

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
CARRERA DE MICROBIOLOGÍA INDUSTRIAL**



EVALUACIÓN PRELIMINAR DE LA ACTIVIDAD METABOLICA DE *Candida guilliermondii* SOBRE LAS PROPIEDADES FISICOQUIMICAS DE LA LECHE Y EN EL PROCESO DE PRODUCCIÓN DE YOGURT

IRINA ALEJANDRA BARRIENTOS ANZOLA

**TRABAJO DE GRADO
Presentado como requisito parcial
Para optar por el título de**

MICROBIÓLOGA INDUSTRIAL

BOGOTÁ D. C.

2011

EVALUACIÓN PRELIMINAR DE LA ACTIVIDAD METABOLICA DE *Candida guilliermondii* SOBRE LAS PROPIEDADES FISICOQUIMICAS DE LA LECHE Y EN EL PROCESO DE PRODUCCIÓN DE YOGURT

IRINA ALEJANDRA BARRIENTOS ANZOLA

APROBADO

Janeth Arias Palacios MSc
Director(a) de Carrera

Dra. Ingrid Schuler PhD
Decana Académica

EVALUACIÓN PRELIMINAR DE LA ACTIVIDAD METABOLICA DE *Candida guilliermondii* SOBRE LAS PROPIEDADES FISICOQUIMICAS DE LA LECHE Y EN EL PROCESO DE PRODUCCIÓN DE YOGURT

IRINA ALEJANDRA BARRIENTOS ANZOLA

APROBADO

Gerardo Moreno MSc
Director

Adriana I. Páez
Evaluador(a)

NOTA DE ADVERTENCIA

“La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Sólo velará porque no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y porque las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vean en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia”

Artículo 23, Resolución No. 13 de 1946

1. RESUMEN

En el presente estudio se plantea la evaluación de la actividad metabólica que presenta *Candida guilliermondii* sobre las propiedades fisicoquímicas de la leche y así mismo que interacción microbiana se puede presentar entre la levadura *Candida guilliermondii* y las bacterias *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus*.

La cepa de la levadura *Candida guilliermondii* se obtuvo en la Pontificia Universidad Javeriana a partir de un banco de cepas liofilizadas de dos concentraciones diferentes, las cuales fueron reactivadas en caldo YGC para su utilización en las pruebas realizadas en este estudio. Así mismo, las cepas identificadas de *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus* aisladas de yogurt Pasco. Para determinar los cambios organolépticos como el cambio de olor y textura; y los cambios fisicoquímicos como cambio en el pH, la acidez y la densidad de la leche, la levadura *Candida guilliermondii* se inoculó directamente a la leche, al igual que está con *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus*. En la prueba de interacciones microbianas se utilizaron dos diferentes técnicas de antagonismo (pozos y método de difusión en discos) en agar leche para observar la interacción de *Candida guilliermondii* Vs. *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus*, en las cuales se analizó el comportamiento entre estos microorganismos, y de acuerdo a los resultados obtenidos en cada una de las pruebas se observó que no hubo interacción antagónica entre ellos. Estas pruebas fueron llevadas a cabo a temperaturas (25°C, 30°C, y 40°C).

Luego de realizarlas pruebas en leche líquida, se observó que de acuerdo a las temperaturas (25°C, 30°C, y 40°C), de exposición hubo cambios en sus características fisicoquímicas: a 25°C en los tratamientos no hubo cambios notables en el pH, aunque con respecto al control si hubo variación; en tanto, en los tratamientos a 30°C y 40°C se observaron cambios notables en los valores de pH y de acuerdo a estos resultados se observó que la acidez de la leche aumento; y con respecto a la densidad se observó que se mantuvo en un rango de 1.019g/ml y 1.026g/ml, tomando como valores control: pH: 6,9; acidez: 0,6% ácido láctico y densidad: 1.030g/ml. También se observaron cambios en sus características organolépticas: el olor característico de la leche se torno al olor de la mantequilla (diacetilo) y al yogurt (acetoína) y su textura cambio de líquida a sólida. Y en las pruebas de interacciones microbianas se observó que no hubo inhibición de ninguno

de los microorganismos utilizados en el estudio. La levadura *Candida guilliermondii* altera las propiedades fisicoquímicas de la leche a diferentes temperaturas de tratamiento y no interfiere con el proceso llevado a cabo por las bacterias ácido lácticas en el proceso de producción de yogurt.

2. INTRODUCCIÓN

La Cadena de lácteos en Colombia está compuesta por dos eslabones principales. El primero comprende la producción de leche cruda bien sea bajo un sistema especializado o de doble propósito. El segundo eslabón es el industrial, en el cual se produce una amplia gama de productos lácteos o derivados de la leche: Leche pasteurizada, leche ultrapasteurizada, leche evaporada, leche condensada, leche en polvo, leche maternizada, leche instantánea, leches ácidas o fermentadas, crema acidificada, leches saborizadas, dulces de leche, mantequilla, y quesos (1)

Los productos lácteos representan un entorno específico para el crecimiento y selección de levaduras de diferentes especies. Las levaduras son detectadas generalmente en un gran número de productos lácteos reflejando una buena adaptación a un sustrato rico en proteínas, lípidos, azúcares y ácidos orgánicos. Una amplia distribución es una consecuencia de la actividad proteolítica y lipolítica, así como la capacidad de fermentar / asimilar la lactosa y para utilizar los ácidos cítrico, láctico y succínico. Además, las levaduras son capaces de crecer en sustratos con alta concentración de sal, bajas temperaturas, bajo pH y actividad de agua. Como parte de una comunidad microbiana, junto con las bacterias, las levaduras pueden contribuir a las características sensoriales de kefir, kumis y diferentes variedades de queso que influyen en la biosíntesis de los compuestos aromáticos (2).

El estudio se realizó con base en una muestra de la levadura liofilizada que mantiene la Unidad de Investigaciones Agropecuarias UNIDIA, para analizar su posible introducción en la cadena de producción de derivados lácteos como (yogur con frutas deshidratadas con *Candida guilliermondii*). Los reportes encontrados acerca de la levadura no hacen relación con el empleo de esta en la industria de lácteos, por lo cual se quiere conocer su desempeño en la producción de yogurt.

Este trabajo hace parte de una investigación más amplia que busca encontrar respuesta al planteamiento de este estudio sobre el uso de la levadura *Candida guilliermondii* en procesos industriales ya establecidos en yogurt.

3. JUSTIFICACION Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Este trabajo de grado hace parte de una investigación más amplia que en términos generales busca encontrar respuesta al planteamiento sobre el uso de papaya deshidratada con la levadura *Candida guilliermondii* en yogurt:

- 1.Cuál es la mejor concentración de la levadura *Candida guilliermondii* para ser aplicada sobre papaya para lograr una rápida deshidratación
- 2.Cuál es el efecto de la levadura *Candida guilliermondii* sobre leche y sobre el yogurt fresco
- 3.Cuál puede ser el efecto antagónico *Candida guilliermondii* frente a *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus*
- 4.Cuál puede ser el tiempo en el proceso de elaboración del yogurt adecuado de aplicación de la papaya deshidratada.

Se desea encontrar respuesta a este planteamiento en razón a que hay varios reportes desde el año 2000 que señalan el antagonismo entre la levadura *Candida guilliermondii* y otros microorganismos del medio ambiente.

4. MARCO TEORICO

4.1 LEVADURA

Son hongos unicelulares, no filamentosos. Las células son esféricas, ovales o cilíndricas y, en general, la división celular se lleva a cabo por gemación. En este proceso, una célula nueva se forma como un crecimiento a partir de la célula madre; la yema se alarga gradualmente y, posteriormente, se separa. Las células de levadura son mucho mayores que las células bacterianas y se pueden distinguir de ellas por su tamaño y por la existencia de estructuras interna (3). En algunos casos, forman cadenas de células alargadas, adheridas de modo suelto, semejantes a un micelio, por lo que se las denomina pseudomicelio (4). Las condiciones ambientales influyen para que algunos hongos crezcan como filamentos o como levaduras. Este fenómeno, que se conoce con el nombre de dimorfismo, se presenta en varios hongos patógenos (5).

