázquez *et al.*, 2009). Las BAL también son ácido tolerantes debido a que algunas cepas crecen a valores de pH tan bajos como 3.2, aunque gran parte de éstas crecen a pH entre 4 y 4.5, debido a esto pueden sobrevivir naturalmente en medios donde otras bacterias no tolerarían la aumentada actividad producida por los ácidos orgánicos (Carr *et al.*, 2002).

Las BAL utilizan principalmente carbohidratos como fuente de carbono y energía, aunque también requieren de otros nutrientes como: vitaminas, nucleótidos y aminoácidos. Estos requerimientos suelen suplirse una vez que el medio de cultivo contiene carbohidratos fermentables, extracto de carne, peptona y extracto de levadura, aunque una suplementación con manganeso y ésteres de ácido oleico resulta adecuada y hasta esencial para muchas cepas ácido lácticas (Samaniego y Sosa del Castillo, 2006).

Las BAL generalmente se encuentran distribuidas en la naturaleza y han sido aisladas de diversas plantas, alimentos, suelo, así como también del tracto gastrointestinal entre otras fuentes (Azadnia *et al.*, 2011). La leche es un medio óptimo y común para su crecimiento. Aunque, existen otros alimentos que son excelentes medios de crecimiento y proliferación, además de que se producen satisfactoriamente sus metabolitos, entre estos se encuentran los vegetales, las masas de cereales y la carne (Vázquez *et al.*, 2009).

Con las BAL se han desarrollado muchos alimentos tradicionales, que mejoran las características del producto e imparten ciertas propiedades que mejoran la aceptación y el atractivo del consumidor. La mayoría de los productos que se desarrollan mediante el uso de las BAL también brindan beneficios superiores para la salud del consumidor, lo cual es clave para mantener un sistema gastrointestinal sano. Algunos de los productos alimenticios fermentados de BAL incluyen: kéfir, queso, mantequilla, yogur, suero de leche, verduras en salmuera, masa madre, cuajada de soja, carne fermentada y bebidas (Gupta *et al.*, 2018).

2.1.1 Clasificación

Existe una clasificación de las BAL que se sustenta en diferentes criterios como son: morfología, el crecimiento a diferentes temperaturas, modo de fermentación de carbohidratos, la concentración de ácido láctico producido, habilidad para crecer a alta concentración de sal y tolerancia alcalina o ácida.

El género *Lactobacillus* ha sido reclasificado recientemente en 25 géneros. Esta reclasificación fue necesaria debido a la extensión de la diversidad del género original, lo que lo hizo muy desafiante clasificar, nombrar y distinguir entre diferentes lactobacilos (Zheng *et al.*, 2020). Los nuevos géneros son *Lactobacillus*, *Paralactobacillus* e incluyen: *Acetilactobacillus*, *Agrilactobacillus*, *Amylolactobacillus*, *Apilactobacillus*, *Bombilactobacillus*, *Companilactobacillus*, *Dellaglioia*, *Fructilactobacillus*, *Furfurilactobacillus*, *Holzapfelia*, *Lapidilactobacillus*, *Lacticaseibacillus*, *Lactiplantibacillus*, *Latilactobacillus*, *Lentilactobacillus*, *Levilactobacillus*, *Ligilactobacillus*, *Liquorilactobacillus*, *Limosilactobacillus*, *Loigolactobacillus*, *Paucilactobacillus*, *Secundilactobacillus* y *Schleiferilactobacillus* (Zheng *et al.*, 2020).

2.1.2 Género *Lactobacillus*

Lactobacillus posee 44 especies, los cuales se clasifican en tres grupos. Algunas de las especies de *Lactobacillus* se subdividen en varias subespecies tales como:

- *Lactobacillus delbrueckii* (se encuentran tres subespecies: *lactis*, *bulgaris* y *delbrueckii*).

- *Lactobacillus salivarius* (se encuentran dos subespecies: *salicinus* y *salivarius*).
- *Lactobacillus casei* (se encuentran cuatro subespecies: *pseudopantarum*, *casei*, *tolerans* y *rhamnosus*).
- *Lactobacillus coryniformis* (se encuentran dos subespecies: *torquens* y *coryniformis*) (Samaniego y Sosa del Castillo, 2006).

Entre la morfología de los *Lactobacillus* se encuentran bacilos largos que regularmente pueden observarse como bacilos o coco-bacilos presentándose en forma de cadenas, además de que son inmóviles, son Gram positivos, no presentan esporas, forman ácido láctico como producto principal de la fermentación de los azúcares (Samaniego y Sosa del Castillo, 2006).

Lactobacillus al observarse al microscopio en medios sólidos se van observar en forma de colonias pequeñas de 2 a 5 mm, con forma convexa, márgenes enteros, suaves, van a presentar opacidad y no poseen pigmentación. Aunque en algunos casos las colonias pueden presentar coloración rojiza o amarillenta. Algunas especies de *Lactobacillus* pueden formar colonias rugosas y otras especies presentan colonias viscosas (Goldstein *et al.*, 2015). La figura 1 muestra la morfología típica del género *Lactobacillus*.

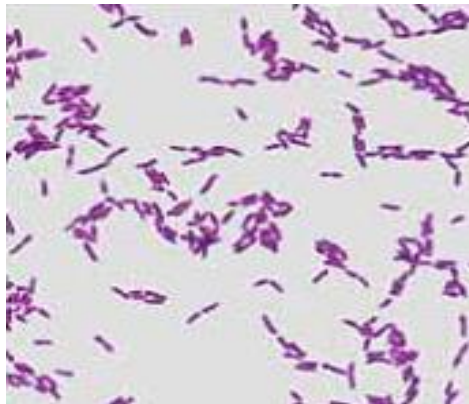


Figura 1. Morfología de *Lactobacillus*.

Entre las características bioquímicas que presenta el género *Lactobacillus* se presentan las siguientes:

- Reducción de nitratos: negativo
 - Citocromo: negativo
 - Producción de indol: negativo
 - Consumo de caseína: negativo
 - Catalasa: negativo
 - Oxidasa: negativo
 - Producción de ácido sulfhídrico: negativo
- (Samaniego y Sosa del Castillo, 2006).

Los *Lactobacillus* son mesófilos, debido a que su rango de temperaturas para el crecimiento óptimo se encuentra entre 2 y 53°C, algunas especies crecen por debajo de 15°C y existen especies que pueden crecer por debajo de 5°C. En cambio, los *Lactobacillus* termófilos presentan crecimiento a temperatura de 55°C y no crecen por debajo de 15°C.

Lactobacillus se desarrolla en medios ligeramente ácidos, con un rango de pH de 6.4 a 4.5, con un desarrollo óptimo entre pH de 5.5 y 6.2. Sin embargo, su crecimiento cesa cuando el pH alcanza valores de 3.6 a 4 en dependencia de especies y disminuye notablemente en medios neutros o ligeramente alcalinos. Los *Lactobacillus* son capaces de reducir el pH del sustrato donde se desarrollan, disminuyendo el pH por debajo de 4.0 gracias a la formación de ácido láctico. De esta manera se disminuye considerablemente el crecimiento de otros microorganismos competidores que no son ácido tolerantes, y exceptúa el crecimiento de otras bacterias lácticas y el de levaduras (Samaniego y Sosa del Castillo, 2006).

Gran parte de las cepas de *Lactobacillus* son aerotolerantes; el crecimiento óptimo lo alcanzan bajo condiciones anaeróbicas o microaerofílicas y se considera que con una gran concentración de CO₂ puede estimular el crecimiento de los *Lactobacillus* (Goldstein *et al.*, 2015).

2.1.3 Tipos de fermentación por BAL

Durante la fermentación las BAL producen ácidos orgánicos y otros metabolitos que aseguran el desarrollo de sabores en los alimentos, previenen el deterioro y permiten actuar como bioconservadores. De acuerdo con su capacidad de fermentación de la lactosa, las BAL se clasifican en heterofermentativas (debido a que producen ácido láctico y otras sustancias) y homofermentativas (debido a que solo producen ácido láctico) (Pescumma, 2008).

2.1.3.1 Homofermentativas

A este grupo homofermentativo pertenecen especies como: *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Pediococcus* y *Streptococcus*, estos microorganismos utilizan la ruta de Embden-Meyerhoff debido a que convierten 1 mol de glucosa en dos moles de ácido láctico como se muestra en la figura 2 (Bedolla, 2004), produciendo más del 85% de ácido láctico. En cambio, las bacterias heterofermentativas generan la mitad de la energía del grupo homofermentativo (Hernández, 2007).



Figura 2. Fermentación homoláctica (Axxelson, 1993).

Las bacterias pertenecientes a este grupo poseen las enzimas hexosa isomerasa y aldolasa, pero carecen de la fosfoacetolasa, misma que puede generar procesos de isomerización.

2.1.3.2 Heterofermentativas

Las especies de este grupo producen solo el 50% de ácido láctico al fermentar 1 mol de glucosa, produciendo 1 mol de ácido láctico, 1 mol de etanol y 1 mol de CO₂. Se produce 1 mol de ATP por cada mol de glucosa como se muestra en la figura 3 (Hernández, 2007). El grupo heterofermentativo se compone por: *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus* y *Pediococcus*. Estas bacterias poseen la enzima fosfoacetolasa, sin embargo, carecen de la hexosa isomerasa y aldolasa; por lo que, no siguen la vía Embden-Meyerhoff, pero utilizan las vías de la hexosa monofosfato o de las pentosas (Hernández, 2007).

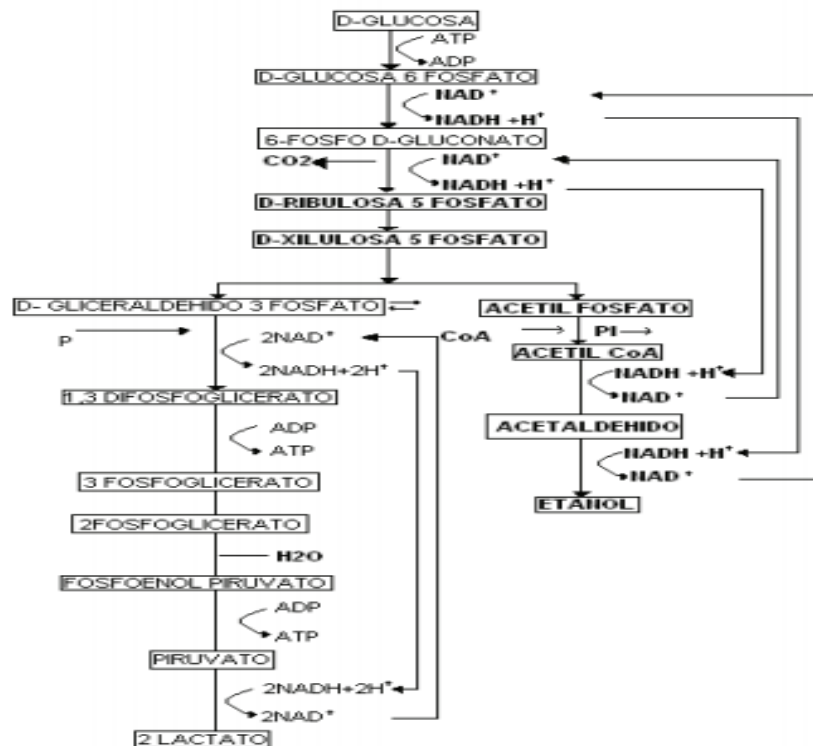


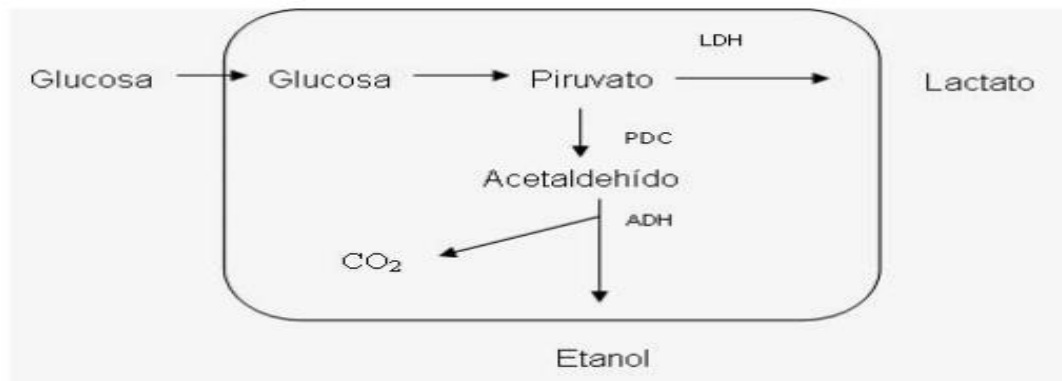
Figura 3. Fermentación heteroláctica (Axxelson, 1993).

