



INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TUXTLA GUTIÉRREZ

CARACTERIZACIÓN DEL CRECIMIENTO DE BACTERIAS PROBIÓTICAS EN ALIMENTOS FERMENTADOS ELABORADOS CON CEREALES

RESIDENCIA PROFESIONAL

PRESENTA:

ANDY JARENNI GÓMEZ VALDÉZ

ASESOR INTERNO

DR. MIGUEL ABUD ARCHILA

ASESOR EXTERNO

DRA. MADELEINE HIDALGO MORALES

TUXTLA GTZ, CHIAPAS.

JUNIO 2013

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	4
JUSTIFICACIÓN	5
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	6
FUNDAMENTO TEÓRICO	7
PROBIÓTICOS.....	7
BIFIDOBACTERIAS: CARACTERÍSTICAS	7
LACTOBACILLUS: CARACTERÍSTICAS.....	7
MECANISMOS DE ACCIÓN	8
REDUCCIÓN DE COLESTEROL.....	9
REGULACIÓN DEL TRANSITO INTESTINAL.....	9
ERRADICACIÓN DEL <i>H. pylori</i> (EFECTO GASTRO-PROTECTOR)	10
SISTEMA PROTEOLÍTICO DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS.....	10
VIABILIDAD E IDENTIDAD DE CEPAS DECLARADAS EN PRODUCTOS PROBIÓTICOS COMERCIALES.....	11
El desarrollo de tecnologías probióticas como los que se presentan en la tabla 1, ha permitido que los avances en la tecnología alimentaria sea más amplia, permitiendo el uso de otras materias primas como son los cereales para la realización de productos probióticos sin ser derivados lácteos, dando origen a una línea de productos para la sociedad.....	14
CEREALES	14
AMARANTO.....	15
CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL AMARANTO.....	15
MATERIALES Y METODOS	18
MATERIA PRIMA.....	18
CEPAS BACTERIANAS.....	18
ESTANDARIZACIÓN DEL INÓCULO.....	19
ESTANDARIZACIÓN DEL EXTRACTO DE AMARANTO REVENTADO.....	19
ESTANDARIZACION DEL EXTRACTO OBTENIDO A PARTIR DE AMARANTO EN POLVO ENVASADO.....	20
CARACTERIZACIÓN DEL CRECIMIENTO DE <i>L.reuteri</i> y <i>B. animalis</i> EN EXTRACTOS DE AMARANTO.....	20
CUANTIFICACIÓN DE GRUPOS AMINO LIBRES	20
RESULTADOS	22
CARACTERIZACIÓN DEL EXTRACTO DE AMARANTO.....	22

CARACTERIZACIÓN DEL CRECIMIENTO DE <i>B. animalis</i> y <i>L. reuteri</i> EN EXTRACTO DE AMARANTO.....	22
DETERMINACION DE pH y Acidez.	23
ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA DE <i>B. animalis</i> y <i>L. reuteri</i> DURANTE SU CRECIMIENTO EN EXTRACTOS DE AMARANTO	25
CONCLUSIONES	27
BIBLIOGRAFÍA	28
ANEXOS	30
ANEXO A: DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS POR EL MÉTODO DE BRADFORD	30
ANEXO B: DETERMINACIÓN DE GRUPOS AMINO LIBRES SOLUBLES EN TCA POR EL MÉTODO DEL ÁCIDO TRINITROBENCENSULFÓNICO (TNBS).....	30
ANEXO C: DETERMINACIÓN DE AZÚCARES TOTALES POR EL MÉTODO DE DUBOIS (FENOL/SULFÚRICO).	31
ANEXO D: CUANTIFICACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES	32

INTRODUCCIÓN

Tradicionalmente se ha utilizado la incorporación de bacterias ácido lácticas en la elaboración de alimentos fermentados, en la actualidad se cuenta con procesos bien establecidos en la industria alimentaria, los cuales son utilizados en la producción de diferentes tipos de leches fermentadas. Las principales especies utilizadas en la industria pertenecen al género *Lactobacillus* (L), como son *L. bulgáricus*, *L. acidophilus*, *L. casei*, y *L. reuteri*. Sin embargo, también se incluyen bacterias del género *Bifidobacterium*. La mayoría de dichas bacterias se clasifican dentro del grupo de los microorganismos probióticos, los cuales son definidos como “microorganismos vivos, que al ser administrados en cantidades adecuadas, confieren beneficios en el sabor, textura y aroma, mejorando también la conservación y el valor nutricional de los alimentos, confiriendo beneficios a la salud de los consumidores (Sanz, 2003).

Los productos lácteos fermentados forman parte de los alimentos básicos en la alimentación mundial, gracias al aporte nutrimental de estos ya que su fuente de elaboración es la leche. Sin embargo, algunos de los componentes de dichos productos pueden resultar de difícil digestión para cierta parte de la población como son los que presentan intolerancia a la lactosa, o alergia a las proteínas de la leche. Esto último realza la importancia de buscar nuevos vehículos o formulaciones que permitan una mejor distribución de bacterias probióticas en atención a la población que no puede ingerir alimentos de origen lácteo.

La elaboración de productos a base de cereales es de gran importancia hoy en día, ya que estos alimentos aportan gran porcentaje de proteínas y carbohidratos de fácil digestión, lo que hace sustituible algunos alimentos que existen en el mercado que provocan problemas digestivos, o bien en el futuro estos productos pueden ser la base de la alimentación una vez que se adicionen los nutrimentos necesarios para la producción de un alimentos nutrimentalmente completo.

El amaranto es uno de los cereales de gran contenido nutrimental, en especial de alto contenido amiláceo de 50 a 66% (Stone y Lorenz, 1984), y proteico del 12 al 22 % (Escudero et al., 2004; Segura-Nieto et al., 1992; Scilingo et al.,

2002). Por lo anterior el objetivo de este trabajo fue evaluar la capacidad de crecimiento de las bacterias probióticas, *Lactobacillus reuteri* y *Bifidobacterium animalis* en extractos de amaranto; como parte de un proyecto global enfocado a evaluar la posibilidad de obtener formulaciones de productos fermentados derivados de amaranto, con características sensoriales aceptables y principalmente aportando el beneficio de protección y crecimiento de la flora intestinal benéfica con diferentes cepas probióticas.

JUSTIFICACIÓN

Uno de los alimentos pertenecientes a la pirámide nutrimental es la LECHE y sus derivados fermentados, debido a su rico aporte en nutrimentos como proteínas, vitaminas, grasas y carbohidratos; sin embargo, los problemas de salud así como síndromes metabólicos reducen el consumo de productos lácteos.

Siendo la intolerancia a la lactosa el mayor problema registrado por el consumo de leche, casi el 70% de la población adulta del mundo son intolerantes a la lactosa la principal fuente de carbono en dicho alimento. En México, se estima que 1 de cada 3 adultos tienen esta condición. La intolerancia a la lactosa nos afecta más a los adultos que a los niños, debido a que la lactosa es una enzima inducible (Terrés, 2002). Por lo que es necesario recurrir al uso de otras fuentes alimentarias que puedan aportar los nutrimentos principales como proteínas y carbohidratos.

Los cereales son alimentos que se encuentran en el primer cuadro de la pirámide nutrimental ya que son ricos en proteínas y carbohidratos. El amaranto es uno de los pseudocereales más completos y de mayor producción en México (INCAP/OPS, 2002). Por lo que la caracterización del crecimiento de bacterias probióticas en extractos de amaranto resulta de interés como una nueva opción para la generación de alimentos fermentados con bacterias probióticas enfocados a los consumidores intolerantes a los productos lácteos y a la población en general para mejorar la salud intestinal y lograr los efectos benéficos en la salud en general que aportan las bacterias probióticas.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

Evaluar la capacidad de crecimiento de las bacterias probióticas, *Lactobacillus reuteri* y *Bifidobacterium animalis* en leche de amaranto.

OBJETIVO ESPECIFICO:

- Estandarizar el extracto de amaranto como medio de cultivo.
- Caracterizar el crecimiento de *Lactobacillus reuteri* y *Bifidobacterium animalis* en extracto de amaranto.
- Evaluar la actividad proteolítica durante el crecimiento de las bacterias probióticas en extracto de amaranto.