Las levaduras se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza, localizada en el suelo, en la superficie de las frutas, en el néctar de las flores y en ambientes acuáticos. La mayoría son saprofitas y proliferan en materia orgánica muerta; otras son parasitas, facultativas u obligadas, por lo que se desarrollan en otros seres. Algunas levaduras que son parasitas pueden causar enfermedades en el hombre, animales y plantas. Entre las saprofitas, las fermentativas llevan a cabo la fermentación alcohólica de azúcares, característica aprovechada por el hombre. (5)

4.1.1 REQUERIMIENTOS NUTRICIONALES

De las fuentes de carbono y energía que pueden emplear figuran en primer lugar la glucosa y la sacarosa, aunque también pueden emplearse fructuosa, galactosa, maltosa y suero hidrolizado, ya que la levadura no puede asimilar lactosa. También puede utilizarse etanol como fuente de carbono. El nitrógeno asimilable debe administrarse en forma de amoníaco, urea o sales de amonio, aunque también se pueden emplear mezclas de aminoácidos. Ni el nitrato ni el nitrito pueden ser asimilados. Aparte de carbono y el nitrógeno los macroelementos indispensables son el fósforo que se emplea comúnmente en forma de ácido fosfórico y el Mg como sulfato de magnesio, que también provee S. Finalmente son también necesarios el Ca, Fe, Cu y Zn como elementos menores. Un requerimiento esencial está constituido por las vitaminas del grupo B como biotina, ácido pantoténico, inositol, tiamina, pyridoxina y niacina. Existen sin embargo algunas diferencias entre las distintas cepas. Entre las vitaminas mencionadas la biotina es requerida por la casi totalidad de las mismas. Los requerimientos cambian según las condiciones de cultivo, ya que el aumento de la aerobiosis disminuye los requerimientos de esa vitamina y el uso de urea como fuente de nitrógeno los aumenta por la necesidad de biosíntesis de 3 sistemas enzimáticos que contienen biotina. El ácido pantoténico, que es un componente de la coenzima A, es también requerido por muchas especies, mientras pocas especies requieren inositol. Con respecto a la tiamina se ha demostrado que aumenta la actividad fermentativa de la levadura. Finalmente debe mencionarse al O₂ como otro requerimiento nutricional para la producción de levadura. El O₂ se suministra con el aire que se inyecta en los medios durante la fermentación. Si existe limitación de O₂ no se puede alcanzar los rendimientos óptimos. La velocidad de transferencia de O₂ requerida depende del proceso empleado (6).

4.1.2 CONDICIONES AMBIENTALES REQUERIDAS PARA EL CRECIMIENTO

4.1.2.1 Oxígeno

Las levaduras crecen bajo condiciones aerobias, algunas son estrictamente aerobias y otras son facultativas. Las facultativas crecen mejor en aerobiosis y bajo condiciones anaerobias lo hacen más lentamente. Las levaduras aerobias estrictas se conocen como exudativas; y las que pueden desarrollarse tanto en medios aerobios como anaerobios se denominan fermentativas. (5)

4.1.2.2 pH

Se considera que las levaduras, al igual que los mohos, se desarrollan mejor en medios ácidos (3,8 – 5,6). Sin embargo, estas pueden tolerar un rango de pH que va desde 2,0 hasta 8,0. (5)

4.1.2.3 Temperatura

Existen levaduras que pueden crecer a muy diversas temperaturas, generalmente en un rango que va de 0 a 50 °C. La mayoría de las especies saprofitas, sin embargo, tienen temperaturas óptimas de crecimiento entre los 22 y los 30 °C (5).

4.2 GÉNERO *Candida spp*

Los hongos del género *Candida* son un grupo de levaduras sumamente ubicuas y con características muy diversas. Este género abarca más de 160 especies, de las cuales se considera que sólo 18 son patógenas (7). Este género fue propuesto por Berkout en el año 1923 y desde entonces ha experimentado algunas modificaciones en cuanto a su definición y composición. Este género pertenece a la clase *Blastomycetes* que comprende las levaduras imperfectas (asexuales). Las especies del género *Candida spp*. Asimilan azúcares tales como glucosa, sacarosa, xilosa, fructosa, galactosa y celobiosa; y no asimila lactosa (8).

El tubo germinal es una extensión filamentosa de la levadura, sin estrechamiento en su origen, cuyo ancho suele ser la mitad de la célula progenitora y su longitud tres o cuatro veces mayor que la célula madre. Solo *C. albicans* es capaz de producir en suero humano verdaderos tubos germinales; sin embargo, otras especies como *C.*

tropicalis pueden producir pseudohifas precoces de aspecto similar a los tubos germinales pero con una zona de constricción característica adyacente a la célula madre, por lo que esta prueba es útil para diferenciar *C. albicans* del resto de las especies de *Candida*, aunque no está exenta de falsos negativos (9).

4.2.1 *Candida guilliermondii*

La especie *Candida guilliermondii* es una levadura emergente que produce fungemia, osteomielitis y peritonitis, y tiene baja sensibilidad al fluconazol y a la anfotericina B (10). Se han reportado diferentes variedades, entre las que se encuentran *C. guilliermondii* var. *guilliermondii*, *C. guilliermondii* var. *membranifaciens*, *C. guilliermondii* var. *carpophila*, *C. guilliermondii* var. *japonica*, *C. guilliermondii* var. *souza*, las cuales se encuentran citadas por presentar diferencias en la patogenicidad según la variedad (11). Estudios previos en la Pontificia Universidad Javeriana con *C. guilliermondii* señalan que esta no posee tubo germinal cuando se cultiva en suero humano (8), por lo tanto esta especie no es patógena.

En estudios anteriores se realizó la identificación de la levadura *Candida guilliermondii* por medio de API 20C aux, donde se evidenció la asimilación de los siguientes azúcares:

Tabla No. 1 Resultados API 20C AUX *Candida guilliermondii* (8)

Azúcar	Abreviación API 20 C	Asimilación
Glucosa	GLU	+
Glicerol	GLY	+
2 Keto-D-Gluconato	2KG	+
L-Arabinosa	ARA	+
D-Xilosa	XYL	+
Adonitol	ADO	+
Xilitol	XLT	+
Galactosa	GAL	+
Inositol	INO	-
Sorbitol	SOR	+
α Metil-D-Glucósido	MDG	+
N-Acetil-D- Glucosamina	NAG	+
Celobiosa	CEL	+
Lactosa	LAC	-
Maltosa	MAL	+
Sacarosa/Sucrosa	SAC	+
Trealosa	TRE	+
Melezitosa	MLZ	+
Rafinosa	RAF	+

La levadura *Candida guilliermondii* produce subproductos metabólicos como alcoholes. De acuerdo a los estudios realizados por Albarracín y Barreto (12), se encontraron los siguientes subproductos: Isopentanol, Isobutanol, 2 Metil- 1 butanol, 2-feniletanol, ácido 2 metil butírico (13, 14, 15)

Además tiene la capacidad de deshidratar frutos maduros de: Banano bocadillo (*Musa acuminata*), Tomate de mesa (*Lycopersicon sculentum*), Uchuva (*Physalis peruviana*), Manzana (*Malus sylvestris*), Piña (*Ananas sativus*) y Papaya (*Carica papaya*) (8).

4.3 Características de la leche y el yogurt

La leche es la secreción mamaria normal de animales mamíferos, obtenida mediante uno o más ordeños sin ningún tipo de adición o extracción, destinada al consumo en forma de leche líquida o a elaboración ulterior (16). La leche fresca tiene aproximadamente un pH de 6.6. A este pH la caseína (proteína de la leche) está formando una suspensión coloidal de caseinato cálcico. Conforme las bacterias lácticas van fermentando los azúcares, se va acumulando ácido láctico, disminuyendo gradualmente el pH. En condiciones ácidas la caseína se desnaturaliza (punto isoeléctrico 4,6) y la leche se coagula formando un producto semisólido, que es el yogurt (17). El yogurt es un producto lácteo fermentado que resulta del desarrollo de dos bacterias termófilas: *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus*. La primera es una bacteria láctica que se desarrolla en forma óptima entre 42 y 50°C y proporciona la acidez característica del yogurt. La segunda es otra bacteria láctica que contrariamente se reproduce a temperaturas entre 37 y 42°C y se encarga de dar el aroma característico del yogurt (18).

4.4 Bacterias Ácido Lácticas: *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus*

Streptococcus thermophilus es frecuentemente aislado de ambientes lácteos, pero las cepas últimamente se han aislado de muestras de plantas de Bulgaria. Los aislamientos identificados son anaerobios, aerotolerantes, catalasa-negativos y gram positivos, creciendo como cadenas lineales de células ovoides, pertenecen al género *Streptococcus*. La identificación de las especies *S. thermophilus* se basa en la hidrólisis de la arginina y la esculina, fermentación ácido en la amígdalina, celobiosa,

la inulina, maltosa, manitol, rafinosa y caldos N-acetilglucosamina y capacidad de crecer a 45 ° C. El pH óptimo de crecimiento de *S. thermophilus* es de 6,8. (19) *S. thermophilus* se relaciona con *Lactococcus lactis*, pero es filogenéticamente más cercano de especies de estreptococos del grupo viridans. Estreptococos viridans se dividen en cinco grupos (i) el grupo mutans, (ii) el grupo anginosus, (iii) el grupo de Sanguinus, (iv) el grupo mitis y (v) el grupo salivarius, que incluye *S. salivarius*, *S. vestibular* y *S. thermophilus*. El papel de *S. thermophilus* en la fermentación de la leche se debe a su rápida conversión de la lactosa en ácido láctico, provocando un rápido descenso en el pH y la producción de metabolitos importantes por sus propiedades tecnológicas (20).