2.1.3.3 *Lactobacillus rhamnosus*

Este microorganismo se aisló por primera vez en el año de 1983, en los intestinos de un humano sano por los científicos Sherwood Gorbach y Barry Goldin, razón por la cual se denominó con las siglas GG. El “GG” es el nombre que se le otorgó a la cepa de *L. rhamnosus* esto derivado de los apellidos de ambos científicos que la aislaron, aunque es considerada una bacteria de la subespecie de *L. casei*. Por otro lado, *L. rhamnosus* es tolerante a los ácidos y bases que se encuentran en el estómago y el tracto digestivo (Schrezenmeir y de Vrese, 2001).

L. rhamnosus tiene forma de bacilo, con medidas de 0.8 a 1.0 μm de ancho y de 2.0 a 4.0 μm de longitud. La forma en que se da su crecimiento puede ser en cadenas cortas o en forma individual. Es inmóvil debido a que no posee flagelos. Puede presentar plásmidos y pilis. Es una bacteria mesófila, sin embargo, algunas de las cepas tienen la peculiaridad de crecer a temperaturas por debajo de los 15°C o por arriba de los 40°C. El crecimiento inicial de *L. rhamnosus* requiere de medios ácidos, con pH que van desde 4.5 a 6.4 (Goldstein *et al.*, 2015).

Es el único *Lactobacillus* que puede fermentar a la ramnosa, pertenece al grupo de las bacterias heterofermentativas facultativas (Narayanan *et al.*, 2004). La figura 4 muestra la ruta de fermentación de este microorganismo.



1. LDH Lactato deshidrogenasa
2. PDC Piruvato descarboxilasa
3. ADH Alcohol deshidrogenasa

Figura 4. Ruta de fermentación de la glucosa por *Lactobacillus rhamnosus* (Narayanan *et al.*, 2004).

L. rhamnosus es una BAL frecuentemente usada como probiótico en alimentos, debido a que puede resistir ambientes adversos en el tracto gastrointestinal, y previene la infección de patógenos (Gopal *et al.*, 2001).

2.1.3.4 *Lactobacillus acidophilus*

Lactobacillus acidophilus fue descubierto por Ernst Moro en 1900. Taxonómicamente está ubicado en el Phylum *Firmicutes*, Clase *Bacilli*, Orden *Lactobacillales* y Familia *Lactobacillaceae* (Goldstein *et al.*, 2015).

Son bacilos Gram positivos, no forman esporas, microaerófilos y homofermentativos. La temperatura de crecimiento óptima es de 37°C. Sobrevive a pH 2.0 durante un periodo de incubación de 2 h (Avall y Palva, 2005).

Se puede encontrar de forma habitual en el tracto gastrointestinal en los seres humanos, además está presente en algunas leches que se fermentan de manera tradicional, como el kéfir (Salminen *et al.*, 1998).

Lactobacillus acidophilus se usa como un complemento en muchos procesos de fermentación de alimentos que contribuyen a otorgar olor, sabor y textura únicos (Soltan *et al.*, 2015).

Es considerado como probiótico, debido a que su ingesta en ciertas cantidades (1×10^6 UFC/g o mL), puede ejercer beneficios sobre el tracto gastrointestinal de los consumidores, además de que puede tener otros efectos, tales como la modulación del sistema inmunitario o el alivio de la intolerancia a la lactosa (Salminen *et al.*, 1998).

2.2 Suero de leche

El suero de leche es definido como un subproducto lácteo, resultado de la separación del coágulo de la leche al momento de la fabricación del queso, proceso que puede generarse mediante la adición de ácidos o por acción de enzimas como la renina, las cuales hidrolizan el sistema coloidal de la leche obteniéndose dos fracciones:

1. La primera fracción va a ser sólida, se compone principalmente por proteínas insolubles y lípidos, los cuales durante el proceso de precipitación van a arrastrar y atrapar en menor cantidad algunos de los constituyentes hidrosolubles presentes en la leche (Doyle *et al.*, 1997).
2. La segunda fracción va a ser líquida, esta va a corresponder al suero de leche en cuyo interior se van a encontrar suspendidos todos los componentes nutricionales que se integraron durante la coagulación de la caseína como son: vitaminas, carbohidratos y minerales (Doyle *et al.*, 1997).

Se estima que por cada kg de queso elaborado, se producen 9 kg de suero de leche, esto va a representar cerca del 85 al 90% del volumen de la leche y contiene aproximadamente el 55% de sus nutrientes (Liu *et al.*, 2005).

2.2.1 Composición nutricional del suero de leche

El contenido nutricional del suero de leche puede variar considerablemente dependiendo del tipo de queso elaborado, las características de la leche que es utilizada para la elaboración de este, así como del proceso tecnológico empleado en la fabricación del queso. De acuerdo con estas diferencias el suero de leche se clasifica en dos tipos fundamentales:

1. Suero de leche dulce, producido a partir de acción enzimática (renina) y contiene mayor cantidad de lactosa.
2. Suero de leche ácido, producida a partir de acción ácida, contiene mayor concentración de ácido láctico (Doyle *et al.*, 1997).

2.2.1.1 Suero de leche dulce

Este tipo de suero se compone de nitrógeno no proteico (22%) y tiene una gran concentración de lactosa (51%), es rico en proteínas (7%), pero presenta poco ácido láctico (<1%). El resto del suero se compone de sales, grasas y minerales (Pintado, 2012).

2.2.1.2 Suero de leche ácido

Se obtiene a partir de quesos coagulados con ácido acético. Contiene un pH de 4, con una mayor proporción de nitrógeno no proteico (27%) y posee una menor concentración de lactosa (42%), al ser derivado de leches ácidas, parte de la lactosa se transforma en ácido láctico presentando una concentración de ácido láctico del 10%. (Pintado, 2012).

En la tabla 1 se presenta la composición nutricional del suero de leche.

Tabla 1. Composición nutricional del suero de leche.

Componente	Observaciones
Lactosa	95% de la lactosa de la leche, en una proporción de 46.0 – 52.0 g/L en suero de leche dulce y 44.0 – 46.0 g/L en suero de leche ácido.
Proteína	Presenta alrededor del 25% de las proteínas contenidas normalmente en la leche: 6.0 g/L en suero de leche dulce y 6.0 – 8.0 g/L en suero de leche ácido.
α – Lactoalbúmina	30% del total del contenido proteico.
β – Lactoalbúmina	Importante porque tienen propiedades emulsionantes y cumple una función importante al interactuar con compuestos como ácidos grasos.
Globulina	Corresponden a 10% del total de proteínas.
Proteasas-peptonas	Lactoferrinas, albúmina, inmunoglobulinas, factores de crecimiento, glicoproteínas.
Lípidos	0.5% y 8% de la materia grasa de la leche.
Vitaminas	Tiamina 0.38 mg/mL, riboflavina 1.2 mg/mL, ácido nicotínico 0.85 mg/mL, ácido pantoténico 3.4 mg/mL.
Minerales	Calcio 0.4 – 0.6 g/L en suero de leche dulce y 1.2 – 1.6 g/L en suero de leche ácido, fosforo, potasio, sodio y magnesio.
Compuestos biológicamente activos y péptidos bioactivos	Para ejercer determinados efectos fisiológicos y bioactivos, con potencial antihipertensivo, actividad antimicrobiano, antioxidante, incremento de la saciedad, entre otros.

Fuente: Walstra *et al.*, 2001.

En la tabla 2 se puede observar las diferencias que existen entre la coagulación enzimática y la coagulación ácida del suero de leche.

Tabla 2. Diferencias entre la coagulación ácida y enzimática del suero de leche.

Factor	Coagulación enzimática	Coagulación ácida
Proceso bioquímico	Sin degradación de lactosa	Fermentación láctica
Modificación de la caseína	Transformación en paracaseína y separación de una parte no proteica	No hay modificación química de la proteína
pH	6.8	4.6
Composición del coágulo	Fosfoparacaseinato de calcio	Caseína desmineralizada
Naturaleza del coágulo	Elástico e impermeable	Cuajada friable (desmenuzable) sin ligazón o poco compacta
Tiempo de cuajado	10 – 60 min	Varias horas
Sinéresis (contracción natural de la cuajada y liberación del suero)	Rápida	Lenta

Fuente: ICTA, 1995.

2.2.2 Aplicaciones del suero de leche

El suero de leche presenta diversas aplicaciones en la industria, debido al alto contenido de proteína y minerales (Díaz *et al.*, 2004). Las proteínas del suero de leche son utilizadas en una diversidad de alimentos debido a sus características tecno-funcionales como son: capacidad de emulsificación, solubilidad, retención de agua/grasa, espesante, espumante y gelificación, además, que realizan del producto un interesante ingrediente alimenticio (Parra, 2009).

A continuación, se describen algunas aplicaciones del suero de leche.

2.2.2.1 Productos cárnicos

Las proteínas de suero se utilizan principalmente como agentes aglutinantes, actuando como modificadores de la textura, ayudan a intensificar los sabores del producto, poseen un elevado valor nutritivo, contienen aminoácidos esenciales digeribles y biodisponibles. Las proteínas de suero de leche se pueden utilizar en: carnes procesadas (hamburguesas, productos embutidos, jamón curado, etc). También se ha empleado en productos de carne de ave de corral como Nuggets y embutidos de pollo, además, se ha empleado en pescados y mariscos en forma de relleno y surimi (Prabhu y Keeton, 2008).

2.2.2.2 Hidrolizados

Son aquellas proteínas que al pasar por un proceso de hidrólisis, las cadenas más largas de proteína se descomponen en péptidos o aminoácidos por acción de enzimas proteolíticas (Huertas, 2009). Los hidrolizados representan una mejor forma de utilización de las proteínas del suero y se utilizan como suplementos dietéticos, donde contribuyen en la mejora fisiológica, sobre todo en personas de la tercera edad, bebés prematuros o lactantes con síndromes de mala absorción y deportistas. Los hidrolizados son muy utilizados gracias a su inmediata y completa absorción a nivel digestivo en comparación a la proteína intacta sin desnaturalizar (Huertas, 2009).

