



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN



EVALUACION DE DIFERENTES LACTOBACILOS
EN LA ELABORACION DE UN PRODUCTO
TIPO YOGHURT

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
INGENIERO EN ALIMENTOS
P R E S E N T A :
ARNULFO SANCHEZ MENDOZA

DIRECTOR DE TESIS:
DRA. SARA VALDES MARTINEZ

COASESOR DE TESIS:
M.C. CLARA INES ALVAREZ M.

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX.

1992



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE

INTRODUCCIÓN	1
CAPITULO I	
Antecedentes	2
1.1.- La leche y su importancia	5
1.2.- Definición	5
1.3.- Valor nutritivo	7
1.4.- Composición Química	7
1.5.- Conservación de la leche	7
1.6.- Leche y productos lácteos elaborados	8
Capítulo II	
Generalidades	13
2.1.- Yoghurt, su historia	13
2.2.- Definición	13
2.3.- Microbiología y bioquímica del yoghurt	13
2.4.- Aspecto nutricional del yoghurt	16
2.5.- Cultivos lácticos comerciales	19
2.6.- Métodos de fabricación y clasificación del yoghurt	21
2.7.- Tecnología de elaboración del yoghurt batido	22
2.8.- Defectos del yoghurt	28
Capítulo III	
Metodología	31
Objetivos	31
Desarrollo experimental	33
3.- Origen de las cepas	33
3.1.- Aislamiento, purificación e identificación de las cepas a partir de yoghurt comercial (Fase I)	33
3.2.- Determinación de la concentración por espectrofotometría (Fase II)	33
3.3.- Efecto de la temperatura sobre su actividad metabólica (Fase II)	34
3.4.- Establecimiento de la mejor relación cuantitativa coco-bacilo (Fase III)	34
3.5.- Formulación del producto (Fase IV)	34
3.6.- Evaluación sensorial	36

Capítulo IV	
Análisis de Resultados	39
4.1.- Aislamiento, purificación e identificación de las cepas de yoghurt comercial (Fase I)	39
4.2.- Determinación de la concentración por espectofotometría (Fase II)	41
4.3.- Efecto de la temperatura sobre su actividad metabólica (Fase II)	41
4.4.- Establecimiento de la mejor relación cuantitativa coco-bacilo (Fase III)	41
4.5.- Formulación del producto (Fase IV)	45
4.6.- Evaluación Sensorial	49
Capítulo V	
Discusiones	56
Capítulo VI	
Conclusiones	62
Recomendaciones	64
Capítulo VII	
Bibliografía	66
Apéndice	71

FIGURAS

Capítulo II

Figura # 2.1.- Rutas involucradas con la utilización de la lactosa	15
Figura # 2.2.- Utilización del citrato y lactosa por cepas de estreptococo para la producción de sabor	17
Figura # 2.3.- Curvas de acidificación de bacterias lácticas (en leche esterilizada)	20
Figura # 2.4.- Diagrama de fabricación de yoghurt	23
Figura # 2.5.- Preparación de fermentos lácticos	26

Capítulo III

Figura # 3.1.- Cuadro Metodológico	32
------------------------------------	----

GRAFICAS

Capítulo IV

Gráfica # 4.1.- Variación del pH con respecto al tiempo a temperatura constante de 37°C	42
Gráfica # 4.2.- Variación del pH con respecto al tiempo a temperatura constante de 42°C	43
Gráfica # 4.3.- Variación del pH con respecto al tiempo a temperatura constante (Caldo Rogosa) 5C	44
Gráfica # 4.4.- Variación del pH con respecto al tiempo a temperatura constante (Caldo Rogosa) 130C	45
Gráfica # 4.5.- Variación del pH con respecto al tiempo a temperatura constante (Caldo Rogosa) 7	46
Gráfica # 4.6.- Variación del pH con respecto al tiempo a temperatura constante (Caldo Rogosa) SN2	46
Gráfica # 4.7.- Variación del pH con respecto al tiempo a temperatura constante (Caldo Rogosa) Lm	47
Gráfica # 4.8/4.9.- Variación del pH y %Ac. con respecto al tiempo (Leche de bovino) 7	48
Gráfica # 4.10/4.11.- Variación del pH y %Ac. con respecto al tiempo (Leche de Bovino) Lm	49
Gráfica # 4.12/4.13.- Variación del pH y %Ac. con respecto al tiempo (Leche de bovino) 5C	50
Gráfica # 4.14/4.15.- Variación del pH y %Ac. con respecto al tiempo (Leche de bovino) 130C	51
Gráfica # 4.16/4.17.- Variación del pH y %Ac. con respecto al tiempo (Leche de bovino) SN2	52

Gráfica # 4.18/4.19.- Variación del pH y %Ac. con respecto al tiempo (Preparación del Inóculo) Lm y 7	53
Gráfica # 4.20/4.21.- Variación del pH y %Ac. con respecto al tiempo (Producto Final) Lm y 7	54

TABLAS

Capítulo I

Tabla # 1.1.- Clasificación de la leche y sus derivados	9
Tabla # 1.2.- Conservación de la leche	10

Capítulo II

Tabla # 2.1.- Características principales de las bacterias del yoghurt	14
--	----

Capítulo IV

Tabla # 4.1.- Identificación de lactobacilos a partir de yoghurt comercial	39
Tabla # 4.2.- Identificación del estreptococo a partir de yoghurt comercial	40
Tabla # 4.3.- Determinación de la absorbancia para las cepas lácticas	40
Tabla # 4.4.- Determinación del Número Viable de Células	48
Tabla # 4.5.- Análisis Estadístico de la Evaluación sensorial	53