Son bacilos largos con morfología cocobacilar y corineforme. Es frecuente la formación de cadenas. Son Gram positivos, inmóviles, aunque existen unas pocas especies móviles por flagelos peritricos. No son esporulados. Son sacarolíticos obligados. Su característica principal es la de fermentar azúcares con producción de ácido láctico, pudiendo ser homofermentadores u heterofermentadores. Su crecimiento se ve favorecido por la anaerobiosis o por tensiones de oxígeno reducidas. Crecen entre 2°C y 53°C, aunque su temperatura óptima es de 30-40°C. Son acidúricos, creciendo óptimamente a pH comprendidos entre 5,5-6,2 (21). *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* ha sido ampliamente utilizado en asociación con otros cultivos iniciadores para hacer yogur con mejor textura y sabor. Además, existe evidencia significativa de que *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* tiene propiedades probióticas (22).

Lactobacillus del brueckii subsp. bulgaricus (*L. bulgaricus*) y *Streptococcus thermophilus* son bacterias ácido lácticas que son ampliamente utilizadas en la fermentación de la leche. Durante su crecimiento en la leche, la lactosa se utiliza como fuente de energía primaria. Dos sistemas de transporte y metabolismo de la lactosa se conocen en las bacterias ácido lácticas: 1. un fosfoenolpiruvato (PEP) del sistema fosfotransferasa lactosa (STP) con una enzima fosfo-p-galactosidasa y 2. un sistema de la lactosa permeasa con un β -galactosidasa. El sistema de PEP-PTS se encuentra en muchas especies, incluyendo lactococos (23).

5. OBJETIVOS

5.1 General

- Evaluar la respuesta fisicoquímica de la leche a la aplicación de *Candida guilliermondii* y analizar la interacción microbiana entre la levadura y Bacterias Ácido Lácticas.

5.2 Específicos

- Evaluar el crecimiento de *Candida guilliermondii* en leche a diferentes temperaturas a las cuales va a ser expuesta para la obtención de yogurt
- Analizar las interacciones microbianas que se presentan en leche entre *Candida guilliermondii* y, las bacterias *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus* en diferentes temperaturas a las cuales es procesada la leche para la obtención de yogurt
- Determinar los cambios fisicoquímicos (acidez, densidad y pH) y organolépticos (olor, textura) en la leche sometida a diferentes temperaturas producidos por *Candida guilliermondii*

6. METODOLOGÍA

6.1 Microorganismos

6.1.1 Reactivación de *Candida guilliermondii*

La cepa de la levadura utilizada para este estudio fue tomada de un banco de cepas liofilizadas, obtenida en estudios previos en el segundo semestre de 2010 y se encuentra en la Unidad de Investigaciones Agropecuarias UNIDIA.

Para la rehidratación de la levadura se inyectaron 3,5ml de Caldo YGC (Extracto de levadura 5g/L; D (+) Glucosa 20g/L; Cloranfenicol 0,1g/L) (24), a temperatura ambiente por 10 minutos. Después estos se agregaron a 35ml de Caldo YGC y se llevaron a agitación a 150rpm a 27°C +/- 2°C por 12 horas (25). Para definir las concentraciones que se utilizaron en el estudio se realizaron lecturas de absorbancia a 620nm cada hora en el espectrofotómetro y recuento en cámara de Neubauer (8).

6.1.2 Evaluación macroscópica y microscópica de la levadura

Para la evaluación de la pureza del cultivo se sembraron 0,1ml en superficie en agar YGC (Extracto de levadura 5g/L; D (+) Glucosa 20g/L; Cloranfenicol 0,1g/L; Agar-agar 14,9g/L) (24). Se llevaron a incubar a 27°C +/- 2°C por 3 días. Posteriormente se realizaron coloraciones de Gram y se observaron en el microscopio en el objetivo 100x.

6.1.3 Obtención cepas *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus*

A partir de yogur Pasco, se tomó una muestra de 1ml y se realizaron diluciones seriadas hasta 10^{-8} . A partir de estas diluciones se sembraron 0,1ml en agar M-17 (Tryptona 2,5g/L; peptona de carne 2,5g/L; peptona de soya 5g/L; Extracto de levadura 2,5g/L; Extracto de carne 5g/L; Glicerofosfato di sódico 19g/L; sulfato de magnesio 0,25g/L; ácido ascórbico 0,5g/L; lactosa 5g/L; Agar-agar 15g/L) (26) para *Streptococcus thermophilus* y 0,1ml en agar MRS (Peptona universal 10g/L; Extracto de carne 5g/L; Extracto de levadura 5g/L; D(+)Glucosa 20g/L; hidrogenofosfato di potásico 2g/L; Tween 80 1g/L; hidrogencitrato di amónico 2g/L; acetato sódico 5g/L; sulfato de magnesio 0,1g/L; sulfato de manganeso 0,05g/L; Agar-agar 12g/L) (24) para *Lactobacillus bulgaricus*, de las diluciones 10^{-7} y 10^{-8} . Se incubaron a 40°C por 24 horas en condiciones de microaerofilia (27). Después del tiempo de incubación, se realizaron coloraciones de Gram para observar la morfología de *Streptococcus thermophilus* (cocos Gram positivos) y *Lactobacillus bulgaricus* (bacilos Gram positivos).

6.2 Determinación del crecimiento de *Candida guilliermondii* en leche a diferentes temperaturas

6.2.1 Se tomaron 350mL de leche pasteurizada y se adicionaron a un Frasco Schott de 500mL, donde posteriormente se adicionaron 35mL de la levadura en suspensión (Concentración 1 y 2). Se llevó a incubar a 25°C, 30°C y 40°C independientemente por 48 horas para establecer cual es la mejor temperatura, después de este tiempo se realizó coloración de Gram.

6.2.2 También se realizó esta prueba adicionando a 350ml de leche pasteurizada, 20ml de la levadura *Candida guilliermondii*, y 15ml de las

bacterias *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus*. Se llevo a incubar a 25°C, 30°C y 40°C independientemente por 48 horas, después de este tiempo se realizo coloración de Gram.

6.3 Interacciones Microbianas

6.3.1 Técnica de Pozos

Se realizo un raspado de las colonias obtenidas de las bacterias *Streptococcus thermophilus* en el agar M-17 y *Lactobacillus bulgaricus* en el agar MRS y se preparo una suspensión de 5ml en solución salina 0,85% (P/V), igualando al tubo 3 de McFarland (28).

A partir del cultivo de *Candida guilliermondii* se sembraron masivamente 0,1ml de en Agar Leche (peptona de caseína 5g/L; extracto de levadura 2,5g/L; leche desnatada en polvo 1g/L; glucosa 1g/L; Agar agar 10g/L) (24). Una vez sembrada la levadura, se perforaron pozos de 5mm de diámetro en el agar con 3cm de distancia entre ellos, en los cuales a partir de la solución, igualada al tubo 3 de McFarland correspondiente a un concentración de 10^{-8} de los microorganismos, preparada anteriormente, se adicionaron 50µl en un pozo *Streptococcus thermophilus* y en un segundo pozo *Lactobacillus bulgaricus* y un tercero como control con agua destilada estéril. Las cajas se incubaron a 25°C, 30°C y 40°C independientemente por 48 horas. Posteriormente se observaron las cajas para medir los halos de inhibición (29). Se realizo por triplicado.

6.3.2 Método de difusión en discos

Se realizaron siembras masivas de la levadura *Candida guilliermondii* en agar leche y se situaron 3 sensidiscos de papel filtro con un diámetro de 7mm con 3cm de distancia entre ellos, en los cuales fueron inoculados 10µl de las suspensiones anteriormente preparadas, en uno *Streptococcus thermophilus*, un segundo con *Lactobacillus bulgaricus* y un tercero como control con agua destilada estéril, hasta quedar humedecidos (30). Se llevaron a incubar a 25°C, 30°C y 40°C independientemente por 48 horas. Posteriormente se observaron las cajas para medir los halos de inhibición. Se realizo por triplicado.