2.2.2.3 Productos lácteos

Gran parte del suero de leche es empleado en la industria de los lácteos donde es adicionado nuevamente en quesos procesados y quesos cremosos donde contribuye a elevar la textura, color, apariencia e incrementar el contenido proteico y de calcio, también se emplea como sustituto de grasa en bebidas lácteas bajas en calorías, proporcionando una textura similar a la de los productos fermentados como el yogurt. Por otro lado, es utilizado en la preparación de helados, dando como resultado productos con un bajo contenido de grasa, una mayor estabilidad al punto de congelación, y funcionan como sustituto para la incorporación de aire (Parra, 2009).

2.2.2.4 Productos de panadería y confitería.

Los concentrados de proteína de suero son comúnmente utilizados en la industria de la panificación y repostería debido en buena parte al sabor lácteo, a la blandura que brindan a los productos, además de que ayudan a mejorar el valor nutritivo, el color y la apariencia. También se utilizan para reemplazar total o parcialmente las propiedades de emulsificación que otorgan ingredientes como el huevo. Una aplicación fundamental es en la coloración de productos de confitería, causada primordialmente por reacciones químicas de caramelización y de Maillard, ambas reacciones necesitan disponer de una fuente de azúcares reductores (glucosa, lactosa, etc). La reacción de Maillard, además, requiere disponer de una fuente de aminoácidos, péptidos o proteínas. Los productos del suero de leche suministran los ingredientes requeridos para esta reacción: la proteína y la lactosa (Von, 2000).

2.3 Películas comestibles

Son matrices preformadas, delgadas, que luego van a ser usadas como recubrimiento en los alimentos o se encontrarán entre los elementos del alimento. Se elaboran usando polisacáridos, compuestos de naturaleza proteica o lipídica y/o por la mezcla de compuestos. Poseen propiedades mecánicas, además de que generan un efecto barrera frente al transporte de gases y tienen la posibilidad

de obtener diversas características funcionales dependiendo de las propiedades de las sustancias que se adicionan y que forman parte de dichas películas (Del Valle *et al.*, 2005).

Entre las ventajas que tienen las películas comestibles se encuentran:

- Están exentas de tóxicos y son seguras para la salud del consumidor.
- Requieren una tecnología de elaboración simple.
- Son barrera ante la acción física, química y mecánica que pueden sufrir los alimentos.
- Contribuyen a mejorar las propiedades mecánicas y ayudan a preservar la textura.
- Contribuyen a prolongar la vida útil de los alimentos a los cuales se les adicionó dicha película, a través del control del crecimiento de microorganismos.
- Regulan distintas condiciones de interfase o superficiales del alimento (Fernández *et al.*, 2014).

Por otro lado, la principal diferencia que existe entre una película comestible (PC) y un recubrimiento comestible (RC) se da mediante la metodología de elaboración y formación utilizada, los RC se definen como matrices delgadas y continuas, que se forman alrededor del alimento, principalmente por medio de la inmersión del mismo en una solución formadora del recubrimiento, mientras que las PC son matrices delgadas y preformadas, que posteriormente serán usadas a modo de recubrimiento de los alimentos, por lo que, los RC son utilizados de manera directa sobre la superficie del alimento, mientras que las PC se elaboran de forma separada y posteriormente se les adicionan a los alimentos. (Quintero *et al.*, 2010).

2.3.1 Composición de películas comestibles

2.3.1.1 Polisacáridos

Los polisacáridos se presentan en largas cadenas poliméricas de monosacáridos (principalmente glucosa). Uno de los polisacáridos más usados es el almidón, el

cual forma parte de la reserva energética de plantas. Los polisacáridos también tienen una gran importancia en los tejidos de sostén de la planta.

Los polisacáridos más usados para formar películas comestibles son de procedencia marina, vegetal o microbiana, ejemplos de estos son el alginato, las gomas, el almidón, carboximetilcelulosa y celulosa, entre otros (Dahall, 2013).

La estructura química de los polisacáridos puede presentarse en forma lineal o ramificada, generalmente pueden contener un mismo tipo de monosacárido (homopolisacárido) o varios monosacáridos (heteropolisacárido). Algunas de las características de las películas comestibles elaboradas a partir de polisacáridos, vienen determinadas por la estructura del tipo de polisacárido que contienen, debido a que influye el número de enlaces de hidrógeno intermoleculares establecidos entre las cadenas del polímero. Por otro lado, el peso molecular del polisacárido juega también un papel importante en las propiedades finales de las películas. Los polímeros lineales de elevado peso molecular y no iónicos forman películas fuertes, un ejemplo de esto es el agar y la metilcelulosa. Sin embargo, los polisacáridos ramificados, con o sin carga aniónica, forman películas más débiles (Nieto, 2009). Por lo general, los polisacáridos forman películas con buenas características mecánicas y de barrera a gases como el O₂ y CO₂, pero no a la humedad debido a que son bastantes hidrofílicos, por lo que su resistencia al agua es menor que el de las películas elaboradas con proteínas (Nieto, 2009).

2.3.1.1.1 Almidón

El almidón es homopolisacárido constituido por amilosa y amilopectina, cuya proporción relativa, así como el peso molecular específico y la magnitud de los gránulos, determinan sus características fisicoquímicas y su potencialidad de aprovechamiento en determinados procesos industriales (García, 2015).

La mayor parte de los almidones se componen de 25% de amilosa y 75% de amilopectina, no obstante, en almidones modificados genéticamente la cantidad de amilopectina puede ser de hasta 99% y son llamados almidones cerosos, sin

embargo, los almidones con un elevado contenido de amilosa solo consiguen alcanzar entre 50 y 70% (García, 2015).

La amilosa se considera una estructura de tipo lineal, misma que puede enrollarse cada 7 unidades de glucosa, adquiriendo una forma helicoidal, la amilosa está unida por enlaces α -1,4 de unidades de glucosa (Badui, 2013). La naturaleza lineal de la amilosa y su capacidad de asociarse con ella misma, son las responsables del fenómeno de retrogradación rápida que sufre el almidón. La figura 5 muestra la estructura química de la amilosa. Gracias a su carácter lineal y enlaces, la amilosa es susceptible de conformar alcoholes complejos con moléculas hidrofóbicas como el yodo y ácidos grasos.

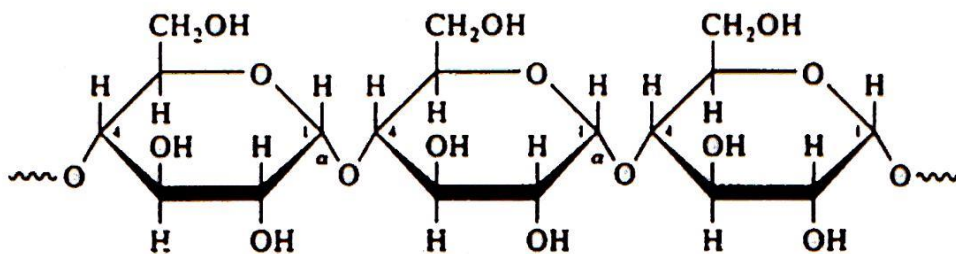


Figura 5. Estructura de la amilosa (Dombrink-Kurtzman, 1997).

La amilopectina está conformada por unidades de D-glucosa unidas por enlaces α -(1,4) estas presentan ramificaciones localizadas cada 15 a 25 unidades lineales de glucosa, de cadenas laterales que se encuentran unidas a la cadena central por enlaces α -(1,6) (Badui, 2013) (figura 6).

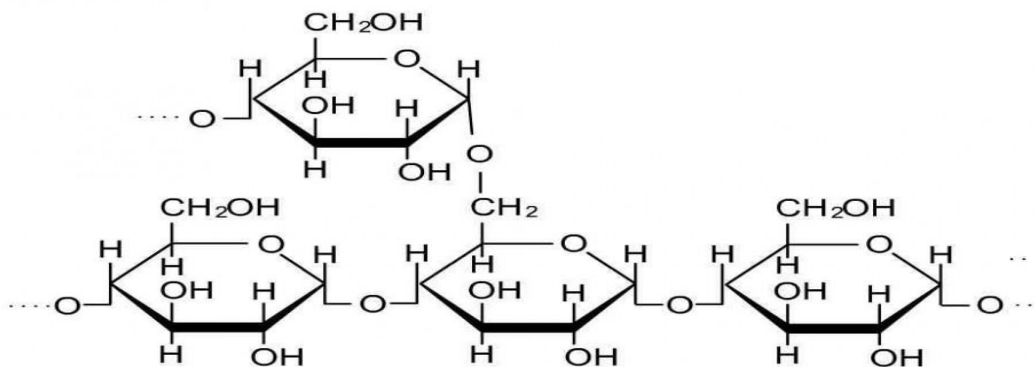


Figura 6. Estructura de la amilopectina (Dombrink-Kurtzman, 1997).

Tanto la amilosa como la amilopectina influyen de manera muy importante en las propiedades sensoriales y reológicas de los alimentos, principalmente mediante su capacidad de hidratación y gelatinización (Badui, 2013).

2.3.1.2 Plastificantes

Los plastificantes son definidos como sustancias estables, no volátiles, con elevado punto de ebullición, contribuyen al cambio de propiedades físicas y mecánicas de un material al ser adicionada a éste. La adición de un plastificante dentro de una película comestible permite que sea flexible, dócil y resistente (McHugh, 2000).

La adición de plastificantes en las películas comestibles contribuye a reducir las fuerzas intermoleculares en las cadenas poliméricas, mejorando la movilidad molecular de los elementos, debido a que los grupos polares (OH), desarrollan puentes de hidrógeno entre el polímero y el plastificante. La configuración, el tamaño molecular y el número de grupos hidroxilo del plastificante tienen la posibilidad de influir en las interacciones polímero-plastificante. Los plastificantes más conocidos son los polioles. Los polioles más importantes son el glicerol, sorbitol, propilenglicol, polietilenglicol 200 y polietilenglicol 400. La efectividad de un plastificante depende de tres propiedades importantes: forma, tamaño y compatibilidad con la matriz polimérica (Sothornvit y Krochta, 2001).

2.3.1.2.1 Glicerol

El glicerol, es un poliol que no presenta color ni olor, es soluble en agua, forma soluciones neutras y ha sido aprobado por la FDA para aplicarse en alimentos sin riesgo alguno. Su fórmula química es $C_3H_8O_3$ (figura 7) y su peso molecular es de 92.09 g/mol (Calderón, 2014).

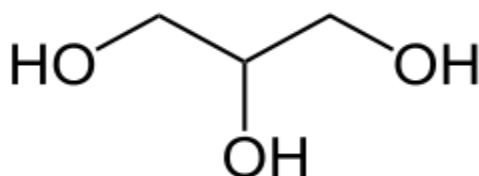


Figura 7. Estructura del glicerol (Calderón, 2014).

El glicerol es usado como plastificante y ha sido utilizado en la elaboración de recubrimientos y películas comestibles, se adiciona generalmente en concentraciones bajas, ya que, de lo contrario, influye negativamente en la permeabilidad de películas comestibles (Calderón, 2014).

2.3.1.3 Otros aditivos

Existen otros aditivos que se incorporan a las películas comestibles para mejorar sus propiedades tecnológicas, principalmente las relacionadas con la flexibilidad, elasticidad, uniformidad, etc, entre estos se encuentran agentes humectantes, antiadherentes o emulsionantes (Kramer, 2009). En este sentido los compuestos antiadherentes se incorporan a las películas o recubrimientos formados principalmente por almidón para volverlas menos pegajosas y de esta forma evitar que las películas y la superficie de los alimentos recubiertos se adhieran entre sí.