CARACTERIZACIÓN DEL ÁREA DONDE SE REALIZÓ EL PROYECTO

El proyecto se realizó en la UNIDAD DE INVESTIGACION Y DESARROLLO EN ALIMENTOS (**UNIDA**) haciendo uso de los LABORATORIOS DE MICROBIOLOGÍA, ENZIMOLOGÍA e INGENIERÍA DE ALIMENTOS.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Debido al aumento en los problemas de salud como obesidad y colesterol elevado, además de la mala digestión y asimilación de ciertos nutrimentos en productos alimenticios elaborados con leche, se propone como alternativa uno de los alimentos de mayor producción en nuestro país como es el amaranto, explotando sus principales componentes como carbohidratos y proteínas; siendo el punto de investigación la capacidad de crecimiento de bacterias probióticas en una bebida a base de amaranto, para conferir beneficios a la salud del consumidor, así como mejorar la distribución y consumo de alimentos probióticos.

ALCANCES Y LIMITACIONES

FUNDAMENTO TEÓRICO

PROBIÓTICOS

El término “probiótico” fue introducido por primera vez en 1965 por Lilly y Stillwell; a diferencia de los antibióticos, se definió al probiótico como aquel factor de origen microbiológico que estimula el crecimiento de otros organismos. En 1989, Roy Fuller enfatizó el requisito de viabilidad para los probióticos e introdujo la idea de que tienen un efecto beneficioso para el huésped. Los probióticos son microbios vivos que pueden incluirse en la preparación de una amplia gama de productos, incluyendo alimentos, medicamentos, y suplementos dietéticos. Las especies de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* son las más comúnmente usadas como probióticos (OMG, 2008).

BIFIDOBACTERIAS: CARACTERÍSTICAS

Se encuentran normalmente en el intestino humano y aparecen pocos días después del nacimiento. Son una de las especies predominantes en el colon junto con *Eubacterium*, *Clostridium* y *Bacteroides*. Producen enzima B-galactosidasa que mejora la intolerancia a la lactosa y son antagónicas con *E. coli* y *Shigella*, ya que modifican las condiciones de acidez y condicionan la formación de ácido láctico y acético. El aumento de la concentración de las bifidobacterias en la flora intestinal incrementa la conversión de carbohidratos a ácidos orgánicos (láctico y acético), estimula el peristaltismo del intestino y contribuye a regularizar el tránsito intestinal enlentecido (Lagnero, 2007).

LACTOBACILLUS: CARACTERÍSTICAS

Son bacterias ácido-lácticas, bacilos o cocos gram positivos. Son microorganismos anaerobios y/o tolerantes a condiciones aerobias. Pueden ser homo o heterofermentativos, según las características de su metabolismo fermentativo y mesofílicos o termofílicos, según las temperaturas óptimas de desarrollo. Otra característica es su capacidad de adherirse a las mucosas y producir sustancias bacteriostáticas y/o bactericidas (bacteriocinas) (Lagnero, 2007).

Las bacterias ácido lácticas (BAL), entre las que se encuentra la especie *Lactobacillus*, han sido utilizadas para la conservación de alimentos mediante fermentación durante miles de años; pueden ejercer una función doble, actuando como agentes fermentadores de alimentos, pudiendo además generar efectos benéficos a la salud. En términos estrictos, sin embargo, el término “probiótico” debe reservarse para los microbios vivos que han demostrado en estudios humanos controlados producir un beneficio a la salud. La fermentación de alimentos brinda perfiles de sabor característicos y reduce el pH, lo que impide la contaminación provocada por posibles patógenos. La fermentación se utiliza a nivel mundial para el mantenimiento de una gama de materiales agrícolas sin procesar (cereales, raíces, tubérculos, frutas y hortalizas, leche, carne, pescado etc.).

MECANISMOS DE ACCIÓN

Se han desarrollado diversas pruebas en animales y estudios *in vitro*, sin embargo, la eficacia de un probiótico seleccionado *in vitro* puede cambiar cuando es administrado al huésped por la gran influencia de factores más complejos como la ingestión selectiva. Riquelme *et al.* (2002) han demostrado que las cepas probióticas ejercen una acción protectora contra la adherencia, la colonización, la reproducción y la acción patógena de agentes enteropatógenos específicos, mediante distintos mecanismos de acción que aun no han sido completamente esclarecidos. No obstante, entre los mecanismos más significativos que se han propuesto destaca la privación a los agentes patógenos de los nutrientes específicos. Los nutrientes están presentes en cantidad limitada en el intestino; si las bacterias benéficas consumen estos nutrientes necesarios para el desarrollo de agentes patógenos, limitan su proliferación (Lagnero, 2007).

Los microorganismos probióticos compiten con los patógenos no solo por los nutrientes sino también por el espacio físico. Algunas bacterias pueden inhibir la adherencia de los agentes patógenos a los sitios receptores por un mecanismo de obstrucción estérica o de bloqueo específico del receptor, con lo que se produce una prevención de la colonización de microorganismos patógenos por inhibición competitiva en los lugares de adhesión. Por otro lado, los prebióticos estimulan la producción de numerosas sustancias

antimicrobianas específicas, como las bacteriocinas, ácidos grasos volátiles de cadena corta, peróxido de hidrogeno y ácido láctico, por lo que se reduce el pH luminal; este se considera el principal mecanismo por el cual las bacterias lácticas inhiben el crecimiento de diferentes bacterias patógenas como *E. coli*, *Streptococcus* y *Salmonella* (Amores, 2002).

REDUCCIÓN DE COLESTEROL

Los probióticos presentan la característica de aumentar la actividad de las hidrolasas de las sales biliares en el hígado, las cuales se unen al colesterol y ayudan a su eliminación, teniendo un efecto hipocolesterolémico (García, 2002), hay que tener en cuenta que es necesario la presencia del aditivo probiótico en la dieta de forma constante para lograr la acción hipocolesterolémica.

La administración de *Lactobacillus reuteri* (10^4 UFC/día) a ratones con hipocolesterolemia durante siete días disminuyó el colesterol total en un 38% originando concentraciones séricas de colesterol similares a las del grupo control. Esta dosis de *L. reuteri* causó una reducción de un 40% en los triglicéridos y un aumento del 20% en el cociente LDL/HDL, sin modificar la flora normal del bazo y el hígado (Amores, 2002).

REGULACIÓN DEL TRANSITO INTESTINAL

Ciertas bifidobacterias probióticas, entre ellas *Bifidobacterium animalis* promueven la producción de ácido acético y otros ácidos orgánicos que estimulan la peristalsis y regulan el tránsito intestinal. Varios estudios indican que esta cepa previene el desarrollo de lesiones preneoplásicas en modelos animales de tumor colónico y disminuye actividades enzimáticas procarcinogénicas (β -glucuronidasa) de la microbiota colónica, además, disminuye la proliferación de la línea celular tumoral intestinal humana y aumenta su diferenciación, dos parámetros celulares fuertemente asociados al proceso de tumorización. Estos estudios sugieren que el consumo de *B. lactis* podría ser un factor protector frente al desarrollo de cáncer colo-rectal en el ser humano. Por otra parte el consumo de *B. lactis* por dos semanas en voluntarios sanos disminuyó significativamente los niveles en saliva de *S.*

mutans, un patógeno implicado en el desarrollo de las caries dentales (Mundo Lacteo y carnico, 2009).

ERRADICACIÓN DEL *H. pylori* (EFECTO GASTRO-PROTECTOR)

El *Helicobacter pylori* es una bacteria gram negativa que coloniza la mucosa del estómago dando lugar a gastritis crónica y úlcera péptica y que está relacionada con el desarrollo de cáncer gástrico. Generalmente se adquiere en la infancia, siguiendo un modelo de transmisión fecal-oral, y persiste a lo largo de la vida. La infección por *Helicobacter pylori* constituye un problema sanitario de gran envergadura, dado el importante costo para los Servicios de Salud que acarrea la patología gastroduodenal relacionada con la infección. Se ha demostrado que *L. reuteri* posee una proteína en su superficie celular que inhibe la unión del *Helicobacter pylori* a los receptores de glicolípidos de membrana, lo que da lugar a una competencia por el receptor que impide la colonización por dicha bacteria (Mennickent y Green, 2009).

SISTEMA PROTEOLÍTICO DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS

Las bacterias ácido lácticas tienen un sistema eficiente para reducir grandes subunidades de caseínas a oligopéptidos o pequeñas cadenas de aminoácidos y proveer a las células con los aminoácidos necesarios para su crecimiento en leche.

Aunque las bacterias ácido lácticas varían considerablemente en su capacidad para degradar las proteínas de la leche, muchos organismos poseen sistemas similares. Para las bacterias ácido lácticas, la caseína es la principal fuente de nitrógeno.

El sistema proteolítico de las bacterias ácido lácticas se compone de tres pasos:

- El primer consiste en la proteólisis de la caseína por proteasas ligadas a la pared celular para formar una gran cantidad de péptidos
- En el segundo paso los péptidos son transportados dentro de la célula por uno de los sistemas de transporte de péptidos.
- Una vez dentro de la célula, los péptidos son degradados por un diverso grupo de peptidasas hasta formar aminoácidos libres, los cuales son

metabolizados o asimilados para formar proteínas (Decker, 2001) (Juillard, 1995) (Kranenburg, 2002).