6.4 Pruebas fisicoquímicas y organolépticas de la leche

6.4.1 Acidez/ Densidad/ pH

6.4.1.1 A partir de los frascos shott inoculados con *Candida guilliermondii*, después de 48 horas de incubación a 25°C, 30°C y 40°C, se tomaron de cada uno de los frascos, aproximadamente 9ml de leche en un vaso de compota y se adicionaron entre 3 y 5 gotas de fenolftaleína 1% y se tituló con NaOH 0,1N hasta obtener un color rosa pálido. Para obtener el porcentaje de ácido láctico se utilizó la fórmula: $\text{ml NaOH}/10 = \% \text{ de ácido láctico}$ (31).

6.4.1.2 Después 48 horas de incubación, se llevo la leche a una temperatura de 15°C +/- 5. Después se tomaron 250mL de cada frasco schott y se adicionaron a una probeta de 250mL a la cual se introdujo suavemente el termolactodensímetro de forma vertical (31).

6.4.1.3 Se utilizó el pH metro y se introdujo en la leche, después de 48 horas de incubación a 25°C, 30°C y 40°C y se observó el valor obtenido de pH.

6.4.2 Características organolépticas

Después de 48 horas de incubación a 25°C, 30°C y 40°C independientemente de los tratamientos, se analizó el cambio de olor, realizando comparaciones entre el olor característico y los olores obtenidos y también el cambio de textura.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Microorganismos

7.1.1 Reactivación *Candida guilliermondii*

Para la reactivación de las cepas liofilizadas de *Candida guilliermondii* provenientes de estudios anteriores tomadas de la hora 8 y 10 de la fase exponencial de crecimiento, se partió con la rehidratación en caldo YGC (Figura 1)

a condiciones de agitación, 150rpm; y a una temperatura de 27°C +/- 2°C. A partir de la levadura rehidratada se tomaron muestras cada hora de cada una de las suspensiones para realizar la lectura de absorbancia a 620nm, para hallar las concentraciones en g/L, tomando la curva patrón, $y=0,2584x+0,0401$ (8), planteada en estudios anteriores. En el tiempo de crecimiento la concentración de levadura aumenta (Tabla 1, Gráfica 1), al igual que la biomasa de la levadura (Tabla 1, Gráfica 1b). Se realizaron coloraciones de Gram donde se observo el comportamiento de la levadura al paso de las horas de crecimiento. De acuerdo a estas imágenes podemos evaluar el crecimiento de la levadura y también que no hay presencia de flora acompañante.

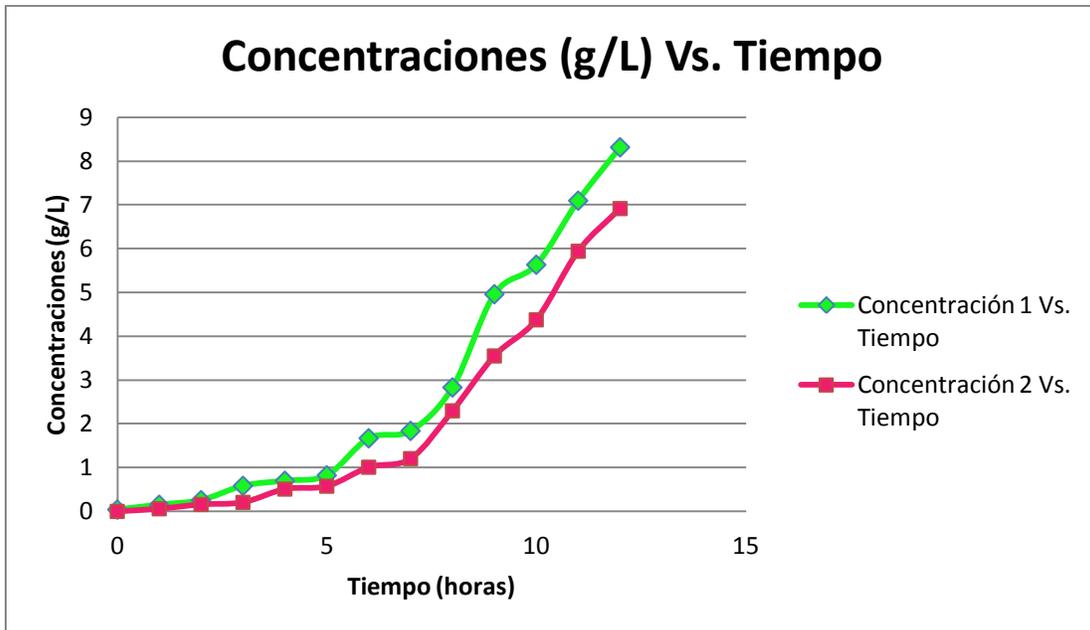


Figura 1. Reactivación *Candida guilliermondii*. (Foto: Autor)

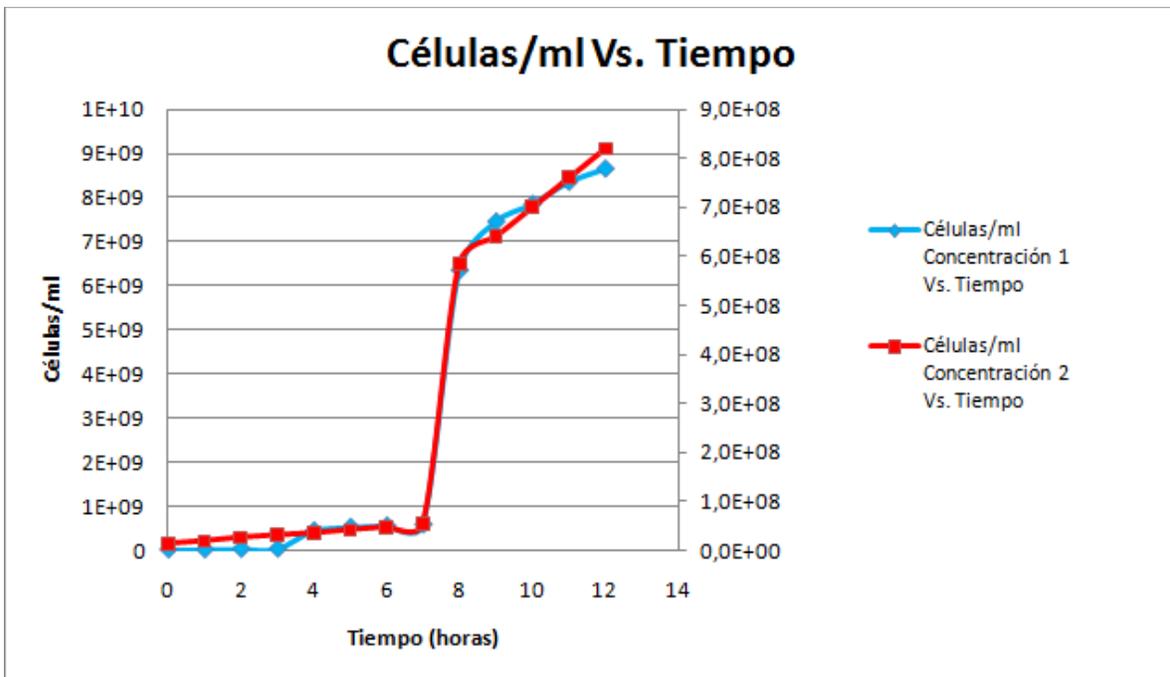
Tiempo	Abs Vial 1	Vial 1 Hora 8	Células/ml	Abs Vial 2	Vial 2 Hora 10	Células/ml
0	0,051	0,042	21×10^6	0,022	-0,070	13×10^6
1	0,080	0,152	25×10^6	0,056	0,060	19×10^6
2	0,107	0,257	37×10^6	0,081	0,158	25×10^6
3	0,116	0,584	41×10^6	0,094	0,207	31×10^6
4	0,131	0,700	45×10^7	0,106	0,510	35×10^6
5	0,147	0,824	53×10^7	0,115	0,576	41×10^6
6	0,184	1,671	57×10^7	0,127	1,009	47×10^6
7	0,199	1,839	59×10^7	0,144	1,206	53×10^6
8	0,284	2,832	63×10^8	0,238	2,298	59×10^7
9	0,468	4,962	75×10^8	0,346	3,551	64×10^7
10	0,526	5,635	79×10^8	0,417	4,376	70×10^7
11	0,652	7,098	83×10^8	0,552	5,943	76×10^7
12	0,757	8,317	87×10^8	0,636	6,918	82×10^7

Tabla 1. Absorbancia 620nm Vs. Tiempo, Recuento en Cámara (células/ml). Concentración 1 y

Concentración 2



Grafica 1. Concentraciones (g/L) Vs. Tiempo (horas)



Grafica 2. Células/ml Vs. Tiempo (horas)

7.1.2 Evaluación macroscópica y microscópica de la levadura

Después de realizar la rehidratación de la levadura y hallar las concentraciones a utilizar, se realizó el aislamiento en agar YGC, donde, macroscópicamente, se observaron las colonias características de color blanco, redondas, cremosas y lisas