Los humectantes ayudan a mantener la película hidratada de forma que garantizan su elasticidad y su flexibilidad en condiciones ambientales con una humedad disminuida (Kramer, 2009).

Los emulsionantes son sustancias que se incorporan a la solución filmogénica para ayudar a la formación o estabilización de las emulsiones, principalmente en la elaboración de mezclas de biopolímeros de distinta naturaleza. Existen otros aditivos que se incorporan a las películas y recubrimientos comestibles para mejorar sus características sensoriales, nutricionales o funcionales de los alimentos, algunos ejemplos son los saborizantes, aromatizantes, colorantes, vitaminas, minerales, antimicrobianos, antioxidantes, compuestos bioactivos (Kramer, 2009).

También pueden añadirse probióticos que son microorganismos vivos que pueden incorporarse en la preparación de una diversidad de productos, incluyendo medicamentos, alimentos y suplementos dietéticos (Guarner *et al.*, 2011).

2.3.2 Métodos de elaboración de películas comestibles

Existen diversos procedimientos para la elaboración de películas comestibles a base de biopolímeros, entre los cuales se encuentra el método de vertido en placa o casting, aspersion, inmersión y extrusión. El método más conocido es el de vertido en placa, este consiste en colocar la solución filmogénica en recipientes (cajas Petri) dentro de un área nivelada, para que posteriormente se someta a un proceso de secado (Aguirre y Rocío, 2011). Sin embargo, a pesar de ser un método sencillo, existen ciertos parámetros que influyen en su formación, entre estos la temperatura y el tiempo de secado, debido a que influyen en la cristalinidad y características mecánicas de la película. Un secado rápido de soluciones filmogénicas disminuye las asociaciones intermoleculares dentro de la estructura de la película, debido a que la movilidad de las cadenas poliméricas se encuentra restringida cuando la cantidad del solvente disminuye (Aguirre y Rocío, 2011).

2.3.3 Uso de películas comestibles

Entre los usos más comunes de las películas comestibles en alimentos se encuentran: evitar la pérdida o ganancia de humedad debido a que se puede provocar modificación en su textura y turgencia de los alimentos, ayudan a retardan los cambios químicos y sensoriales del alimento como el aroma, el color, valor nutricional, entre otros, ya que actúan como una barrera contra el intercambio de gases, procesos que influyen en la estabilidad química y microbiológica, también ayudan a evitar el daño mecánico de los alimentos por manipulación (McHugh, 2000). La aplicación de películas comestibles también funciona como un microsistema que modifica las tasas metabólicas o de respiración, lo que genera una alternativa para la conservación de productos hortofrutícolas (Salinas *et al.*, 2015).

3. JUSTIFICACIÓN

El uso de bacterias ácido lácticas en la fermentación y conservación de alimentos ha jugado un papel importante para el desarrollo de la industria alimenticia, a lo largo de los años la incorporación de estos microorganismos ha sido generalmente en productos lácteos, donde han conferido diversos beneficios a los consumidores, sobre todo a nivel gastrointestinal.

Por otro lado, la industria de alimentos está buscando estrategias de aprovechamiento para los subproductos generados durante el procesamiento de los alimentos, siendo el suero de leche un subproducto derivado de la producción de queso, este contiene 20% del total de las proteínas de la leche, además de otros nutrientes. Recientemente, se ha considerado a este subproducto un material para la elaboración de películas o recubrimientos comestibles, debido al contenido de proteínas.

Las películas comestibles pueden actuar como una barrera mecánica al oxígeno y al agua, protegiendo a los alimentos del deterioro tanto físico, químico y microbiano. Por lo tanto, en este trabajo se buscó dar una aplicación al suero de leche fermentado por bacterias ácido lácticas, mediante la formación de una película comestible.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

- Elaborar películas comestibles a partir de suero de leche fermentado por bacterias ácido lácticas del género *Lactobacillus*.

4.2 Objetivos particulares

- Obtener y caracterizar suero de leche de queserías de la ciudad de Puebla.
- Generar el crecimiento de *Lactobacillus rhamnosus* y *Lactobacillus acidophilus* en suero de leche pasteurizado, cuantificar la población microbiana de *Lactobacillus*, así como algunos parámetros de crecimiento.
- Elaborar películas comestibles a partir de suero de leche fermentado por *Lactobacillus*.

5. DIAGRAMA DE TRABAJO

En la figura 8 se presenta el diagrama de trabajo que se llevó a cabo durante la investigación.

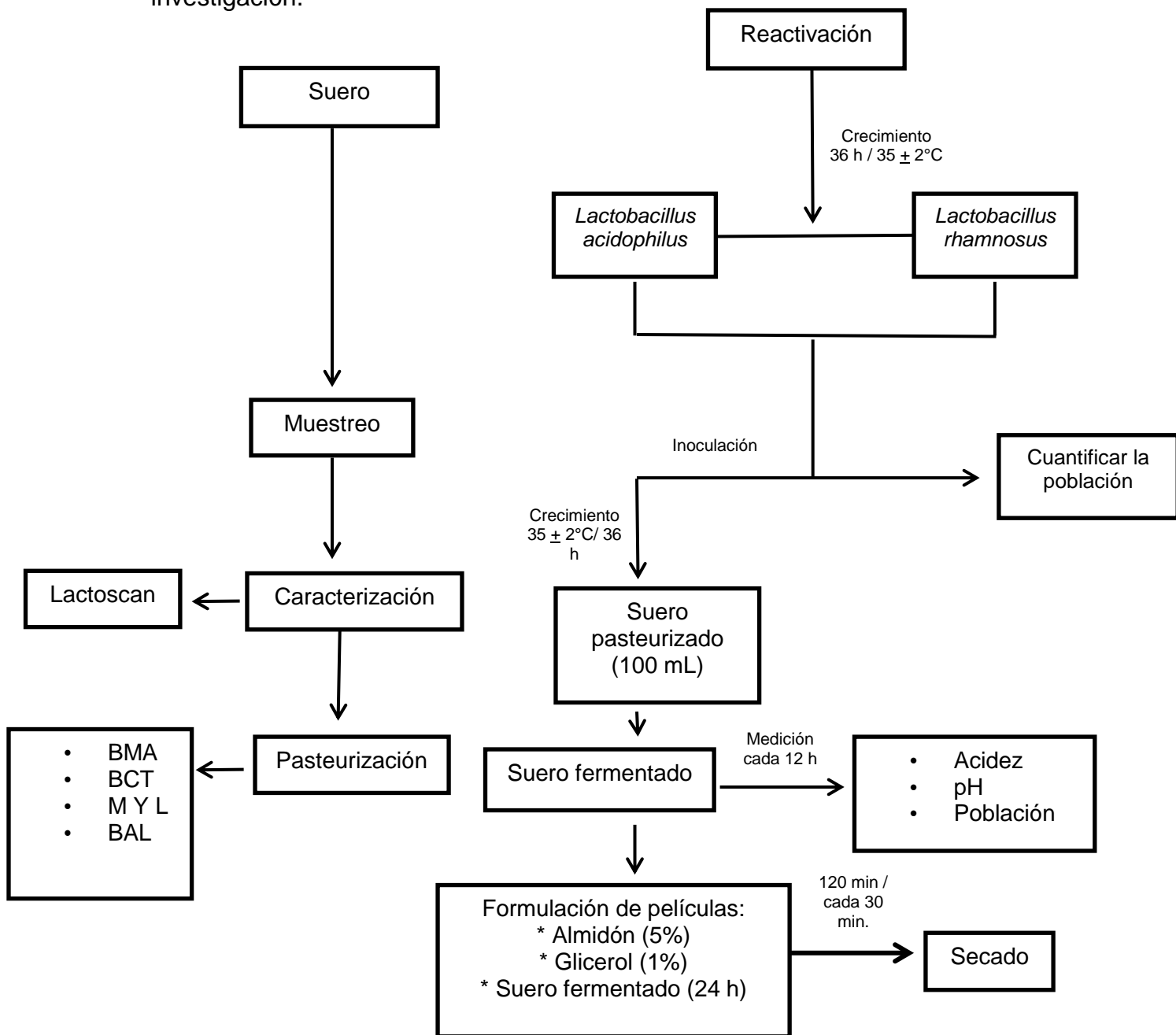


Figura 8. Diagrama de trabajo para la elaboración de películas comestibles a partir de suero de leche fermentado por bacterias ácido lácticas del género *Lactobacillus*.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

- Material de vidrio: el requerido para las determinaciones.
- Material biológico: cultivos de *Lactobacillus rhamnosus* y *Lactobacillus acidophilus* (cepas obtenidas del Laboratorio Bioquímica-Alimentos de la Facultad de Ciencias Químicas). Suero de leche.
- Reactivos: los requeridos para cada una de las determinaciones.

En la tabla 3 se muestra los equipos y métodos que se emplearon en este trabajo.

Tabla 3. Equipos empleados en la metodología.

Equipo	Marca	Modelo
Campana de flujo laminar vertical	Prendo	CFLV-102
Contador de colonias	SOL-BAT	Q-20
Analizador ultrasónico de leche	LACTOSCAN	S
Balanza analítica	Ohaus, serie Pioneer	PA 224C
Medidor de pH portátil	Conductronic	PH10
Baño de agua AquaBath	Barnstead Lab-Line	18005AQ
Parrilla digital	Fisher Scientific	Isotemp
Refrigerador	MABE	RMT510
Autoclave	CISA	AS-25
Incubadora orbital	Prendo	INO-650
Deshidratador	Excalibur	3526TCDB

Tabla 4. Métodos y referencias que se utilizaron.

Determinación	Método	Referencia
Pasteurización de suero	Pasteurización lenta	Frazier y Westhoff, 1993.
Cultivo de microorganismos	Método de vertido en placa	NOM-092-SSA1-1994.
Elaboración de películas	Vaciado en placa	Arévalo, 1996.

7. METODOLOGÍA

7.1 Reactivación de microorganismos

Se llevó a cabo la reactivación de las cepas de los microorganismos de interés (*Lactobacillus rhamnosus* y *Lactobacillus acidophilus*) en 100 mL de caldo MRS de marca comercial “Merck”, el caldo estéril fue inoculado con 100 μ L del microorganismo de interés, posteriormente se incubaron en una estufa de cultivo durante 36 h a una temperatura de $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$.

7.2 Obtención, análisis y tratamiento del suero de leche

Se obtuvo el suero de leche de queserías de la Ciudad de Puebla, al cual se le realizó la medición de pH, por inmersión directa del electrodo y se llevó a cabo su caracterización composicional en el analizador ultrasónico de leche LACTOSCAN, donde para su análisis el equipo aspiró una alícuota de leche y midió el contenido de grasa, lactosa, sólidos totales, proteínas y agua. Dependiendo la uniformidad de resultados, se seleccionó un solo tipo de suero.

Por otro lado, se realizó el proceso de pasteurización lenta, donde se colocó el suero de leche en un matraz Erlenmeyer, mismo que fue pasteurizado a 65°C durante 30 min. Al finalizar este proceso se dejó enfriar a temperatura ambiente y posteriormente se guardó en refrigeración hasta su uso.