Las bacterias heterolácticas son más importantes que las homolácticas desde el punto de vista de la producción de componentes de aroma y sabor, tales como acetaldehído y el diacetilo.

VIABILIDAD E IDENTIDAD DE CEPAS DECLARADAS EN PRODUCTOS PROBIÓTICOS COMERCIALES

La propia definición de probiótico exige el mantenimiento de la viabilidad de los microorganismos que lo integran durante todo el periodo de vida útil del producto, ya que esto condicionará su efectividad; si bien ciertas propiedades inmunológicas también se han atribuido a bacterias no viables. Aunque todavía existe poca información sobre las dosis y la frecuencia de consumo necesaria para garantizar la efectividad de estos productos, en general, se considera necesario que diariamente entre 10^9 y 10^{10} organismos viables alcancen el intestino delgado. Por ello, se sugiere que estos productos mantengan unos valores de microorganismos viables de 10^6 - 10^7 UFC/mL o g. De hecho, en Japón, la Asociación de Leches Fermentadas y Bebidas Lácteas, y en Suiza, el Organismo de Regulación Alimentaria, han establecido que los productos que contengan bifidobacterias deben presentar valores de entre 10^7 y 10^6 UFC/mL, respectivamente. Asimismo, la correcta identificación de las especies utilizadas y su correlación con las declaradas es otro aspecto que se debe exigir en cualquier producto probiótico. Esto requiere la aplicación no sólo de métodos microbiológicos convencionales de identificación, sino también de técnicas moleculares, ya que no siempre es sencillo resolver la posición taxonómica de las cepas probióticas; también es necesario garantizar la existencia de técnicas eficaces que permitan el seguimiento de las introducidas en el mercado.

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 indican 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. En

cuanto a las cepas declaradas, se observan incongruencias hasta en el 47% de los suplementos y en el 40% de los productos lácteos.

Por ejemplo, en ciertas preparaciones de probióticos liofilizados se han detectado diferencias entre las especies de los géneros *Bifidobacterium* y *Bacillus* declaradas y las detectadas en el producto del mercado, así como la presencia de otras no declaradas. (Y.Sanz, 2003)

En yogures y otras leches fermentadas, comercializadas en España, también se han realizado recientemente análisis de viabilidad de las bacterias lácticas empleadas en su elaboración durante el almacenamiento a 4 °C. Los principales microorganismos que participan en la fermentación de estos derivados lácteos pertenecen a los géneros *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* y *Streptococcus*.

En todos los casos, se ha puesto de manifiesto la presencia de valores de bacterias lácticas suficientemente elevados (10^7 - 10^8 UFC/ g) para garantizar su funcionalidad (Vinderola Y Reinheimer, 2000). Concretamente, en productos que contienen bifidobacterias y los iniciadores típicos de yogures (*L. delbrueckii* y *S. thermophilus*) se observa que la flora está integrada entre el 6 y el 10% por bifidobacterias (10^6 - 10^7 UFC/g), entre el 70 y el 90% por *Streptococcus* (10^7 - 10^8 UFC/g) y entre el 5 y el 10% por *Lactobacillus* (10^6 - 10^7 UFC/g). En yogures con fermentos convencionales, los estreptococos constituyen entre el 80 y el 90% (10^8 UFC/g), y los lactobacilos entre el 10 y el 20% (10^7 UFC/g). El recuento total disminuye gradualmente durante el periodo de almacenamiento, y en la fecha de caducidad las reducciones están en torno al 8 y el 15%, siendo más acusadas en productos en los que el pH es más bajo. Además, las pérdidas de viabilidad son mayores en bifidobacterias que en lactobacilos y estreptococos. Los valores finales permanecen por encima de 10^6 UFC/g o mL, aunque hay variaciones dependiendo del producto, de su tecnología y de las cepas empleadas. En la Tabla 1 se presentan diversos productos lácteos probióticos que hoy se encuentran en el mercado. No obstante, es importante establecer correctamente los tiempos de vida útil, respetar las fechas de caducidad y mantener las temperaturas de refrigeración para su correcta conservación (Sanz, 2003).

Tabla 1. Productos probióticos en el mercado actual en México

PRODUCTO ALIMENTACIÓN	PROBIÓTICO SIMBIÓTICO	CONCENTRACIÓN	EFFECTO PROBIOTICOFG
Actimel	<i>Lactobacillus casei defensis</i> DN 114001	10 ⁸ UFC/mL	<ul style="list-style-type: none"> • Ayuda a mejorar la respuesta inmunitaria. • Disminuye el tiempo de duración de diarreas. • Ayuda al equilibrio de la flora intestinal y favorece la absorción de nutrientes.
Yakult	<i>Lactobacillus casei Shirota</i> YIT9018	10 ⁸ UFC/mL	<ul style="list-style-type: none"> • Modulación de la flora intestinal. • Favorece la digestión de la lactosa. • Previene y trata constipación y diarrea • Controla la reproducción de las bacterias nocivas dentro del intestino.
Activia ActiRegularis	<i>Bifidobacterium animalis DN</i> 173010	10 ⁸ UFC/mL	<ul style="list-style-type: none"> • Ayuda al equilibrio de la flora, reduciendo el tiempo de tránsito intestinal.
Ser con Biopuritas	<i>Bifidobacterium animalis DN</i> 173010	10 ⁸ ufc/mL	<ul style="list-style-type: none"> • Contribuye al equilibrio de la flora intestinal, regularizando el tránsito intestinal.
BioGaia	<i>L. reuteri ATCC</i>		<ul style="list-style-type: none"> • Antidiarreico • Reconstituyente de la flora intestinal

El desarrollo de tecnologías probióticas como los que se presentan en la tabla 1, ha permitido que los avances en la tecnología alimentaria sea más amplia, permitiendo el uso de otras materias primas como son los cereales para la realización de productos probióticos sin ser derivados lácteos, dando origen a una línea de productos para la sociedad.

CEREALES

En los últimos años, la ciencia de la nutrición puso mayor énfasis en el estudio de la alimentación orientada a preservar la salud y prevenir enfermedades.

La mitad de las muertes en Occidente son producto de la aterosclerosis; sin embargo, hasta no hace mucho, la carne y los productos lácteos se consideraban la piedra angular de una alimentación correcta. Ahora sabemos que el tipo de grasa que se encuentra en los alimentos de origen animal es la responsable del aumento del colesterol, uno de los principales factores de riesgo cardiovascular reconocido.

Está demostrado que el consumo habitual de alimentos de origen vegetal: cereales, legumbres, frutas y verduras, protege al organismo influyendo positivamente sobre la salud y la longevidad. Los cereales han constituido la base de la alimentación humana desde que el hombre primitivo deja de ser recolector para ser productor de alimentos.

La familia de las gramíneas, a la cual pertenecen los cereales, es numerosa y prolífica, existen aproximadamente unas cinco mil especies. Los granos de los cereales se componen de dos partes: la cáscara, externa, y la semilla. La primera está formada casi exclusivamente por celulosa, no digerible por el organismo, pero que desempeña un importante papel en el normal funcionamiento y la evacuación del intestino. La semilla también se compone de dos partes: el germen o embrión, muy rico en vitaminas B, E y F, minerales, grasas y proteínas, y el endospermo integrado por una cubierta de aleurona, abundante en proteínas y grasas, y por las celdillas de almidón o fécula, que constituyen el 80% del grano. En las partes grasas se encuentra la leucina, cuya función consiste en mantener líquido el colesterol e impedir de este modo que se formen depósitos nocivos en las paredes de los vasos sanguíneos. La

fibra cruda o salvado, por ejemplo, a pesar de que no es digerible por nuestro organismo, tiene la capacidad de desempeñar funciones importantísimas. Permite, en primer lugar, aumentar el volumen de las heces, y con su acción ligeramente laxante, favorece el tránsito intestinal con ventajas notables: ayuda a resolver problemas de estreñimiento, limita el contacto de la masa fecal con las paredes del intestino, reduce el estancamiento de la masa fecal, impidiendo la fermentación que incrementa la posibilidad de producir inflamación, contribuye a la eliminación de colesterol, etc.. (Roman, 2004)

AMARANTO

CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL AMARANTO

El potencial nutritivo del grano de amaranto fue reconocido por culturas americanas como la Azteca, Inca y Maya. Era consumido por estas civilizaciones americanas juntamente con maíz y poroto. Sin embargo, por estar ligado a rituales religiosos fue prohibido por los españoles al conquistar América (Becerra, 2000). Esta situación se mantuvo durante siglos y la consecuencia fue la desaparición del mismo como fuente de alimentación en ciertas regiones. En las últimas décadas, no sólo se ha cultivado en México y América Central sino también se expandió por América Latina, Asia, Europa y algunos países de África.