(Figura 2), y microscópicamente, se observó la morfología natural de las levaduras, células ovaladas, en estado de gemación y Gram positivas, esto debido a que estas poseen pared celular gruesa por lo tanto retienen el cristal violeta y el yodo, y además se comprobó que no había presencia de flora acompañante (Figura 3)

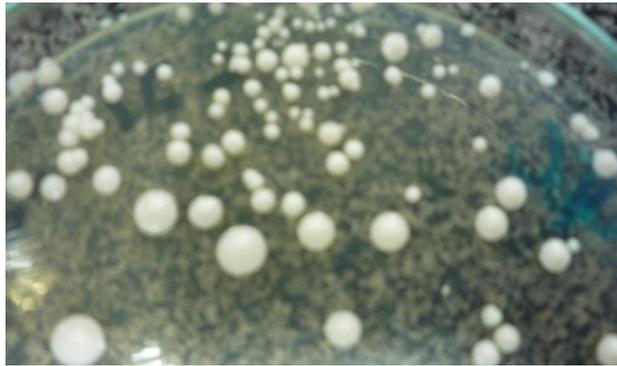


Figura 2. Características macroscópicas de *Candida guilliermondii*. (Foto: Autor)



Figura 3. Características microscópicas de *Candida guilliermondii*. (Foto: Autor)

7.1.3 Obtención de cepas de *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus*

Para obtener las cepas de *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus*, se partió del yogur Pasco se realizaron diluciones seriadas de 10^{-1} a 10^{-8} , de las cuales se tomaron 10^{-7} y 10^{-8} y se sembraron masivamente 0,1ml en los medios selectivos, Agar M-17 (*Streptococcus thermophilus*) y Agar MRS (*Lactobacillus bulgaricus*) (Figura 4), las cuales después fueron aisladas en los medios selectivos (Figura 5) y después del tiempo de incubación se realizó coloración de Gram donde se obtuvieron cocos Gram positivos (*Streptococcus thermophilus*) y bacilos Gram positivos (*Lactobacillus bulgaricus*) (Figura 6).

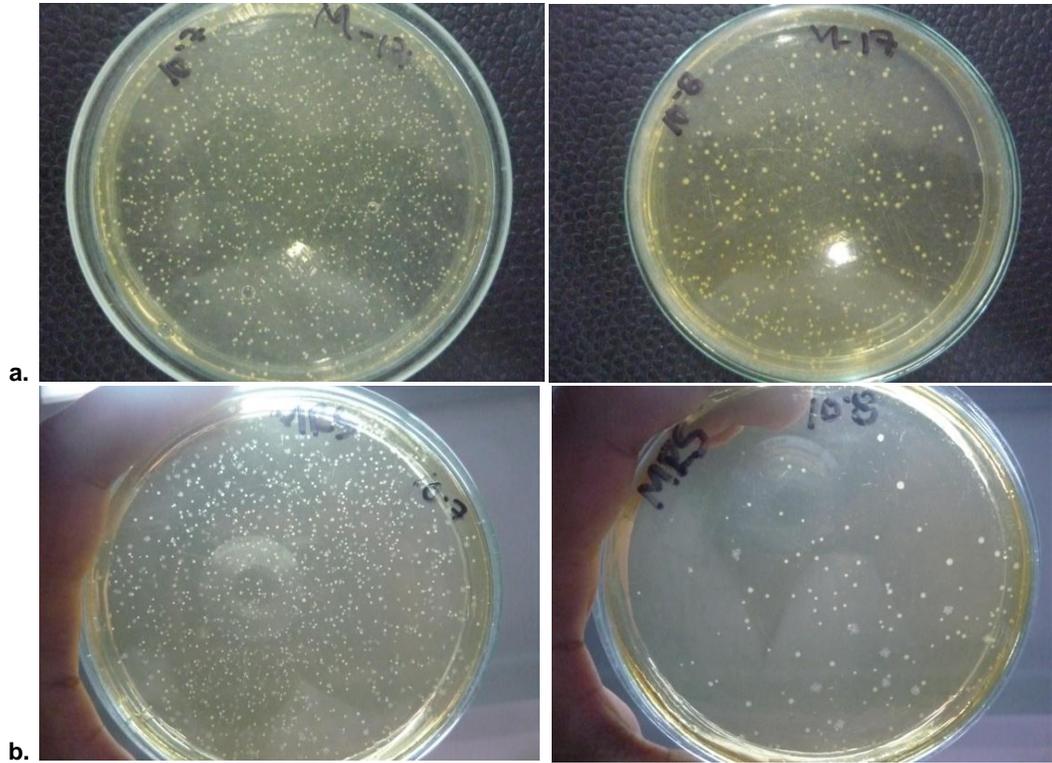


Figura 4. Siembra Masiva a. Agar M-17, b. Agar MRS. (Foto: Autor)

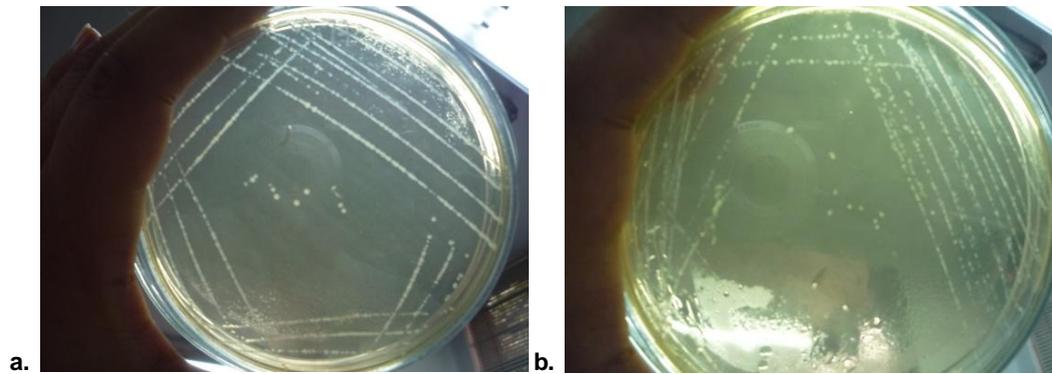


Figura 5. Aislamiento a. Agar M-17, b. Agar MRS. (Foto: Autor)

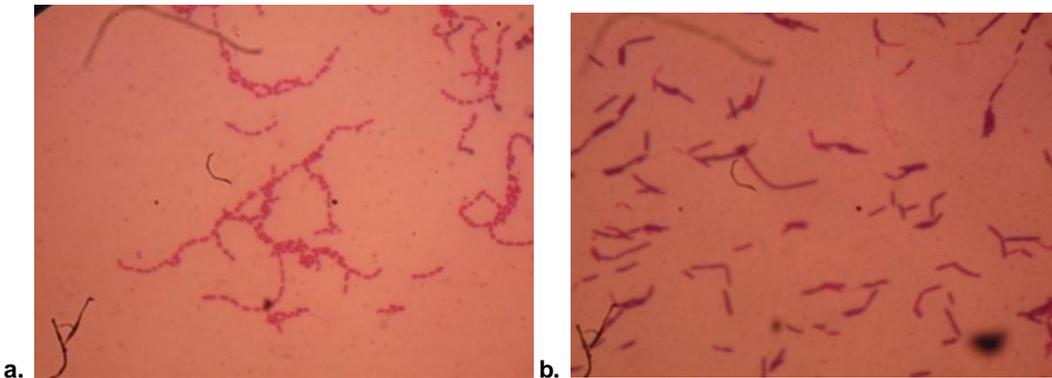


Figura 6. Microscopia a. *Streptococcus thermophilus*, b. *Lactobacillus bulgaricus*. (Foto: Autor)

7.2 Determinación del crecimiento de *Candida guilliermondii* en leche a diferentes temperaturas

En los frascos shott que fueron expuestos a la temperatura 25°C después de 48 horas de incubación, se observa que la leche se encuentra líquida, sin cambio en sus características físicas; en los expuesto a 30°C después de 48 horas de incubación, se observa que las características físicas de la leche cambiaron, esto es debido un proceso enzimático en el que ocurren las modificaciones fisicoquímicas de las proteínas por acción de enzimas y/o de ácido láctico con la consiguiente formación de un coágulo o gel (32). Al igual que en los frascos expuestos a 40°C después de 48 horas de incubación, se observa cambio. Esto se presenta debido a la producción de ácido láctico por parte de la levadura *Candida guilliermondii*, *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus*.