7.3 Caracterización de microorganismos indicadores de la calidad en el suero de leche.

Al suero pasteurizado se le realizó la determinación de microorganismos indicadores de la calidad mediante la técnica de vertido en placa, se inocularon cuatro cajas Petri y cuatro duplicados con 100 μ L del suero pasteurizado. Se determinó la presencia de mohos y levaduras usando como medio de cultivo agar papa dextrosa acidificado con ácido tartárico, se incubaron las placas a $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 3 a 5 días. Se determinó la presencia de bacterias coliformes totales, empleando agar rojo violeta bilis y se incubaron a $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 24 h. Se

determinó la presencia de bacterias mesofílicas aerobias, empleando agar nutritivo e incubando las placas durante 48 h a $35 \pm 2^\circ\text{C}$. Finalmente, se determinó la presencia de bacterias ácido lácticas, empleando agar Man, Rogosa y Sharpe incubando las placas a $35 + 2^\circ\text{C}$ durante 48 h en condiciones anaerobias.

Finalizado el tiempo de incubación para cada grupo de microorganismos, se contabilizaron las colonias empleando un contador de colonias, y se reportó la población como unidades formadoras de colonia (UFC/mL).

7.4 Fermentación por bacterias ácido lácticas en suero de leche.

Se elaboraron dos sistemas con 100 mL de suero pasteurizado, se inocularon con 100 μL de cada uno de los microorganismos previamente reactivados, además se elaboró un tercer sistema sin adición de microorganismos, el cual se tomó como control.

A cada uno de los sistemas se les realizó un muestreo durante 36 h, cada 12 h se les midió la acidez, pH y población bacteriana siguiendo la metodología descrita en el apartado 7.3, únicamente en la siembra y conteo de bacterias ácido lácticas.

7.5 Parámetros de crecimiento

Las curvas de crecimiento fueron ajustadas con el modelo de Gompertz modificado (ecuación 1) donde N es la población microbiana al tiempo t , N_0 es la población microbiana inicial, A = crecimiento máximo ($\text{Log } N/N_0$), μ = velocidad de crecimiento máxima (1/h), λ = tiempo lag (h), e = exponencial.

$$\text{Log } (N/N_0) = A \exp \left\{ - \exp \left(\frac{\mu \cdot e}{A} (\lambda - t) + 1 \right) \right\} \quad \text{Ecuación 1}$$

7.6 Elaboración de películas

Una vez que los sueros fueron fermentados durante 24 h, a cada uno de los sistemas se les adicionó almidón al 5% y glicerol al 1%, ambos sistemas se mantuvieron en agitación hasta que las soluciones alcanzaron 68°C y se mantuvieron durante 5 min a esa temperatura, posteriormente se vertieron 7 mL en cajas Petri estériles y se dejaron secar en un deshidratador de alimentos a 50°C durante 120 minutos, donde cada 30 min se giraron las cajas para generar un secado uniforme.

7.7 Análisis estadístico

Todas las determinaciones se llevaron a cabo por duplicado, y cada experimento se realizó dos veces. Los datos se analizaron mediante el software de MINITAB 2016, se realizaron análisis de varianza (ANOVA) y pruebas de comparación de Tukey con nivel de confianza de $\alpha=0.05$. Los parámetros de crecimiento fueron obtenidos por regresión no lineal usando el software de KaleidaGraph 3.08.

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1 Caracterización de suero

Se analizó suero de 2 queserías de la ciudad de Puebla, sin embargo, se decidió solo trabajar con uno de ellos debido a que se presentó variabilidad en color y apariencia en uno de ellos.

La tabla 1 muestra la composición del suero lácteo usado en este estudio. Se observa que el agua fue el componente mayoritario, este valor es menor al reportado por Rocha y Guerra (2020), quienes mencionan que el suero de leche está compuesto de agua en un 95% y de sólidos en un 5%. Gran parte de la composición del suero depende de la leche y del tipo de proceso aplicado para la obtención de queso. En este sentido, la precipitación de la caseína puede producirse por fermentación o adición de ácidos orgánicos o minerales, generando un suero ácido (pH 5), mientras que, el suero dulce es obtenido mediante la adición de enzimas proteolíticas con un pH de 6 a 7. Lo que genera que la composición tanto de agua como de sólidos varíen en el suero. Por otro lado, el valor de pH del suero analizado lo clasifica como suero de leche dulce (Panesar *et al.*, 2006).

Otros de los componentes abundantes del suero de queso son sólidos totales, lactosa y proteína, en este trabajo el valor de sólidos totales y lactosa son similares a los reportados por Faría Reyes *et al.* (2002), quienes reportaron valores de 8.01 ± 1.46 y de 5.51 ± 0.92 , respectivamente, sin embargo, el valor de proteína de este trabajo es ligeramente mayor al reportado por Faría Reyes *et al.* (2002), siendo de 1.06 ± 0.33 para suero de queso fresco, valor que puede deberse probablemente al proceso aplicado para la obtención del suero.

Finalmente, el contenido de grasa del suero es similar al reportado por Faría Reyes *et al.* (2002) 1.04 ± 0.49 , este valor es aceptable debido a que el contenido en grasa del suero varía en función de la riqueza de la leche, la intensidad del trabajo mecánico antes y después de la coagulación, siendo deseable encontrar un bajo contenido graso en el mismo, pues su presencia en suero, junto con la de caseína, es reflejo de una disminución del rendimiento quesero (Weber, 1990).

Tabla 5. Caracterización del suero lácteo.

Parámetro	Valor
pH	6.43 ± 0.21
Grasa (%)	0.54 ± 0.21
Lactosa (%)	2.88 ± 0.22
Sólidos totales (%)	6.42 ± 0.49
Proteína (%)	3.04 ± 0.23
Agua (%)	35.34 ± 5.13

Por otro lado, los resultados de la caracterización de microorganismos indicadores de la calidad (Bacterias Mesófilas Aerobias, Bacterias Coliformes Totales y Mohos Levaduras) en el suero de leche y determinación de bacterias ácido lácticas, no presentaron ningún tipo de crecimiento, por lo que se puede comprobar que la pasteurización a 65°C durante 30 minutos fue optima, debido a que se logró eliminar toda la carga microbiana proveniente naturalmente del suero de leche.

8.2 Parámetros de crecimiento, acidez y pH de bacterias lácticas en suero de leche y caldo MRS

La figura 9 muestra los valores de pH generados por los microorganismos inoculados en suero de leche. Se observa que al tiempo 0, los sistemas tienen un pH similar y no presentaron diferencia significativa ($p > 0.05$), sin embargo, conforme aumento el tiempo de incubación, el valor de pH disminuyó ($p < 0.05$) en los sistemas inoculados con *Lactobacillus*, esto debido a la fermentación producida por las bacterias lácticas, mismas que utilizan lactosa para producir ácido láctico u otros metabolitos dependiendo su capacidad de fermentación (Pescumma, 2008).

Al final de la incubación (36 h) el microorganismo que generó un mayor descenso del pH fue *L. acidophilus* con pH de 4.19, debido probablemente a su metabolismo homofermentativo lo que indica mayor capacidad de fermentar

carbohidratos (Avall y Palva, 2005), además debido a su capacidad de disminución de pH *L. acidophilus* se usa como cultivo iniciador en muchos procesos de fermentación donde contribuye a otorgar olor, sabor y textura únicos (Soltan *et al.*, 2015).

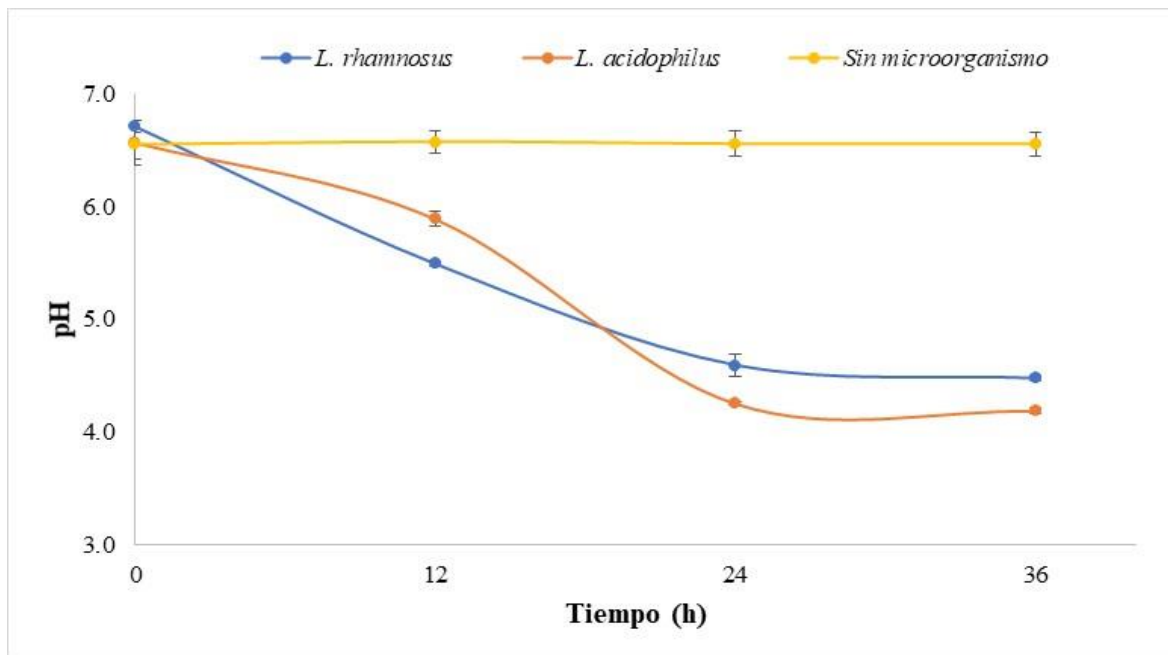


Figura 9. Valores de pH generados por bacterias lácticas inoculadas en suero de leche.

La figura 10 muestra los valores de pH generados por bacterias ácido lácticas (BAL) inoculadas en caldo MRS. El valor de pH tuvo un comportamiento similar al observado en los sistemas con suero de leche, en este caso *L. rhamnosus* presentó después de 36 h de incubación un valor de pH de 4.16, sin embargo, no hay diferencia significativa con *L. acidophilus* ($p > 0.05$). En este sentido, la mayoría de BAL fermentan carbohidratos simples como la glucosa, misma que forma parte del medio MRS.

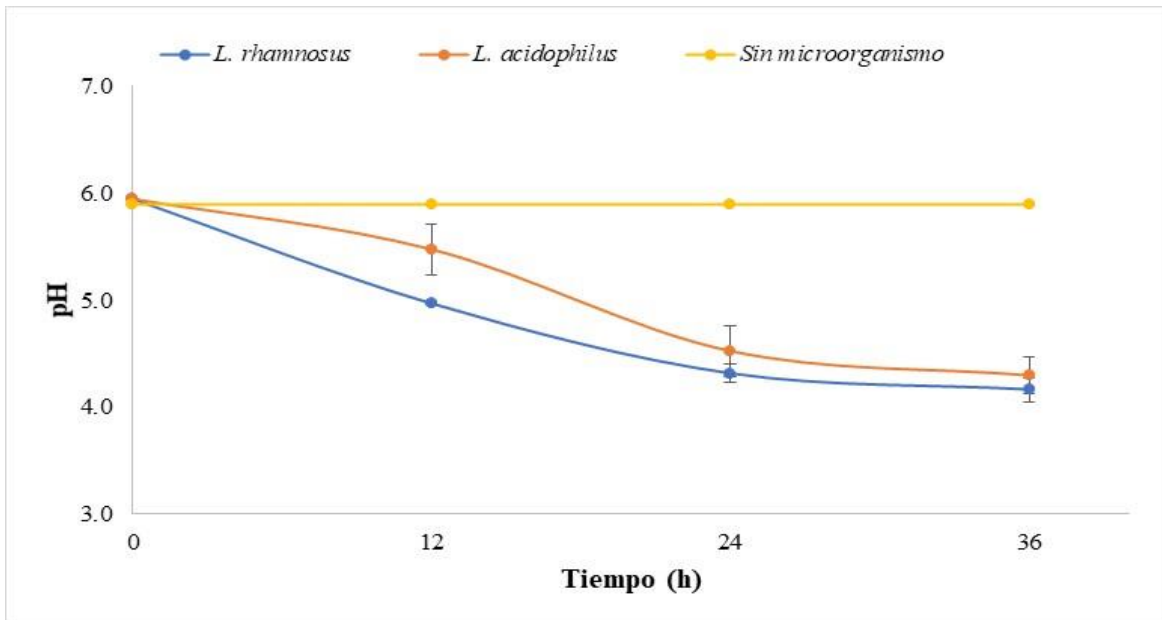


Figura 10. Valores de pH generados por bacterias lácticas inoculadas en caldo MRS.