Actualmente el principal productor es China con 150 mil hectáreas (has) cultivadas, seguida por India y Perú (1.800 has), México (900 has) y Estados Unidos (500 has) (Escudero et al., 2004).

El amaranto es un pseudocereal originario de América Central, muy común en la dieta de América precolombina. En las últimas décadas su cultivo despertó beneficio en varios continentes del mundo. Este beneficio fue y es motivado por el elevado potencial del amaranto como fuente de nutrientes.

El *Amaranthus spp.* como cultivo se originó en América. *A. cruentus*, *A. caudatus* y *A. hypochondriacus* son las tres especies domesticadas para utilizar su grano.

VALOR NUTRITIVO

1. Proteína

El amaranto posee entre 14 y 18 g de proteína –valor superior al de otros cereales (p.e. trigo: 10 á 15 g; arroz: 5 á 8 g). Las extraordinarias propiedades nutricionales y fisicoquímicas de la proteína del amaranto están bien documentadas. Su importancia no radica en la cantidad sino en la calidad de la misma con un excelente balance de aminoácidos (ante todo los esenciales). El amaranto se destaca por un contenido importante de lisina, aminoácido esencial en la alimentación humana, que comúnmente es más limitante en otros cereales.

Según la FAO (Food and Agricultural Organization / Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación) y la OMS (Organización Mundial de la Salud), sobre un valor protéico ideal de 100, el amaranto posee 75, la leche vacuna 72, la soja 68, el trigo 60 y el maíz 44.

Cuando se realizan mezclas de harina de amaranto con harina de maíz, la combinación resulta excelente, llegando a índices cercanos del 100, porque el aminoácido que es deficiente en uno abunda en el otro. Además, la digestibilidad de su grano es del 93%. A su vez, el grano de amaranto no posee gluten, por lo que es un alimento apto para celíacos.

2. Grasa

Ingerir ácidos grasos poli-insaturados (esenciales, entre ellos los ácidos grasos ω -3 y ω -6), para el ser humano es de interés vital porque nos proveen con energía, bajan el colesterol, inhiben la producción de coágulos de sangre y disminuyen el riesgo de enfermedades cardiovasculares –estudios recientes llegan a suponer que los ácidos grasos ω -3 sean capaces de proteger el organismo ante trastornos cardíacos. En 100 g del amaranto, de sus aproximadamente 8 a 9 g (arroz y trigo: de 0,5 a 2 g), alrededor del 70% de la grasa son ácidos grasos insaturados, en una combinación muy apropiada para la alimentación humana (arroz blanco y trigo: solo entre 2 y 10%).

3. Vitaminas

B1 (tiamina); juega un papel importante en el metabolismo de carbohidratos principalmente para producir energía, además de participar en el metabolismo de grasas, proteínas y ácidos nucleicos, ADN y ARN; es esencial para el crecimiento y desarrollo normal y ayuda a mantener el funcionamiento propio del corazón, sistema nervioso y digestivo) el amaranto contiene: alrededor de 0.8 mg (arroz: 0.4 mg; trigo: 0.4 a 0.5 mg). B9/B11 (ácido fólico); entre otras funciones necesario para la creación y división celular en general, y especialmente para la creación de los ADN; con esto es de suma importancia para los fetos durante el embarazo: Encontramos en el amaranto como 50 µg por 100 g (arroz: menos de 20 µg; trigo harina blanca: alrededor de 6 µg / harina integral: unos 30 µg).

4. Fibra

De este componente nutricional indispensable para el metabolismo y la digestión regular sana, y como protección contra muchas enfermedades, el amaranto nos brinda unos 14 hasta 15 g (arroz: 1 a 4 g; trigo: entre 4 y 12 g, otra vez en dependencia del tipo de la molienda).

5. Carbohidratos

Los carbohidratos del amaranto por su estructura tan fina, son muy fáciles de digerir, por lo que estos proveedores principales de energía para el cuerpo humano, al consumir éste productos de amaranto, rápido se ponen a nuestra disposición (criterio indispensable con el que debe cumplir un alimento para que pueda brindar beneficios a los deportistas, especialmente los de alto rendimiento, en su entrenamiento).

El componente principal en la semilla del amaranto es el almidón, representa entre 50 y 60% de su peso seco. El diámetro del gránulo de almidón oscila entre 1 y 3 micrones, mientras que los de maíz son hasta 10 veces más grandes y los de la papa pueden ser hasta 100 veces mayores. Estas reducidas dimensiones del gránulo de almidón del amaranto facilitan su digestión, que resulta de 2.4 a 5 veces más rápida que el almidón de maíz (INCAP/OPS, 2002).

MATERIALES Y METODOS

MATERIA PRIMA

La información proximal de las 3 materias primas utilizadas, se describe a continuación en las tablas 2, 3 y 4. obtenida de las tablas nutrimentales de los productos.

Tabla 2. Información nutrimental de leche entera por cada 250 mL

Proteínas	7.8 g
Carbohidratos	12 g
Grasas	1.2 g
Fibra dietética	0 g

Tabla 3. Información nutrimental de amaranto por cada 100 g de amaranto reventado

Proteínas	15.8 g
Grasas	6.2 g
Fibras	4.9 g
humedad	8 g

Tabla 4. Información nutrimental de producto envasado "Amaranth" por cada 100 gramos

Proteínas	12 g
Carbohidratos	74.1 g
Grasas	6.6 g
Fibra	3.2 g

CEPAS BACTERIANAS

La cepa *Bifidobacterium animalis* (BLCI CO5486IA) se adquirió a la empresa Lyofast en forma liofilizada. Se tomo una azada del liofilizado y se reactivo en 10 mL de caldo MRS, se incubó a 37°C por 6 horas .

La cepa *Lactobacillus reuteri* (NRRL B-14171) fue donada por el Agricultural Research Service del USDA, se tomó del stock que se encontraba en la

Unidad de Investigación y Desarrollo en Alimentos (UNIDA), en caldo MRS:Glicerol (50:50) en congelación y se reactivó en 10 mL de caldo MRS, se incubó a 37°C por 8 horas.

Una vez las cepas reactivadas en 10 mL de caldo MRS, se inoculó por estría cruzada en placas de agar MRS, las placas se dejaron incubar a 30 °C durante 12 h. A continuación las colonias seleccionadas fueron inoculadas en 10 mL de caldo MRS durante 8 h. De este cultivo se prepararon Stocks (Cultivo:glicerol 50:50) los cuales se guardaron en congelación y se sembró por estría sobre cuñas de agar MRS.

ESTANDARIZACIÓN DEL INÓCULO

Con un asa se tomó un inóculo del cultivo en cuña de agar MRS y se sembró en 10 mL de caldo MRS, posteriormente con este cultivo se inoculó un matraz con 50 mL de caldo (1% de inóculo). Para identificar el tiempo necesario para alcanzar el final de la fase exponencial, se realizaron cinéticas de crecimiento midiendo densidad óptica (DO) a 540 nm en un espectrofotómetro BIO-RAD Smartspec 3000 y unidades formadoras de colonias (UFC) por vaciado en placa con medio MRS. Las tomas de muestra se realizaron cada 2 horas.

ESTANDARIZACIÓN DEL EXTRACTO DE AMARANTO REVENTADO

Se utilizó amaranto reventado de una marca comercial, el cual fue molido en un molino "PULVEX" localizado en las instalaciones de la UNIDA, el producto molido fue pasado por un tamiz malla 60 con la finalidad de homogenizar las muestras y reducir el contenido de fibras gruesas en el extracto final.

La harina tamizada obtenida fue almacenada en un recipiente seco y protegida de la humedad.

Se procedió con la preparación del extracto mezclando 25 g de harina en 500 mL de agua purificada (1:20 p/v), la mezcla fue licuada durante 5 min para homogenizar.

La mezcla obtenida fue dejada en reposo durante 2 h, para que las partículas gruesas sedimenten, posteriormente fue decantada y filtrada para dar un mejor aspecto.

Posteriormente el extracto fue sometido a un proceso de esterilización a 121 °C y 15 lb/plg² de presión.

A estos extractos se les determinó el contenido de proteínas por el método de Bradford, azúcares reductores por el método del ácido 3,5 Dinitrosalicílico (DNS) (ANEXO D) y azúcares totales siguiendo el método de Dubois (fenol /sulfúrico) (ANEXO C) con el fin de conocer las propiedades y condiciones iniciales de las que se iniciará la fermentación en este medio.