Figura 7. Leche pasteurizada con *Candida guilliermondii* concentraciones 1 y 2 y *Candida guilliermondii* + *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus* expuesta a **a.** 25°C, **b.** 30°C y **c.** 40°C. (Foto: Autor)

De acuerdo a lo observado en las coloraciones de Gram podemos determinar que *Candida guilliermondii* puede crecer en un medio líquido como la leche en las temperaturas de exposición 25°C, 30°C y 40°C (Figura 8a 1 y 2, 8b 1 y 2, 8c 1 y 2) después de 48 horas de incubación. En las tinciones de Gram de la leche pasteurizada donde se inocularon *Candida guilliermondii*, *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus* se observa que el crecimiento de los microorganismos no fue inhibido por los otros debido a que se puede observar que tanto *Candida guilliermondii* como *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus* crecieron (Figura 8a 3, 8b 3, 8c 3).

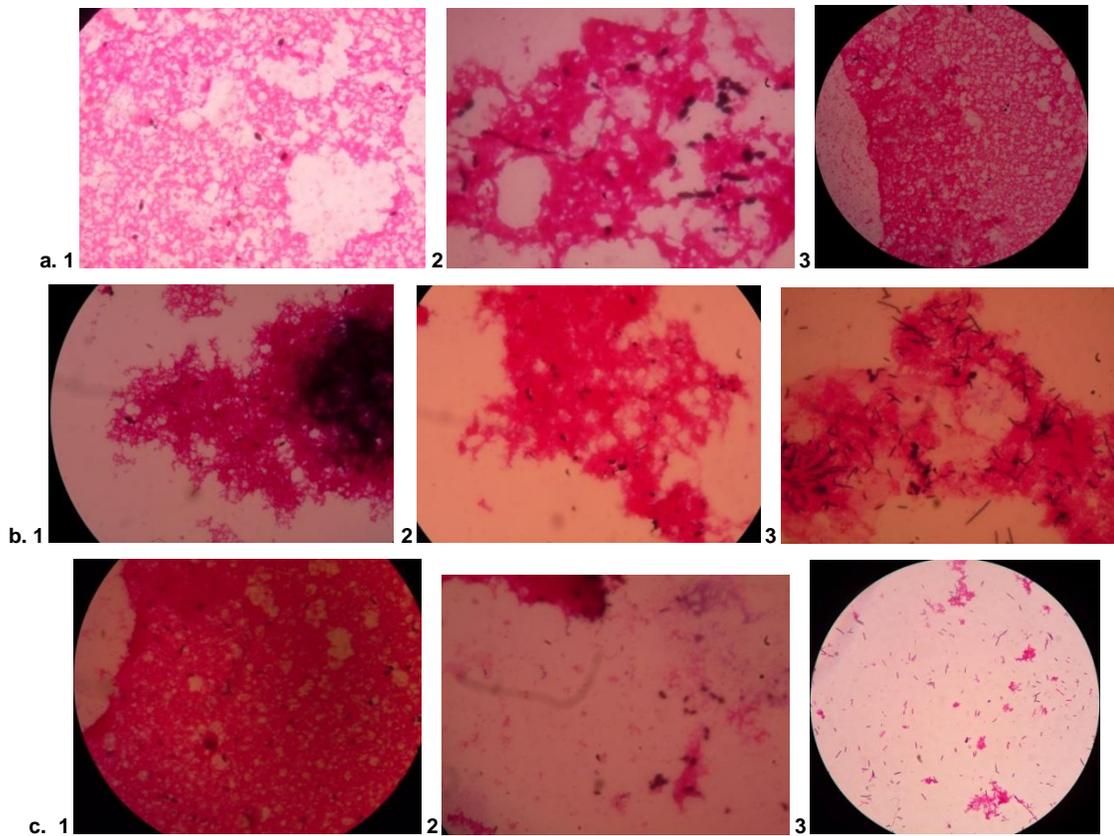
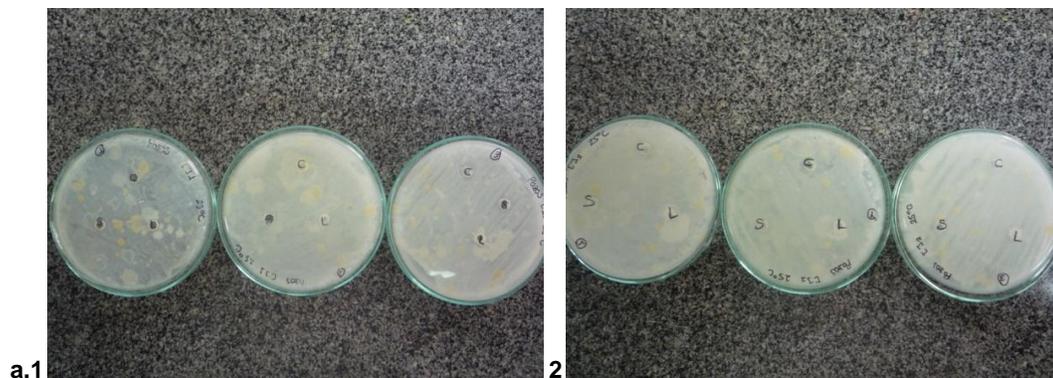


Figura 8. Coloraciones de Gram. Leche pasteurizada **a.** 25°C 1. *Candida guilliermondii* Concentración 1, 2. *Candida guilliermondii* Concentración 2, 3. *Candida guilliermondii* + *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus*, **b.** 30°C 1. *Candida guilliermondii* Concentración 1, 2. *Candida guilliermondii* Concentración 2, 3. *Candida guilliermondii* + *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus*, y **c.** 40°C 1. *Candida guilliermondii* Concentración 1, 2. *Candida guilliermondii* Concentración 2, 3. *Candida guilliermondii* + *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus*. (Foto: Autor)

7.3 Interacciones Microbianas

7.3.1 Técnica de Pozos



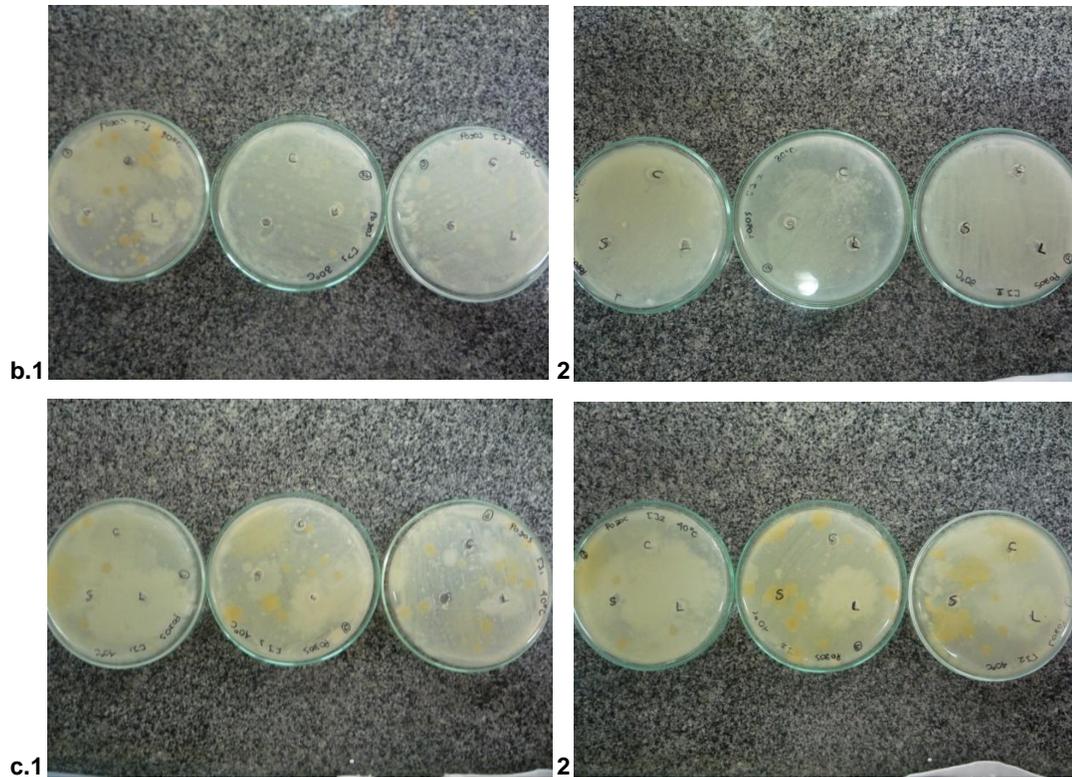
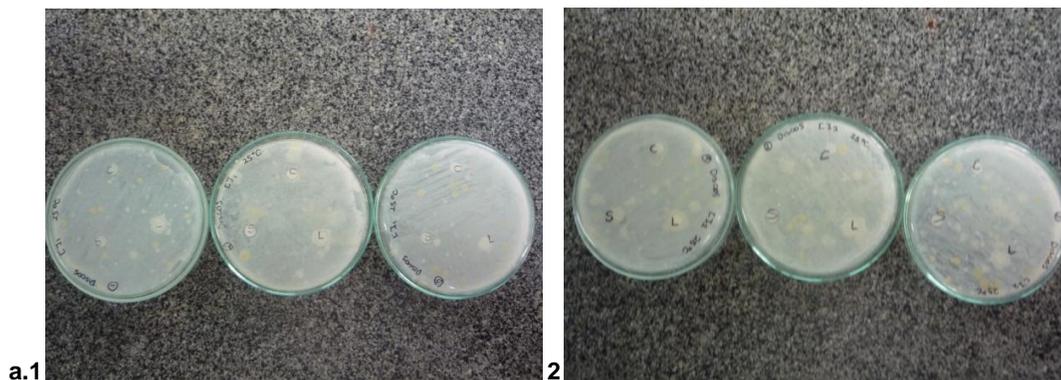