El ácido láctico es un metabolito producido durante la fermentación por bacterias lácticas, recientemente ha sido clasificado como GRAS (Generalmente Reconocido como Seguro) (Vargas *et al.*, 2008). Las bacterias ácido lácticas se caracterizan por producir ácido láctico, sin embargo, también producen diferentes isómeros del ácido láctico mediante la fermentación de la glucosa (Carr *et al.*, 2002).

En las figuras 11 y 12 se presentan los valores de acidez expresada como % de ácido láctico en suero de leche y caldo MRS, respectivamente. Como era de esperarse el % de ácido láctico aumento respecto al tiempo de incubación, siendo mayor en el caldo MRS, probablemente a que contiene no solo carbohidratos sino sales inorgánicas como sulfatos, mismos que permiten la producción de metabolitos.

Además, se observa que en ambos sistemas *L. rhamnosus* obtuvo una mayor acidez (0.45% en suero de leche y 1.44% en MRS), esto puede deberse a que *L. rhamnosus* es considerado una bacteria heterofermentativa. Agudelo *et al.* (2015) mencionó que las bacterias pertenecientes al este grupo generan valores de

acidez de 0.34 a 0.90%, mientras que Jurado *et al.* (2016) mencionan que las BAL heterofermentativas generan % de acidez de 2.01 a 2.53% a las 24 h de incubación, el valor obtenido en este trabajo en el medio MRS es similar al reportado por Agudelo *et al.*, 2015. Sin embargo, cabe destacar que este parámetro está sujeto a factores como la temperatura y pH óptimos, los cuales influyen en los parámetros de crecimiento.

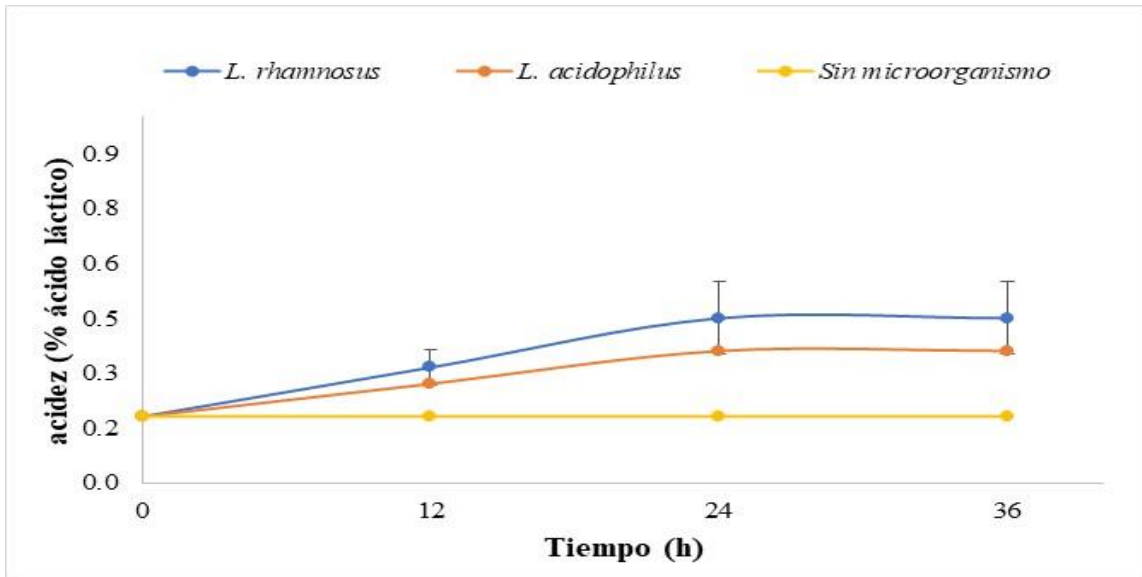


Figura 11. Acidez (% de ácido láctico) de bacterias lácticas inoculadas en suero de leche.

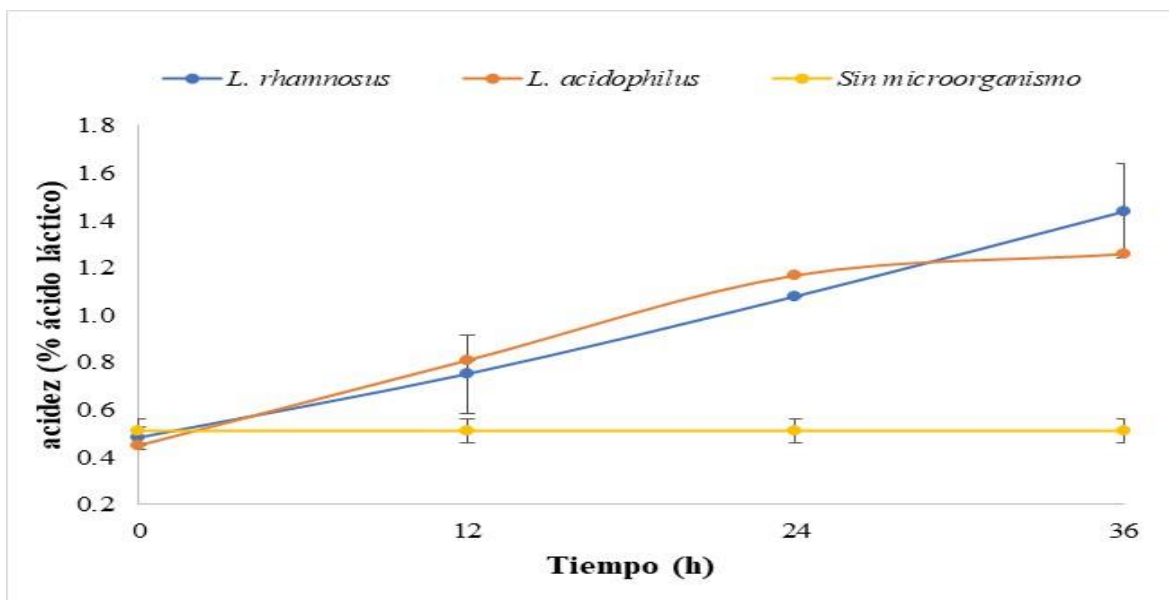


Figura 12. Acidez (% ácido láctico) de bacterias lácticas inoculadas en caldo MRS.

En la figura 13 y 14 se muestra el crecimiento de ambos *Lactobacillus* tanto en suero de leche como caldo MRS, respectivamente. Como se puede observar las BAL crecieron en todos los sistemas, logrando un máximo crecimiento a las 24 h. De acuerdo con lo reportado por Flores (2000), se pueden observar dos fases de crecimiento. Una primera fase que va desde las 0 hasta las 24 h, correspondiente a la fase exponencial en donde las células se reproducen sin limitación alguna de las sustancias nutritivas a una velocidad máxima, seguida de una fase estacionaria que para este trabajo abarco hasta las 36 h, en donde no se diferencia un aumento significativo en la densidad celular.

El crecimiento de BAL en suero de leche no mostró diferencia significativa ($p>0.05$) de las especies estudiadas, en cambio para el medio MRS, hay un mayor crecimiento por parte de *L. rhamnosus* ($p<0.05$) durante su incubación, en este sentido McFarland *et al.* (2018) mencionan que las especies de *Lactobacillus rhamnosus* y *acidophilus* son de las principales bacterias que se utilizan como probióticos en los lácteos, para los cuales la cuenta de células viables expresada como UFC no debe ser menor a 1×10^6 UFC/mL o g, población que permite generar beneficios para el consumidor. Los microorganismos evaluados en este trabajo presentan poblaciones por arriba de este valor. Montero-Lagunes *et al.* (2009), evaluó el crecimiento de 4 BAL en suero de leche de Veracruz, México, entre ellas *L. acidophilus*, *L. reuteri*, *L. casei* y *Bifidobacterium spp* durante 96 h, mencionando que las 4 cepas lograron un máximo crecimiento durante las 18 y 36 h (2×10^7 UFC/mL), en este trabajo las BAL evaluadas presentan 1 ciclo logarítmico por arriba del reportado.

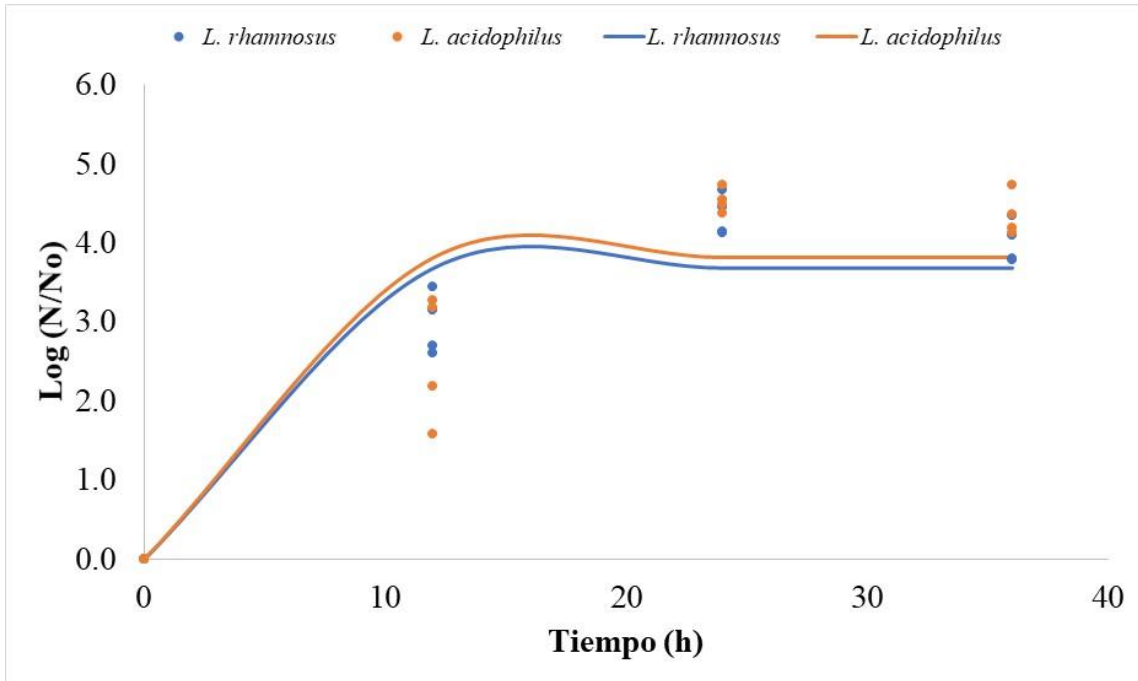


Figura 13. Crecimiento de bacterias lácticas inoculadas en suero de leche.