ESTANDARIZACION DEL EXTRACTO OBTENIDO A PARTIR DE AMARANTO EN POLVO ENVASADO

La mezcla preparada a partir del polvo de amaranto “Amaranth EcoMil Instant” de la marca BIO ORGANIC se realizó agregando 25 g de harina en 500 mL de agua purificada (1:20 p/v), una vez preparada la mezcla fue licuada durante 5 min para homogenizar. Posteriormente la leche obtenida fue esterilizada a 121 °C y 25 lb/in² de presión.

CARACTERIZACIÓN DEL CRECIMIENTO DE *L.reuteri* y *B. animalis* EN EXTRACTOS DE AMARANTO

Para caracterizar el crecimiento de *L. reuteri* y *B. animalis* en extractos de amaranto, se tomaron alícuotas del inóculo estandarizado y se sembraron en 400 mL de extracto, considerando un volumen de inóculo del 1%. Se realizaron cinéticas de crecimiento a 37°C, evaluando la concentración celular por conteo en placas vertida de MRS, realizando 6 movimientos girados hacia la derecha, 6 hacia la izquierda, arriba y abajo, expresada en unidades formadoras de colonias (UFC/mL).

Se determinó el pH utilizando un potenciómetro Orion Mod.420A y la acidez titulable por el método de la AOAC (1990) utilizando una solución de hidróxido de sodio 0.1 N valorada, reportando acidez en g de ácido láctico/L.

CUANTIFICACIÓN DE GRUPOS AMINO LIBRES

Se evaluó la actividad proteolítica de los cultivos en los preparados de amaranto por medio de la liberación de los grupos amino libres solubles en ácido tricloroacético (TCA), utilizando el ácido trinitrobencensulfúrico (TNBS) de acuerdo al método McKellar (Anexo B). Esta determinación cuantifica grupos aminos libres y algunos péptidos. El TCA precipita las proteínas y los péptidos

más largos, y el TNBS reacciona con los grupos amino terminales presentes en la fracción soluble formando un cromóforo amarillo.

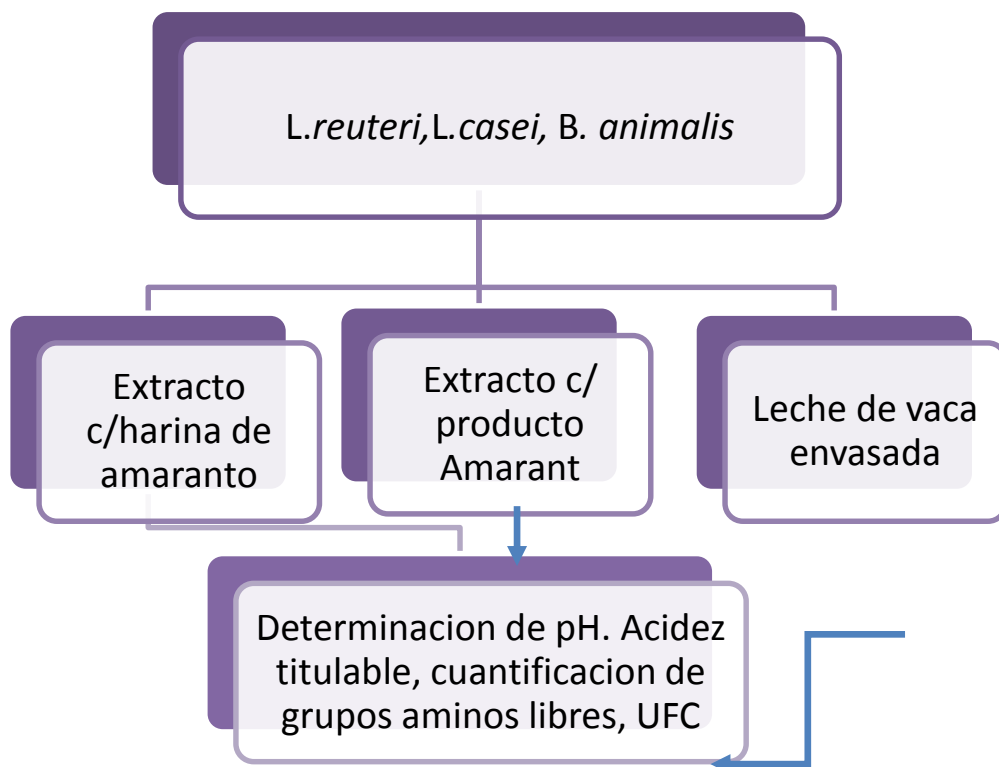


Figura 1. Diagrama de flujo de actividades.

RESULTADOS

CARACTERIZACIÓN DEL EXTRACTO DE AMARANTO

La composición compleja del extracto de amaranto formulado, originaron el análisis de azúcares reductores y totales de este, se obtuvieron concentraciones de 0.215 mg/mL y 4.506 mg/mL respectivamente. Estas concentraciones nos indican que el medio tiene fuentes de carbono como son los almidones del cereal son necesarios para el crecimiento microbioano. De igual forma la determinación de la concentración proteica se reporta en dos estados con y sin agitación presentando una concentración de 6.848 y 3.73 mg/mL respectivamente, teniendo como fuente de alimento, proteínas para su crecimiento, provocando poca disminución en su pH, en comparación con los otros medios usados que contienen un alto contenido de azúcares, esto debido al comportamiento del sistema metabólico de las cepas utilizadas en la asimilación de las distintas fuentes de alimentación presentes en este medio complejo, favoreciendo el desarrollo de características organolépticas como sabor y flavor. El aumento de la concentración de proteínas y/o de las fuentes de carbono inhibían el crecimiento de las unidades formadoras de colonias y no se obtenían una disminución en pH o aumento de acidez, indicando que a mayor concentración de sustratos se inhibía el crecimiento microbioano.

CARACTERIZACIÓN DEL CRECIMIENTO DE *B. animalis* y *L. reuteri* EN EXTRACTO DE AMARANTO

Se observó un crecimiento máximo de 10^7 y 10^8 con ambas cepas en los distintos medios de amaranto y de leche. Sin embargo, el mayor crecimiento se presentó con ambas cepas, *B. bacterium* y *L. reuteri*; en el medio a base de producto Amarant, llegando entre 4 y 6 horas a su crecimiento máximo como se observa en la figura 2. A una concentración de 10^8 , es importante mencionar que este crecimiento se logró gracias a que la composición de este producto presenta una concentración más alta de azúcares ya que contiene maltodextrinas de maíz y jarabe de maltosa, favoreciendo el crecimiento, pero

provoca una mayor disminución de pH produciendo la precipitación de las proteínas presentes en el medio, propiciando una apariencia desagradable.

En los medios de harina de amaranto, así como en leche entera se observó un crecimiento adecuado, a una concentración de 10^7 , concentración mínima para que el alimento tenga el efecto probiótico mencionado por Vinderola & Reinheimer (2000). La cepa de *B. animalis* presenta un mejor crecimiento en los medios utilizados, comparado con *L. reuteri*, siendo ambas bacterias heterolácticas. *Bifidobacterium* presenta una asimilación mejor de nutrientes que *L. reuteri*, aprovechando carbohidratos y proteínas como principal fuente de alimento, marcando la diferencia metabólica entre cada cepa.