Figura 9. Técnica de pozos 1. *Candida guilliermondii* Concentración 1 2. *Candida guilliermondii* Concentración 2 a. 25°C, b. 30°C y c. 40°C. (Foto: Autor)

En la técnica de pozos se sembró masivamente 0,1ml de *Candida guilliermondii* y en los pozos se inocularon respectivamente 50µl de *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus* y como control se inóculo agua destilada estéril, se pudo observar que no hubo inhibición de ninguno de los microorganismos (*Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus*) por parte de *Candida guilliermondii*.

7.3.2 Método de difusión en discos



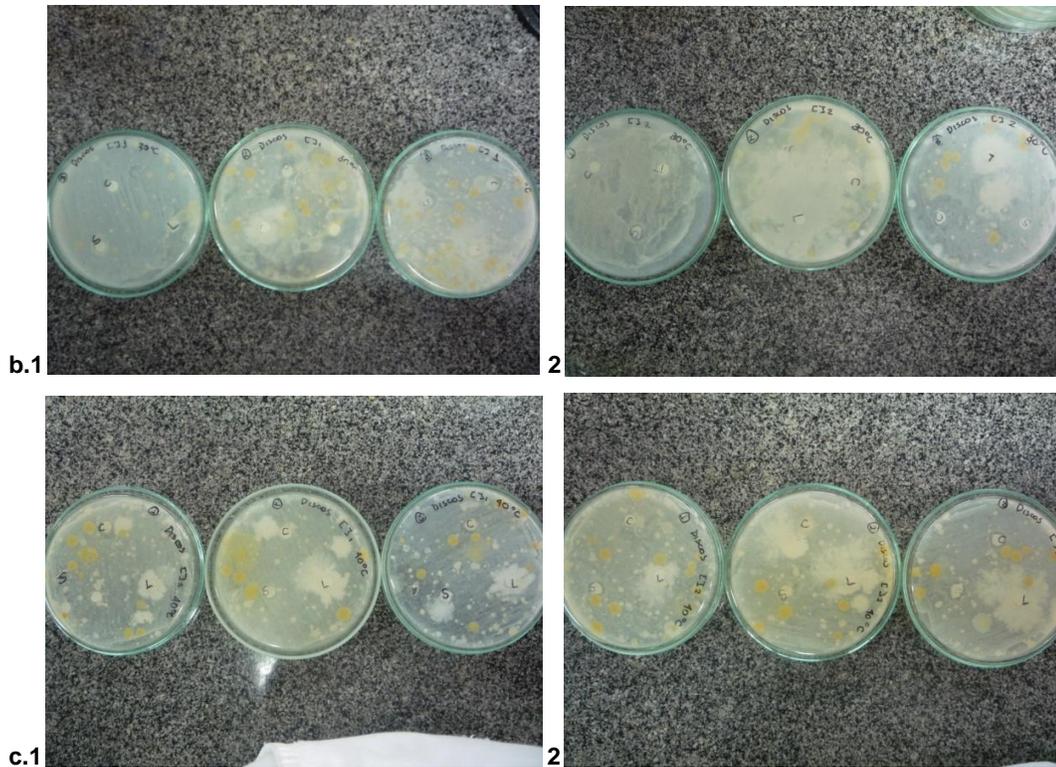


Figura 10. Método de difusión en discos Técnica de pozos 1. *Candida guilliermondii* Concentración 1
2. *Candida guilliermondii* Concentración 2 a. 25°C, b. 30°C y c. 40°C. (Foto: Autor)

Realizando el método de difusión en discos, se sembró masivamente 0,1ml de *Candida guilliermondii* y en los discos de papel filtro se inocularon respectivamente 10µl de *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus* y como control se inóculo agua destilada estéril, se pudo observar que no hubo inhibición de ninguno de los microorganismos (*Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus*) por parte de *Candida guilliermondii*. Al igual que se observo en las pruebas en leche pasteurizada.

7.4 Pruebas fisicoquímicas y organolépticas de la leche

7.4.1 Acidez/ Densidad/ pH

La leche pasteurizada al exponerse a diferentes temperaturas cambia sus propiedades físicas. Pero no solo la temperatura es responsable de esto, por ejemplo para la elaboración yogur es necesario la utilización de microorganismos los cuales también producen cambios en las propiedades de la leche, como se puede observar en la Tabla 1. Se observa que de acuerdo al tratamiento al que ha sido expuesta, hay variación de los valores de pH, los cuales descienden

volviendo más ácida, lo cual se pudo corroborar al realizar la titulación de la leche, demostrando de esta manera que la leche se torno ácida debido a la presencia de alcoholes producidos por *Candida guilliermondii* y ácidos producidos por las bacterias ácido lácticas empleadas. Otro parámetro a analizar es la densidad, la cual estuvo por debajo de los rangos normales de la leche los cuales están de 1.028g/ml a 1.035g/ml (32). Cuando la temperatura varía en las proximidades del punto de fusión de la materia grasa, la densidad varía y no se estabiliza hasta varias horas después del cambio de temperatura, debido a la lenta modificación del estado físico, de la materia grasa (33).

Tratamiento	pH	Acidez (% ácido láctico)	Densidad g/ml
Leche a 15°C (Control)	6,9	0,6 %	1.030
Leche + Concentración 1 25°C (T1)	5,85	1,65%	1.026
Leche + Concentración 2 25°C (T2)	5,81	1,7%	1.024
Leche + <i>Candida guilliermondii</i> + <i>Streptococcus</i> y <i>Lactobacillus</i> 25°C (T3)	5,72	1,95%	1.025
Leche + Concentración 1 30°C (T1)	5,09	1,5%	1.019
Leche + Concentración 2 30°C (T2)	4,94	1,15%	1.022
Leche + <i>Candida guilliermondii</i> + <i>Streptococcus</i> y <i>Lactobacillus</i> 30°C (T3)	3,79	2,25%	1.023
Leche + Concentración 1 40°C (T1)	5,88	0,55%	1.027
Leche + Concentración 2 40°C (T2)	4,73	0,95%	1.023
Leche + <i>Candida guilliermondii</i> + <i>Streptococcus</i> y <i>Lactobacillus</i> 40°C (T3)	3,59	2,35%	1.024

Tabla 2. Pruebas fisicoquímicas. Acidez, pH, Densidad

7.4.2 Características Organolépticas

De acuerdo a los resultados obtenidos en la Tabla 2, la leche presento cambios en sus características organolépticas, con respecto al color este cambio se debió al proceso enzimático en el que ocurren las modificaciones fisicoquímicas de las proteínas por acción de enzimas y/o de ácido láctico con la consiguiente formación de un coágulo o gel (34). Entre los cambios organolépticos se observo el cambio del olor característico de la leche y de la textura líquida, donde por efecto de la acidez producida por la fermentación de la lactosa, la leche se puede llegar a coagular gracias a la coalescencia de las caseínas al alcanzarse el pH iso-eléctrico, lo cual es deseable en la elaboración de yogurt y quesos. Algunas especies producen polisacáridos (gomas, mucina), que aumentan la viscosidad de la leche cambiando su textura (*S. thermophilus*, *Lb. bulgacricus*, *Lc. cremoris*). Aportan sabor y aroma, ya que como parte de su metabolismo fermentativo se da la producción de acetaldehído, diacetilo, acetoína, acetona, lactonas, ácidos volátiles, alcohol y gas. El diacetilo es el principal responsable del aroma de la mantequilla. La acetoína lo es en el yogurt, mientras que el ácido láctico aporta sabor a diversos productos fermentados (35).