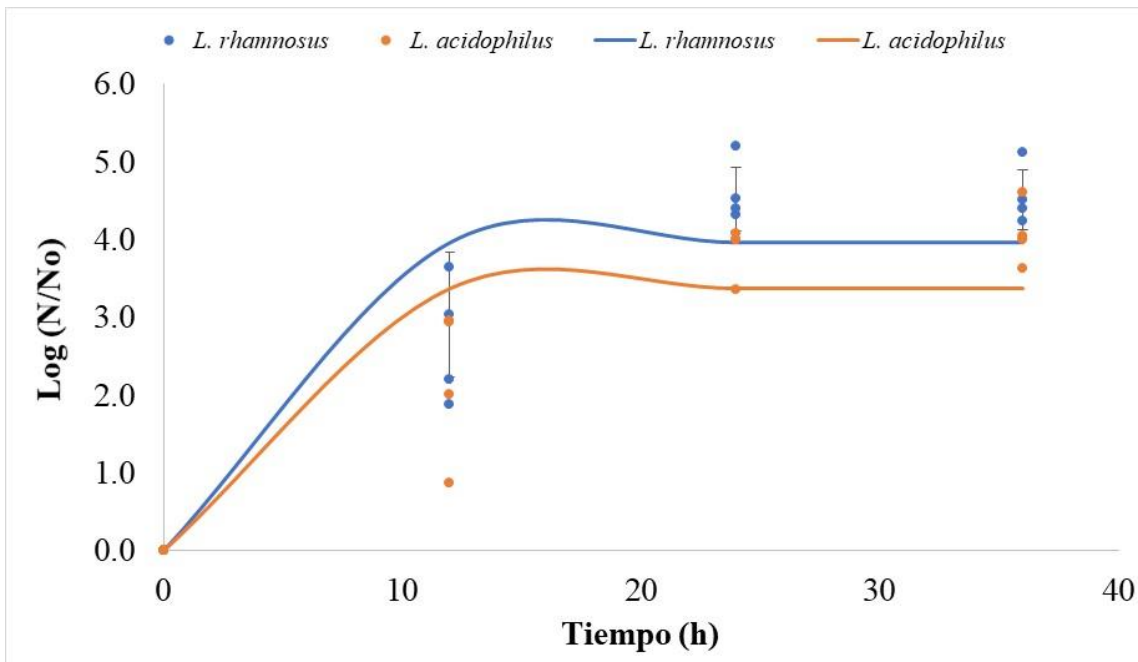


Figura 14. Crecimiento de bacterias lácticas inoculadas en caldo MRS.

8.3 Parámetros de crecimiento

La tabla 6 muestra los parámetros de crecimiento de *L. rhamnosus* y *L. acidophilus* en suero de leche y caldo MRS. Como se observa no hay diferencia significativa ($p>0.05$) de los parámetros determinados. Ambos microorganismos presentaron un crecimiento máximo entre 3.37 y 3.96 ciclos logarítmicos, la velocidad de crecimiento (μ) fue entre 7 y 8 h, además un corto tiempo de latencia (λ) fue observado (0.25 h), esto significa que ambos microorganismos lograron adaptarse tanto en suero de leche como en el medio MRS. Por lo que, el suero de leche resultó ser un buen medio de cultivo para el crecimiento de BAL del género *Lactobacillus*. Por otro lado, el modelo de Gompertz modificado generó un buen ajuste de los datos experimentales ($R^2>0.77$), generando información sobre los parámetros de crecimiento de *Lactobacillus* en medios de cultivo.

Tabla 6. Parámetros de crecimiento de *Lactobacillus* en suero de leche y medio MRS.

Medio de crecimiento	Microorganismo	A (Log N/No)	μ (1/h)	λ (h)	R ²
Suero de leche	<i>L. rhamnosus</i>	3.78 ± 0.24a	7.52 ± 0.24a	0.25 ± 0.01a	0.91
	<i>L. acidophilus</i>	3.81 ± 0.37a	7.55 ± 0.38a	0.25 ± 0.01a	0.80
Medio MRS	<i>L. rhamnosus</i>	3.96 ± 0.51a	7.69 ± 0.52a	0.26 ± 0.02a	0.82
	<i>L. acidophilus</i>	3.37 ± 0.51a	7.09 ± 0.54a	0.24 ± 0.02a	0.77

^aPromedio ± desviación estándar. Letras diferentes en columna indican diferencia estadística significativa ($p<0.05$).

8.4 Formación de películas a partir de suero de leche fermentado

Las películas comestibles hoy en día han ganado importancia, debido a que proporcionan una barrera protectora a los alimentos, mejorando su estabilidad y contribuyendo en la conservación de alimentos (Dash et al., 2019). En este trabajo se llevó a cabo la formación de películas comestibles a partir de suero de leche fermentado por *L. rhamnosus* y *L. acidophilus* (figura 15), las películas presentaron una apariencia elástica, delgada y un tanto opaca, debido a la coloración del suero de leche.

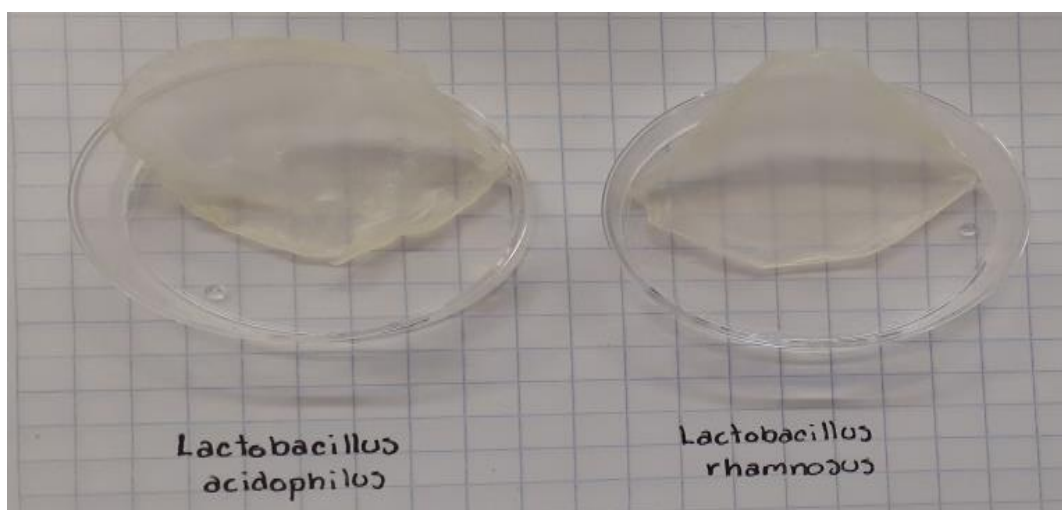


Figura 15. Películas comestibles a partir de suero de leche fermentado por *L. acidophilus* (izquierda) y *L. rhamnosus* (derecha).

Recientemente, se están evaluando la formulación de películas comestibles adicionadas con BAL y biopolímeros como polisacáridos, lípidos, proteínas y su combinación, sobre todo para otorgar mayores propiedades de barrera a los gases (Acosta et al., 2016). En este trabajo se utilizó almidón, que es un polisacárido, suero de leche que contenía 3% de proteína, glicerol y BAL, ingredientes que otorgaron características a la película obtenida (elasticidad y resistencia), a pesar de que las películas elaboradas únicamente con almidón o con un solo biopolímero muestran pobres propiedades de barrera y/o mecánicas (Acosta et al., 2016), en este trabajo la combinación de almidón y proteínas

provenientes del suero lograron una apariencia elástica, sin fragmentación o quebrantamiento, propiedades que también pueden atribuirse a la presencia de glicerol, en este sentido el glicerol es uno de los plastificantes más utilizados en la formación de películas, debido a su capacidad de formar enlaces proporcionando flexibilidad y elasticidad, además de disminuir las fuerzas intermoleculares a lo largo de la matriz (Chillo *et al.*, 2008). Finalmente, las BAL contribuyeron en la disminución del pH en el suero, factor necesario en la solución filmogénica formadora de película (Aguilar *et al.*, 2012). Finalmente, son necesarios más estudios para determinar la funcionalidad de los ingredientes utilizados en la elaboración de películas comestibles a partir de suero de leche.

10. CONCLUSIONES

- Se dio un aprovechamiento al suero de leche como medio de crecimiento de bacterias lácticas y como solución filmogénica para la formación de películas comestibles.
- Ambos *Lactobacillus* crecieron tanto en suero de leche como en el medio MRS, lo que indica que el suero es un medio de cultivo que se puede usar para el crecimiento de BAL.
- Los parámetros de crecimiento pH y población microbiana fueron similares en ambos medios de crecimiento (suero y caldo MRS), en cambio la acidez fue mayor en el medio MRS.
- Ambos microorganismos presentaron un crecimiento máximo de 4 ciclos logarítmicos, y un tiempo corto de latencia, logrando adaptarse tanto en suero de leche como en el medio MRS.
- El modelo de Gompertz modificado generó un adecuado ajuste de los datos experimentales ($R^2 > 0.77$)
- Se logró obtener películas comestibles a partir del suero fermentado por bacterias lácticas, con apariencia elástica y uniforme.

11.RECOMENDACIONES

- Evaluar la población de bacterias ácido lácticas en las películas comestibles elaboradas con suero de leche.
- Determinar propiedades mecánicas en la película para evaluar la eficacia de la formulación de la solución filmogénica.
- Realizar el almacenamiento de la película comestible a diferentes temperaturas para conocer la viabilidad de las bacterias lácticas.
- Realizar pruebas sensoriales a las películas elaboradas para determinar su aceptabilidad.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acosta, S., Chiralt, A., Santamarina, P., Rosello, J., González, C., Cháfer, M. (2016). Antifungal films based on starch-gelatin blend, containing essential oils. *Food Hydrocolloids*. 61:233–240.
- Agudelo, N., Torres, M., Álvarez, C. (2015). Bacteriocinas producidas por bacterias ácido lácticas y su aplicación en la industria de alimentos Universidad Pontificia Bolivariana. Medellín. Colombia.
- Aguilar, M., San Martín, E., Espinoza, N., Sánchez, M., Cruz, A., Ramírez, M. (2012). Caracterización y aplicación de películas a base de gelatina y carboximetilcelulosa para la preservación de frutos de guayaba. *Superficies y Vacío* 1:1-7.
- Aguirre, L., Rocío, Y. (2011) Efecto del ácido oleico sobre las propiedades de transferencia de masa de películas biodegradables de Quitosano.
- Arévalo, N.K. (1996). Elaboración de plásticos biodegradables a partir de polisacáridos y su estudio de biodegradación a nivel Laboratorio y campo. Tesis Doctoral Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Avall, S., Palva, A. (2005). *Lactobacillus* surface layers and their applications. *FEMS Microbiology Reviews*. 29:511-529.
- Axxelson, L. (1993). Lactic acid bacteria classification and physiology. Marcel Dekker.
- Ayivi, R.D., Gyawali, R., Krastanov, A., Aljaloud, O., Worku, M., Tahergorabi, R., Silva, R.C., Ibrahim, S.A. (2020). Lactic acid bacteria: Food Safety and Human Health Applications Dairy. 1:202-232.
- Azadnia, J.E., Vázquez, H., Ghasemi, S.A., Babaki, K.A., Jashni, K., Taarof, N. Castellanos. (2011). Isolation and identification of thermophilic *Lactobacillus* from traditional yoghurts of tribes of Kaserum. *Journal of Animal and Veterinary Advances*. 10:774-776.
- Badui, S. (2013). Química de los alimentos. México, Pearson Educación. 1:75-84.
- Bedolla, S. (2004). Introducción a la Tecnología de los Alimentos. Ed. Limusa. 1:78.