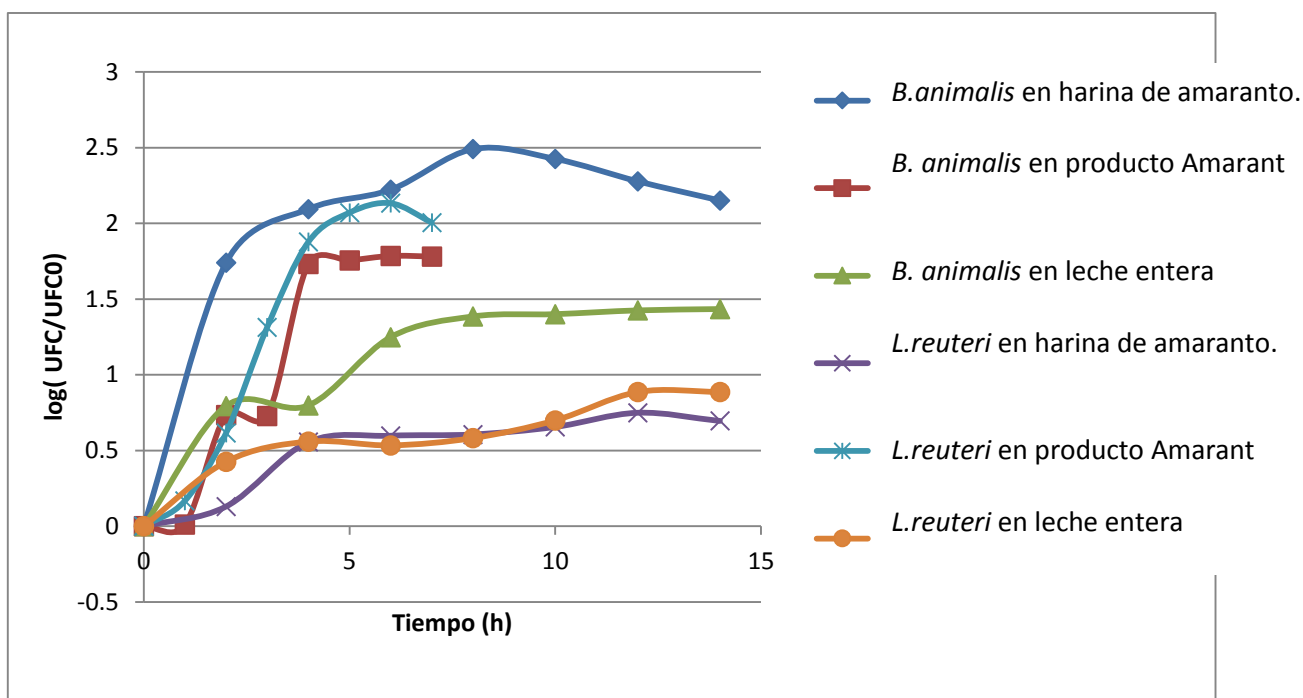


Figura 2. Log UFC/UFC₀ del crecimiento de diferentes microorganismos.

DETERMINACION DE pH y Acidez.

La variación de pH en ambas cepas con los medio de leche entera y extracto de amaranto fue muy poca, esto se debe a que la leche entera posee una alta capacidad amortiguadora debido a la presencia de fosfatos solubles, bicarbonatos y caseínas presentes reporta McCarthy & Sing en el 2009, el bajo pH que se reporta en la fermentación con el producto Amarant se debe principalmente a la alta concentración de diversos azucares presentes (maltodextrinas de maíz y almidones)

A pesar de la mínima variación de acidez en las distintas fermentación se observa una mayor presencia de ácido láctico en el crecimiento con leche entera, esto se debe a que el azúcar que contiene, la lactosa; se oxida produciendo principalmente ácido láctico, también atribuyéndole a las caseínas parte de la acidificación.

En el caso de las fermentaciones realizadas con los medios a base de amaranto se observa en la figura 4 el incremento y variación de ácido láctico es mínima, es importante recordar que las bacterias heterofermentativas son capaces de producir diversos ácidos orgánicos aparte del ácido láctico, haciendo uso de las diversas fuentes nutricio del medio de cultivo, dependiendo del tipo de metabolismo que las bacterias presente, en este caso de las proteínas presentes en el medio del pseudocereal, por lo que la formación de ácido láctico es poca, pero no se descarta la producción de otros ácidos orgánicos.

Lo citado por Mc Carthy & Sing en 2009; Los valores altos en acidez natural son indicadores de leches ricas en proteínas o de otros constituyentes con capacidad buffer, explica el por qué la leche entera presenta EL MINIMO CAMBIO EN SU pH pero alta concentración de ácido láctico (3 g/L), por arriba de lo que indica la norma NOM-155-SCFI-2003 ;LECHE, FORMULA LACTEA Y PRODUCTO LACTEO COMBINADO- DENOMINACIONES, ESPECIFICACIONES FISICOQUIMICAS, INFORMACION COMERCIAL Y METODOS DE PRUEBA indicando que la concentración máxima de ácido láctico presente en el producto es de 1.7 g/L.

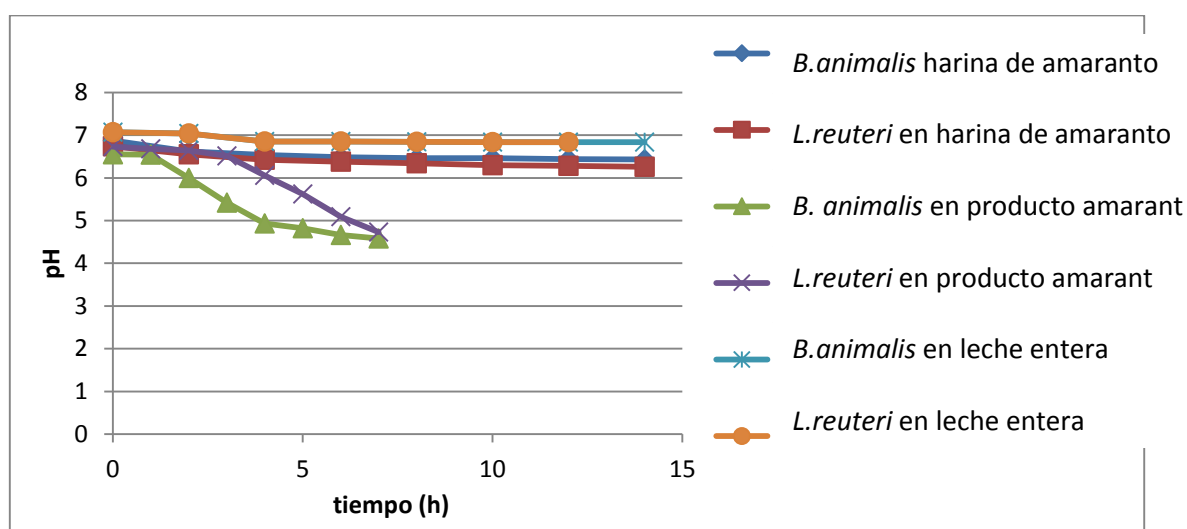


Figura 3: cinéticas de pH durante el crecimiento de diferentes microorganismos en los diferentes medios de cultivo probados.

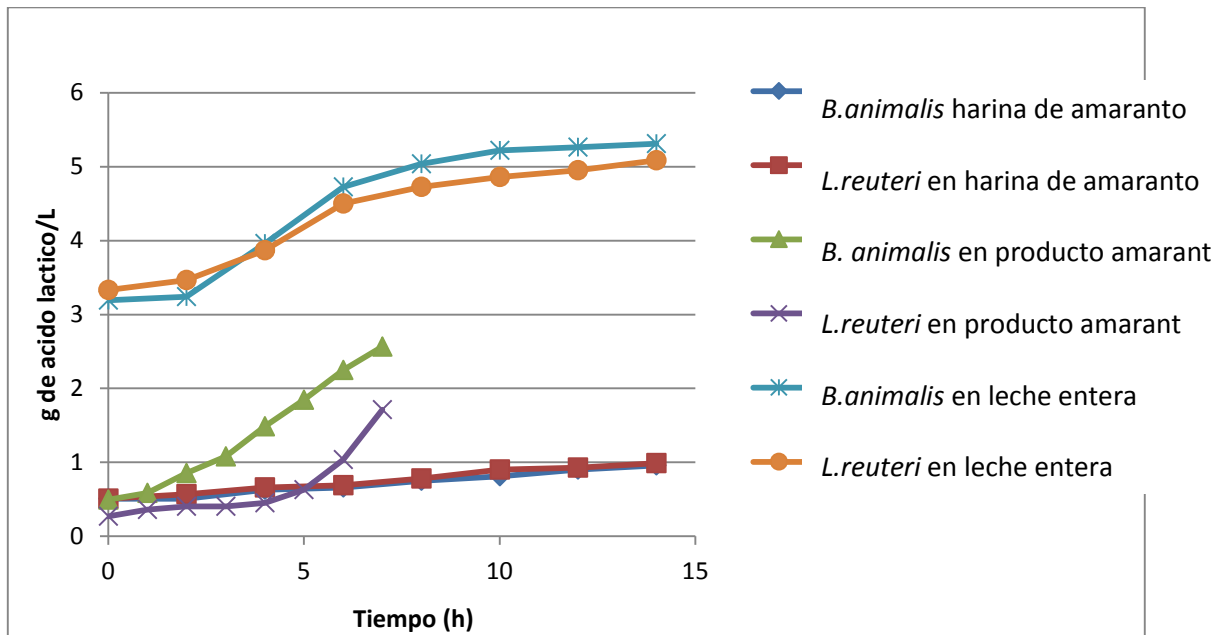


Figura 4. Acidez del medio durante la fermentación de los diferentes microorganismos en diferentes medios de cultivo.

ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA DE *B. animalis* y *L. reuteri* DURANTE SU CRECIMIENTO EN EXTRACTOS DE AMARANTO

En la figura 5 se observa la cuantificación de los grupos amino libres durante las cinéticas de crecimiento realizadas en los distintos medios, en la cual se aprecia hay una mayor degradación de proteínas en los medios de harina de amaranto y leche entera con las dos cepas. Esto se debe a que la cantidad de proteínas disponibles es mayor en esos dos medios y la cantidad de fuente de carbono es mayor, por lo que la cantidad de grupos amino liberado es mayor; caso contrario sucede en el medio elaborado con el producto Amarant, ya que se compone en una mayor cantidad de azúcares, reduciendo la concentración de las propiedades nutricionales del cereal, provocando que las bacterias, consuman principalmente estos azúcares y no las proteínas u otros

componentes presentes en los medios. La reducción de subunidades de proteínas a pequeñas cantidades de aminoácidos varían considerablemente ya que, ambas cepas siendo bacterias ácido lácticas difieren considerablemente en su sistema proteolítico, debido a la genética de cada microorganismo. Decker (2001), Kranenburg (2002) y Juillard (1995).

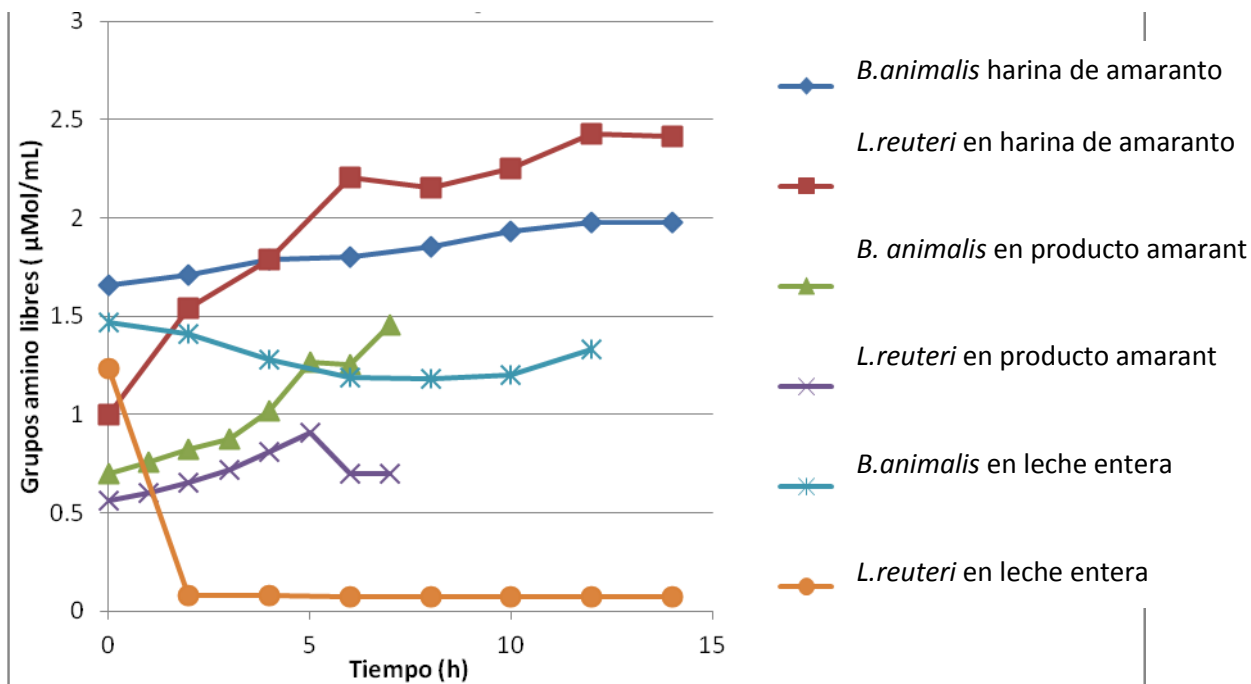


Figura 5: Grupos amino libres durante la fermentación de diferentes microorganismos en diferentes medios de cultivo

CONCLUSIONES

- Las unidades formadoras de colonias obtenidas en todas las cinéticas realizadas llegaron a una concentración de 10^7 y 10^8 UFC/mL. En el extracto elaborado con harina de amaranto se obtuvo la concentración menor, que fue de 10^7 UFC/mL. Sin embargo, todas las concentraciones celulares alcanzadas cumplen con la concentración necesaria para tener un efecto probiótico.
- En los medios a base de harina de amaranto *B. animalis* y *L. reuteri* presentan una mayor actividad proteolítica, similar a la observada en leche entera. Probablemente el alto contenido de azúcares presentes en el producto Amarant favorece la acidificación acelerada del medio, lo que provoca la precipitación de proteínas y un menor desarrollo de proteólisis. Lo anterior debe corroborarse haciendo un análisis de azúcares reductores en el extracto elaborado con este producto.
- El uso de harina de amaranto como base para formular un producto probiótico, es viable. Ya que se alcanzan las concentraciones celulares adecuadas en ambas cepas y se obtienen valores de pH y acidez aceptables para un alimento probiótico.

BIBLIOGRAFÍA

Amores, A. C. (2002). PROBIOTICOS. *Sociedad Española de Quimioterapia* , 131-139.

Bradford, M. M. (1976). a rapid and sensitive Method for the Quantitation of microgram, Quatities of protein utilizing the principle of protein-Dye Binding. *Reproduccion Research Laboratores Department of Biochemistry* .

Becerra R., 2000. El amaranto; nuevas tecnologías para un antiguo cultivo. *CONABIO. Biodiversitas* 30: 1-6.

Decker, M. (2001). *Applied Dairy Microbiology*. Elemar H. Morth.

Dubois, M., Gilles, K., Hamilton, J., & Fred, P. r. (1956). Colorimetric Method for Determination of Sugars. *Analytical chemistry* , 350-356.

Escudero, N.L.; Arellano, M.L.; Luco, J.M.; Gimenez, M.S. y Mucciarelli, S.I. 2004. Comparison of the chemical composition and nutritional value of Amaranth cruentus flour and its protein concentrate. *Plant Food for Human Nutrition* 59: 15-21.

INCAP/OPS, I. d. (2002). *Contenido Actalizados de Ntricion y Alimentacion*. Centro America y Panamá.

Juillard, e. a. (1995). Oligopeptids are the main source of nitrogen for lactococcus lactis during grownth in milk. *Applied and Environmental Microbiology* .

Kranenburg. (2002). flavor formation from amino acid by lactic acid bacteria. *International Dairy Journal* , 111-121.

Lagnero, E. A. (2007). Alimentos funcionales: Fibra, Prebioticos, Probioticos y Simbioticos. *DIAETA* .

Mc Kellar, R. (s.f.). development of off-favors in Ultra High Temperature ans pasteurized milk as a function of proteolysis. *Food research Institute* , 1981.

Mennickent, S., & Green, K. (2009). Probioticos y su utilidad terapeutica. *Ciencia Ahora* , 31-37.

Mundo Lacteo y carnico. (2009). Lacteos Funcionales: Haciendo mas facil una sana alimentacion. *Mundo lacteo y carnico* , 5-11.

NORMA OFICIAL MEXICANA. (2003). *NOM-155-SCFI-2003 LECHE, FORMULA LACTEA Y PRODUCTO LACTEO*. MEXICO.

Riquelme., K., M., K., Vlieg, J., & Smith, A. (2002). flavor formation from amino acid by lactic acid bacteria. *International Dairy Journal* , 111-121.

Roman, M. (2004). *Tecnología de los cereales*. Granada, España.

Scilingo, A.A.; Ortiz, S.E.M.; Martínez, E.S.; Añón, M.C. 2002. Amaranth protein isolates modified by hydrolytic and thermal treatments. Relationship between structure and solubility. *Food Research International* 35: 855-862.

Segura-Nieto, M.; Vázquez-Sánchez, N.; Rubio-Velázquez, H.; Olguin-Martinez O.;Rodriguez-Nester, C.E.; Herrera-Estrella, L. 1992. Characterization of Amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) seed proteins. *J. Agric. Food Chem.* 40:1553-1558.

Stone L. A. Lorenz, K. 1984. The starch of amaranth. Physicochemical properties and Functional characteristics. *Starch/Stärke*, 36, 232-237.

Terrés, E. a. (2002). Enfermedad diarreica e intolerancia a la lactosa. *Intolerancia Alimentaria* , 329-341.

Vinderola, C., & Reinheimer, J. (2000). Enumeration of *L. casei* in presence of *L. acidophilus*, *Bifidobacteria* and *Lactis bacteria* in fermented dairy products international. *Dairy Journal* , 271-275.

Y.Sanz, e. a. (2003). Probióticos:criterios de calidad y orientaciones para el consumo. *Nutricion Infantil* .