Tratamiento	Olor	Textura
Leche a 15°C (Control)	Característico	Líquida
Leche + Concentración 1 25°C (T1)	Ácido	Líquida
Leche + Concentración 2 25°C (T2)	Agrio	Coagulada
Leche + <i>Candida guilliermondii</i> + <i>Streptococcus</i> y <i>Lactobacillus</i> 25°C (T3)	Ácido	Líquida
Leche + Concentración 1 30°C (T1)	Agrio	Coagulada
Leche + Concentración 2 30°C (T2)	Agrio	Coagulada
Leche + <i>Candida guilliermondii</i> + <i>Streptococcus</i> y <i>Lactobacillus</i> 30°C (T3)	Agrio	Coagulada
Leche + Concentración 1 40°C (T1)	Ácido	Líquida

Leche + Concentración 2 40°C (T2)	Agrio	Coagulada
Leche + <i>Candida guilliermondii</i> + <i>Streptococcus</i> y <i>Lactobacillus</i> 40°C (T3)	Agrio	Coagulada

Tabla 3. Pruebas fisicoquímicas. Características organolépticas. Olor, textura.

8. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

- *Candida guilliermondii* puede crecer a temperaturas de 30°C y 40°C similar a las bacterias ácido lácticas
- No se presentó antagonismo a temperaturas (25°C y 40°C) entre *Candida guilliermondii* y *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus*
- Se presentaron cambios fisicoquímicos el pH disminuyó y la acidez aumentó; la densidad no tuvo cambios notables. En los cambios organolépticos hubo cambios en el olor, y la textura.

9. RECOMENDACIONES

- En estudios posteriores, se deberían tener en cuenta los periodos de exposición de la levadura en la leche a las diferentes temperaturas y también las concentraciones de *Candida guilliermondii*.
- Profundizar en el estudio del comportamiento de la levadura en la leche para la producción de derivados lácticos

10. BIBLIOGRAFIA

1. Observatorio Agrocadenas Colombia. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. La Cadena de Lácteos en Colombia. http://www.agronet.gov.co/www/docs_agronet/2005112162250_caracterizacion_lacteos.pdf. Consultado el 29 de Abril de 2011

2. Lopandic K, Zelger S, Bánszky L, Eliskases-Lechner F, Prillinger H. Identification of yeasts associated with milk products using traditional and molecular techniques. *Food Microbiology*. 2006. **23**: 341-350
3. Bayona M, Muñoz P, Poutou R. *Microorganismos de interés industrial. Manual de laboratorio*. Primera Edición. Editorial Javegraf. Bogotá, Colombia. 1999. 89p
4. Pascual M R, Calderón V. *Microbiología Alimentaria: Metodología Analítica para Alimentos y Bebidas*. Segunda Edición. Ediciones Díaz de Santos. 2000. 441p
5. García V. *Introducción a la Microbiología*. Segunda Edición. EUNED. 2004. 240p
6. Organización de los Estados Americanos. Producción de Levadura de Panificación. http://www.science.oas.org/Simbio/mbio_ind/cap8_mi.pdf Consultado 08 Junio de 2011
7. López C, Giro L, Ramos L, Ramadán S, Bulacio L. Comparación de diferentes métodos para la identificación de especies del género *Candida*. *Revista Argentina de Microbiología*. 2005. **37**: 16-21
8. Buitrago J, Escobar A M. Aplicación de levadura *Candida spp.* Como una alternativa viable para la retardación en la pudrición del banano (*Musa acuminata*). **Tesis Pregrado**. Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, 2009, 81p
9. Linares M, Solis F. Identificación de levaduras. <http://www.guia.reviberoammicol.com/Capitulo11.pdf>. Consultado el 17 de Marzo de 2011.
10. Pinoni M V, Castán V, Maegli M I, Lorenzo J, Frizzera F, Jewtuchowicz V, Mujica M T. Características fenotípicas útiles para la identificación presuntiva de *Candida guilliermondii*. *Revista Argentina de Microbiología*. 2007. **39**: 81-83

11. Feng Y, Liang, H. Taxonomic relationships among the taxa in the *Candida guilliermondii* complex, as revealed by comparative electrophoretic karyotyping. *International Journal of Systemic and Evolutionary Microbiology*.2000. **50**: 417-422
12. Albarracín M, Barreto C. Evaluación del posible efecto antagónico de *Candida incospicua* y sus metabolitos en el control de *Rhizopus sp.* en el tomate. **Tesis Pregrado**, Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana. .2004
13. Jiménez L. Análisis sistemático de literatura sobre el efecto bactericida y/o fungicida de los subproductos obtenidos del metabolismo de *Candida guilliermondii* en cultivos de tomate. **Tesis Pregrado**. Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, 2010, 26p
14. MOREIRA M, MENDES F, HOGG T, VASCONCELOS I. Alcohols, esteres and heavy sulphur compounds production by pure and mixed cultures of apiculate wine yeast. *International Journal of Food Microbiology*. 2005 **103**: 285– 294
15. LONGO M, SANROMAN M A. Reduction of food aroma compounds: microbial and enzymatic methodologies. *Food Technol. Biotechnology*. 2006 **44**: 335–353
16. Codex Alimentarius. Leche y Productos Lácteos. Organización Mundial de la Salud. Primera Edición. 2007. 275p
17. Gamazo C, Lopez-Goñi I, Díaz R. Manual Práctico de Microbiología. Elsevier. España. 2005. 246p
18. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. <http://www.fao.org/inpho/content/documents/vlibrary/ae620s/Pprocesados/LACT6.HTM>
Consultado el 07 de Abril de 2011
19. Aslim B, Nur Yüksekdag Z, Beyatli Y, Mercan N. Exopolysaccharide production by *Lactobacillus delbruckii* subsp. *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* strains under different growth conditions. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. 2005. **21**: 673-677

20. Delorme C. Safety assessment of dairy microorganisms: *Streptococcus thermophilus*. *International Journal of Food Microbiology*. 2008. **126**: 274–277
21. Collado M. Caracterización de cepas del género *Bifidobacterium* con carácter probiótico. **Tesis Doctorado**. Departamento de Biotecnología. Universidad Politécnica de Valencia. Valencia, España. 2004 283p
22. Nikolaou A, Saxami G, Kourkoutas Y, Galanis A. A new methodology for rapid detection of *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* based on multiplex PCR. *Journal of Microbiological Methods*. 2011. **84**: 362–364
23. Leong-Morgenthaler P, Zwahlen M C, Hottinger H. Lactose Metabolism in *Lactobacillus bulgaricus*: Analysis of the Primary Structure and Expression of the Genes Involved. *Journal of Bacteriology*. 1991. **173** (6):1951-1957
24. Merck E. Manual de medios de cultivo. Alemania. 1994
25. Guayazán L. Evaluación de diferentes condiciones en el proceso de liofilización para la conservación de *Candida guilliermondii*. **Tesis Pregrado**. Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, 2010, 25p
26. Scharlau. Handbook of Microbiological Culture Media. Decima Edición.
27. Tabasco R, Paarup T, Janer C, Pelaéz C, Requena T. Selective enumeration and identification of mixed cultures of *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*, *L. acidophilus*, *L. paracasei subsp. paracasei* and *Bifidobacterium lactis* in fermented milk. *International Dairy Journal*. 2007. **17**: 1107-1114
28. Pedroza A., Quevedo B., Matiz A. Manual de laboratorio. Procesos biotecnológicos. Editorial Javegraf. Bogotá. Colombia.2006. 68-71p
29. Rubio A, Hernández M, Aguirre A, Potou R. Identificación preliminar *In Vitro* de propiedades probióticas en cepas de *S. cerevisiae*. *Revista MVZ Córdoba*. 2008. **13** (1): 1157-1169

30. Bedout C, Ayabaca J, Vega R, Méndez M, Santiago A, Pabon M L, Tabares A, Arango M, Restrepo A, Newell V. Evaluación de la susceptibilidad de especies de *Candida* al fluconazol por el método de difusión de disco. *Biomédica*. 2003 **23**(1): 31-37
31. Páez A. Manual de Laboratorio Microbiología Industrial. 2009. 28-30
32. Caracterización de la Leche. Sistemas de producción: descripción y diagnóstico. <http://agro.unc.edu.ar/~pleche/Trabajpract/Microsoft%20PowerPoint%20-%20practico%20calidad%20de%20l.pdf>. Consultado el 20 de Mayo de 2011
33. Alais C, Lacasa A. Ciencia de la Leche: principios de técnica lechera. Reverte. 1985. 873p
34. Quesos Forlase. <http://www.forlase.es/acerca/elaboracionmanchego.aspx>. Consultado el 16 de Mayo de 2011
35. Microbiología de la Leche. <http://www.fcv.unl.edu.ar/archivos/grado/catedras/tecnologialeche/informacion/microbiologia.pdf>. Consultado 30 Mayo de 2011