- Calderón, A. G. (2014). Propiedades físicas y bioactividad de películas biopoliméricas con agentes antimicrobianos producidos por bacterias ácido lácticas. Tesis de Maestría en Ciencia de Alimentos, ICAP-UAEH. México.
- CANILEC. Cámara Nacional de Industriales de la Leche. (2020). Estadísticas del sector lácteo 2010-2020. Disponible en: <https://www.canilec.org.mx/estadisticas-2/>. Consultado: Julio 2021
- Carr, F.J., Chill, D. Maida, N. (2002). The lactic acid bacteria: A literature survey. *Critical Reviews in Microbiology*. 28:281-370.
- Chillo, S., Flores, S., Mastromatteo, M., Conte, A., Gerschenson, L., Del Nobile, M.A. (2008). Influence of glycerol and chitosan on tapioca starch-based edible film properties. *Journal of Food Engineering*. 2:159–168.
- Dahall, R.K. (2013). Advances in edible coatings for fresh fruits and vegetables. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 53:435-450.
- Dash, K. K., Ali, N. A., Das, D., Mohanta, D. (2019). Thorough evaluation of sweet potato starch and lemon-waste pectin based-edible films with nano-titania inclusions for food packaging applications. *International Journal of Biological Macromolecules*. 139:449–458.
- Del Valle, V., Hernández, P., Guarda, A. (2005). Development of cactus-mucilage edible coating (*Opuntia ficus indica*) and its application to extend strawberry (*Fragaria ananassa*) shelf-life. *Food Chemistry*. 4:91-100.
- Díaz, O., Pereira, A. (2004). Functional properties of ovine whey protein concentrates produced by membrane technology after clarification of cheese manufacture by-products. *Journal Food Hydrocolloids*. 4:601-610.
- Dombrink-Kurtzman, M. (1997). A study of maize endosperm hardness in relation to amylose content and susceptibility to damage. *Cereal Chemistry*. 74: 776-780.
- Doyle, M. P., Beuchat, L.R., Montville, T.J. (1997). *Food Microbiology. Fundamentals and frontiers*. ASM Press, Washington D.C., U.S.A.
- Faría Reyes, J.F. García, A.C., Hernández, A. (2002). Efecto de la tecnología quesera sobre la composición del suero lácteo. *Multiciencias*. 2:126-130.

- Fernández, A.L., Mosquera, S.A., Velasco, R. (2014). Evaluación de propiedades mecánicas, ópticas y de barrera en películas activas de almidón. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*. 12:88-97.
- Flores, N. (2000) Elaboración de cultivos microbianos a partir de pasta de coco y su utilización para borregos en engorda. Tesis de grado para optar por el título Maestra en Ciencias pecuarias. Universidad de Colima.
- Frazier, W.C., Westhoff, D.C. (1993). *Microbiología de los alimentos*, 4^o edición, Ed. Acribia S.A., Zaragoza, España.
- García, A. (2015). Obtención de un polímero biodegradable a partir de almidón de maíz., Tesis de pregrado. Santa Tecla, San Salvador: Universidad Especializada en Ingeniería. 1:30-38.
- Gregirchak, N., Stabnikova, O., Stabnikov, V. (2020). Application of lactic acid bacteria for coating of wheat bread to protect it from microbial spoilage. *Plant Foods for Human Nutrition*. 75:223–229
- Goldstein, E.J.C., Tyrrell K.L., Citron, D.M. (2015). *Lactobacillus* species: taxonomic complexity and controversial susceptibilities. *Clinical Infectious Diseases*. 60:98-107.
- Gopal, P.K., Prasad, I., Smart, J.P., Gill, H.S. (2001). In vitro adherence properties of *Lactobacillus rhamnosus* DR20 and *Bifidobacterium lactis* DR10 strains and their antagonistic activity against an enterotoxigenic *Escherichia coli*. *International Journal of Food Microbiology*. 67:207–216.
- Guarner, F., Khan, A., Garisch, J., Eliakim, R., Gangl, A., Thomson, A., Krabshuis, J., Le Mair, T. (2011) Probióticos y Prebióticos. Organización Mundial de Gastroenterología. Guías prácticas.
- Guimarães, A., Ramos, O., Cerqueira, M., Venâncio, A., Abrunhosa, L. (2020). Active whey protein edible films and coatings incorporating *Lactobacillus buchneri* for *Penicillium nordicum* control in cheese. *Food and Bioprocess Technology*. 13:1074–1086.

- Gupta, R., Jeevaratnam, K., Fatima, A. (2018) Lactic acid bacteria: Probiotic characteristic, selection criteria, and its role in human health. *Journal of Emerging Technologies and Innovative Research*. 5:411–424.
- Hernández, V. (2007). Preparation of a whey-bases probiotic product with *Lactobacillus reuteri* and *Bifidobacterium bifidum*. *Journal Food Technology Biotechnological*. 1:27-31.
- Huertas, R. (2009). Lactosuero: importancia en la industria alimentaria. *Revista facultad nacional de agronomía*. 1:4967-4978.
- ICTA. (1995). Guía para producción de quesos.
- Jurado, H., Martínez, J., Morillo, J., Romero, D., Orbes, A., Mesías, L. (2016). Determinación de la cinética de fermentación en dos medios probióticos, pruebas de desempeño in vitro y efecto de inhibición de *Lactobacillus plantarum*. Grupo de investigación en Fisiología y Etología Animal y Procesos Biotecnológicos Aplicados a la Producción Animal - (FISE-PROBIOTEC), Pasto, Colombia.
- Kramer, M. (2009). Structure and function of starch-based edible films and coatings. *Edible films and coatings for food applications*. In K. C. Huber & M. E. Embuscado. 1:113-134.
- Liu, X., Chung, K., Yang, S., Yousef, A. (2005). Continuous nisin production in laboratory media and whey permeate by immobilized *Lactococcus lactis*. *Journal Process Biochemistry*. 40:13-24.
- McFarland, L., Evans, C., Goldstein, E. (2018). Strain-specificity and disease-specificity of probiotic efficacy: A systematic review and meta-analysis. *Frontiers in Medicine*. 1:124.
- McHugh, T.H. (2000). Protein-Lipid interactions in edible films and coatings. *Nahrung*. 44: 148-151.
- Narayanan, N., Roychoudhurg, P.K., Srivastava, A. (2004). Isolation of adh mutant of *Lactobacillus rhamnosus* for production of L (+) lactic acid. *Electronic Journal of Biotechnology*. 1:72-84.

- Montero, M., Juárez, F., García, H. (2009). Suero de leche fermentado con lactobacilos para la alimentación de becerros en el trópico. *Agrociencia*. 1:585-593.
- Nieto, M. (2009). Structure and function of polysaccharide gum-based edible films and coatings. Edible films and coatings for food applications. In: K.C. Huber & M. E. Embuscado. 1:57-112
- NOM-092-SSA1-1994, Bienes y servicios. método para la cuenta de bacterias aerobias en placa.
- Panesar, P.S., Panesar, R., Singh, R.S., Kennedy, J.F., Kumar, H. (2006). Microbial production, immobilization and applications of β -D-galactosidase. *Journal of Chemical Technology Biotechnoly*. 81: 530-543.
- Parra, H.R.A. (2009). Lactosuero: importancia en la industria de alimentos. *Revista Facultad Nacional de Agronomía-Medellín*. 62:4967-4982.
- Pescumma, M. (2008). Whey fermentation by thermophilic lactic acid bacteria: Evolution of carbohydrates and protein content. *Food Microbiology*. 1:442-451.
- Pintado, P. (2012). Elaboración de Manjar utilizando suero de quesería a diferentes niveles como sustituto de la leche en el cantón 159 Pastaza. Tesis de Grado previa a la obtención del título de Ingeniero Agroindustrial. Escuela de Ingeniería Agroindustrial. Universidad Estatal Amazónica. Pastaza, Ecuador.
- Prabhu, G., Keeton, J. (2008). Aplicaciones de productos de suero y lactosa en carnes procesadas. *Mundo Lácteo y Cárnico*. 1:18-25
- Quintero, C., Falguera, V., Muñoz, H. (2010). Películas y recubrimientos comestibles: importancia y tendencias recientes en la cadena hortofrutícola. *Revista Tumbaga*. 1:93-118.
- Rocha, J. M. y Guerra, A. (2020). On the valorization of lactose and its derivatives from cheese whey as a dairy industry byproduct: an overview. *European Food Research and Technology*. 246:2161-2174.
- Salinas, V.M., Trejo, M.A., Lira, A. (2015). Propiedades físicas, mecánicas y de barrera de películas comestibles a base de mucílago de nopal como

alternativa para la aplicación en frutos. Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha. 16:193-198.

- Salminen, S., Deighton, M.A., Benno, Y., Gorbach, S.L. (1998). Lactic acid bacteria in health and disease. Marcel Dekker, Inc. 1:211-253.
- Samaniego, F., Sosa del Castillo. R. (2006). *Lactobacillus spp.* Importantes promotores de actividad probiótica, antimicrobiana y bioconservadora. Centro de Estudios Biotecnológicos. Facultad de Agronomía. Universidad de matanzas “Camilo Cienfuegos”.
- Schrezenmeir, J., de Vrese, M. (2001). Probiotics, prebiotics, and synbiotics-approaching a definition. American Journal of Clinical Nutrition. 73:361-364.
- Soltan, D.M.M., Mojarrad, M., Baghbani, F., Raoofian, E., Mardaneh J., Salehipour, Z. (2015). Effects of probiotic *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* on colorectal tumor cells activity. Archives of Iranian Medicine: Home. 18:167-172.
- Sothornvit, R., Krochta, J.M. (2001). Plasticizer effect on mechanical properties of β -lactoglobulin films. Journal of Food Engineering. 50:149-155.
- Szajewska, H., Ruszczynski, M., Gieruszczak, D. (2007). *Lactobacillus GG* for treating acute diarrhea in children. A meta-analysis of randomized controlled trials. Aliment Pharmacol Ther. 25:177-84.
- Vargas, M., Pastor, C., Chiralt, A., McClements, D.J., González-Martínez, C. (2008). Recent advances in edible coatings for fresh and minimally processed fruits. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 48:496-511.
- Vázquez, S.S., Suárez, H., Zapata, S. (2009). Utilización de sustancias antimicrobianas producidas por bacterias ácido lácticas en la conservación de la carne. Revista Chilena de Nutrición. 36:64-71.
- Von, E. (2000). La proteína del lactosuero en la confitería. Industria alimenticia. 1:29-31.

- Walstra, P., Geurts, T., Noomen, A., Jellema, A. (2001) Ciencia de la leche y tecnología de los productos.
- Weber, F. (1990). El desuerado del coágulo. Ediciones Omega, S.A. Barcelona. 1:21-33.
- Zheng, J., Wittouck, S., Salvetti, E., Franz, C.M., Harris, H.M., Mattarelli, P., Watanabe, K.A. (2020). A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of Lactobacillaceae and Leuconostocaceae. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 70:2782–2858.