ANEXOS

ANEXO A: DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS POR EL MÉTODO DE BRADFORD

Se toman 50 μL de muestra al cual se le agregan 450 μL de una solución de NaCl, para terminar se le adicionan 500 μL del reactivo de Bradford, se deja incubar durante 5 min a temperatura ambiente. (Bradford, 1976)

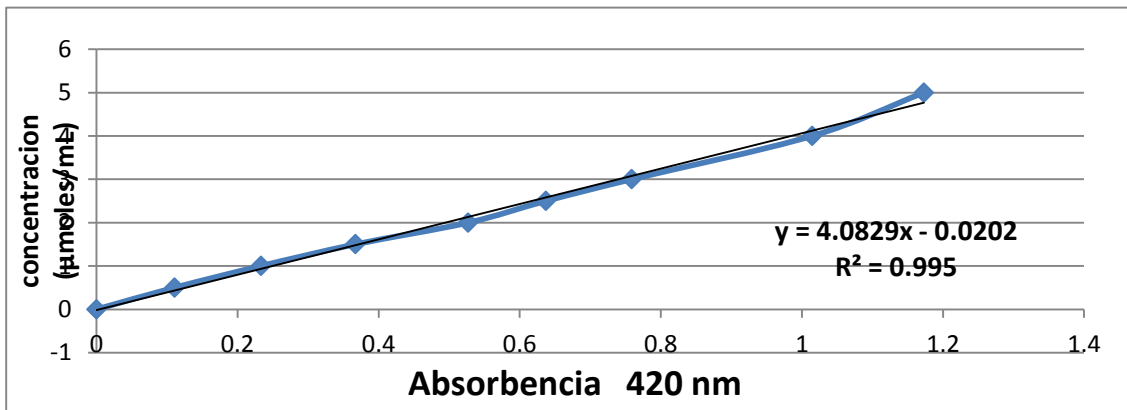
Las muestras se leen en el espectrofotómetro a 595 nm.

FÓRMULA PARA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS

$$Y = 34.763 X$$

ANEXO B: DETERMINACIÓN DE GRUPOS AMINO LIBRES SOLUBLES EN TCA POR EL MÉTODO DEL ÁCIDO TRINITROBENCENSULFÓNICO (TNBS)

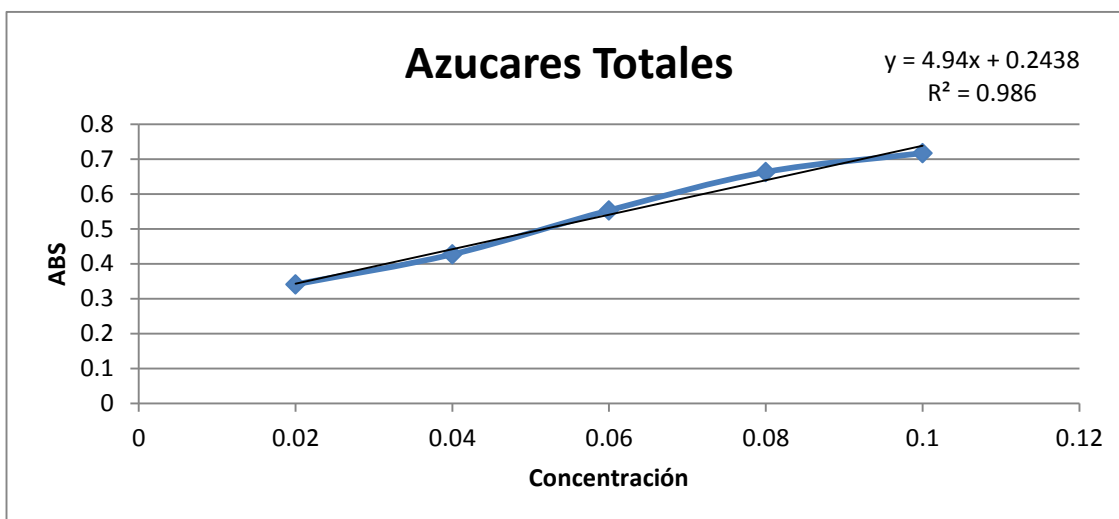
Se tomaron por duplicado 2 mL de muestra y se adicionaron 4 mL de ácido tricloroacético (TCA) 0,72 N. se dejó reposar la mezcla durante 20 min a 25°C y se filtró a través de papel Whatman #1. Se tomaron por duplicado 0,2 mL del filtrado y se mezclaron con 2 mL de amortiguador de borato de potasio (1 M; pH 9,2) y 0,8 mL de solución de TNBS 5 mM. Las mezclas fueron incubadas en la oscuridad a 25°C durante 30 min. Después de la incubación se adicionaron 0,8 mL de una solución de fosfato de sodio monobásico 2M que contenía sulfito de sodio 18 mM, para parar la reacción. Se leyó la absorbencia a 420 nm. Se calcularon los micromoles de grupos amino por mL de muestra a partir de las absorbencias utilizando una curva de calibración. (Mc Kellar, 1981))



Grafica 6: Curva de calibración para determinación de grupos amino libres.

ANEXO C: DETERMINACIÓN DE AZÚCARES TOTALES POR EL MÉTODO DE DUBOIS (FENOL/SULFÚRICO).

Se toman 2 mL de la muestra y se coloca en un tubo de ensayo; se agregan 0.05 mL de fenol al 80% (p/p, puede permanecer en almacén 3-4 meses) y 5 mL de Acido Sulfúrico al 95.5 % se deja reposar 10 minutos, se agita en un vortex, se coloca en baño de agua entre 39° C durante 10 a 20 min y se mide absorbencia de color característico amarillo-naranja a 490 nm (Dubois et al., 1956).



Grafica 7: Curva de calibración para determinación de Azúcares Totales.

ANEXO D: CUANTIFICACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES

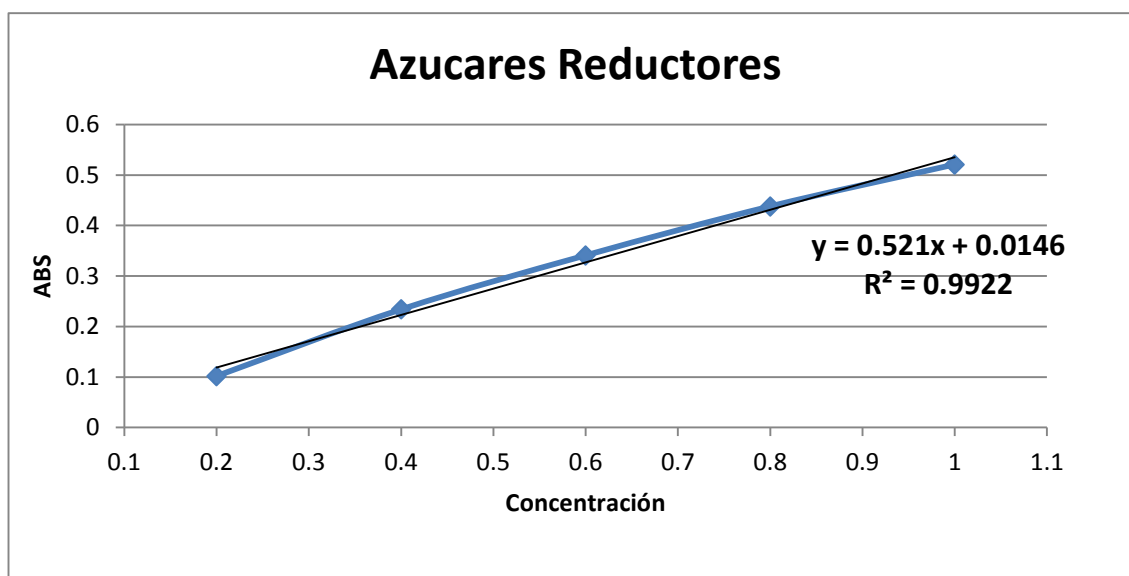
METODOLOGÍA

- PREPARACION DE DNS

Colocar 5 gramos de Acido 3,5 Dinitrosalicílico (DNS) en 100 mL de NaOH 2N. En otro recipiente disolver 150 gramos de tartrato de Na-K en 250 mL de agua. Mezclar ambos reactivos y llevar a 500 mL con agua destilada (Puede permanecer de 4 a 6 meses en refrigeración).

PROCEDIMIENTO:

A 0.5 mL de muestra colocada en un tubo de ensayo agregar 0.5 mL de agua destilada, posteriormente añadir 3 mL del reactivo de Acido 3,5 DNS y hervir a baño de agua por 5 minutos. Diluir en agua destilada hasta un volumen de 20 mL y leer a 550 nm.



Grafica 8: Curva de calibración para cuantificación de Azúcares Reductores.