Introducción

La leche es un producto agrícola fácilmente fermentable por bacterias acidificantes debido a su buen balance de nutrientes, de ahí la importancia de conservar la leche y los productos que se elaboran a partir de ésta. Algunos de estos alimentos fermentados se han desarrollado en forma natural, pero con las tradicionales técnicas de selección y el desarrollo de la Microbiología como ciencia, algunas de las bacterias pudieron ser aisladas, seleccionadas y usadas como cultivos para la obtención de productos fermentados. Estas han sido desarrolladas comercialmente como cultivos iniciadores altamente específicos, principalmente en los productos lácteos, como el yoghurt. En general las bacterias ácido lácticas son seleccionadas en base a la rápida producción de ácido láctico (20, 24). El yoghurt resulta del desarrollo de determinados microorganismos que modifican los componentes normales de la leche. La lactosa se transforma parcialmente en ácido láctico. Las proteínas sufren una hidrólisis parcial que mejora su digestibilidad (65). Tiene una gran aceptación y existe en el mercado en su estado natural o bien adicionados con fruta, edulcorantes y/o saborizantes (9).

La leche es acidificada por medio de un proceso de fermentación producida por la mezcla del Streptococcus thermophilus y el Lactobacillus bulgaricus. Ambas especies tienen requerimientos nutricionales muy complejos, siendo la leche un producto que contiene los materiales necesarios para cubrirlos (38).

El sabor, acidez y consistencia característicos del yoghurt es lograda por la relación simbiótica de las bacterias que la fermentan. La acidez es uno de los mejores índices de aceptabilidad del consumidor hacia el yoghurt natural (20). El yoghurt de acuerdo a la concepción del mercado actual, debe ser un líquido suave, y de gel delicado; pero en ambos casos debe ser un producto uniforme, de textura firme, con la mínima sinéresis y con sabor característico (20).

Para la elaboración del yoghurt se emplea leche entera o descremada, libre de antibióticos. Se le adiciona leche en polvo o leche evaporada, cuyo propósito es mejorar la firmeza del producto y darle al gel una mayor resistencia a los daños mecánicos evitando así el desuerado durante el manejo normal del yoghurt (37, 65). La textura de dicho producto va a variar dependiendo de los sólidos de la leche y el contenido de la grasa. El grado de acidez puede variar según las cepas empleadas, la temperatura y el tiempo de incubación (47).

El yoghurt o productos tipo yoghurt, se consumen en cantidades significativas en México, por lo cual se realizan diversos estudios en torno a la elaboración de productos fermentados tipo yoghurt bajo diferentes formulaciones, todo esto para optimizar el proceso y bajar el costo (23).

En México el consumo nacional de yoghurt en 1980 fué de 15 mil toneladas, lo que representa el 8% del total de derivados lácteos, que se producen en el país. Para 1985 el consumo de este producto fué de 32 mil toneladas (una duplicación en la producción en sólo cinco años), esto representó el 13% de los derivados lácteos producidos en ese año. Las proyecciones para 1989 y 1995 son de 46 mil y 66 mil toneladas respectivamente (20,7).

En base a lo anterior cabe mencionar que el desarrollo de nuevos productos fermentados tipo yoghurt, es continua, así como la introducción de estos al mercado, ya que el estudio de las estadísticas y de las proyecciones esperadas de la Cámara Nacional de Productos Elaborados con Leche (CPAEL), partiendo de los datos registrados desde 1979 a 1985 muestran una tendencia gradual de consumo de yoghurt. Tomando en cuenta la proyección lineal que existe para este producto desde 1986 a 1995, con un coeficiente de relación de 0.98661 y una bondad de ajuste de 0.97314 (7,20,21), la cual muestra un crecimiento favorable para este tipo de productos, el estudio del proceso y de su optimización, continúan siendo importantes, por lo cual el presente

trabajo se abocará al estudio de diferentes cepas lácticas y su aplicación para la elaboración de un producto tipo yoghurt.

Capítulo I

ANTECEDENTES

1.1.- La leche y su importancia.

El problema del hambre y del abastecimiento de alimentos datan desde los inicios de la historia del hombre, siendo, la alimentación vital para la subsistencia de la vida. Sin embargo, en la actualidad la mayoría de la población tiene una mala alimentación con diferentes grados de desnutrición, debido a que en algunas regiones del mundo no se produce la cantidad suficiente de alimentos como: carne, leche, cereales, frutas y hortalizas, y su nivel de desarrollo está muy relacionada con dicha producción de proteína animal que representa una función importante en las diferentes sociedades. La leche es un producto animal que el humano ha explotado para su subsistencia, es producida para cubrir los requerimientos nutricionales de las crías para quienes está destinado, su composición es relativamente constante, aunque existe una serie de factores que influyen en su producción y composición (37).

1.2.- Definición

La "leche de vaca" se ha definido como la secreción, excluyendo el calostro, que se puede obtener mediante los métodos normales de ordeño de la glándula mamaria lactante de vacas sanas. Es una mezcla compleja que se presenta en tres grados de dispersión:

- a) La lactosa, así como los minerales, sobre todo calcio y fósforo, enzimas y vitaminas hidrosolubles y varios compuestos orgánicos secundarios como el ácido láctico y cítrico existentes como una verdadera solución.
- b) Todos los componentes de la caseína se hallan en forma de micelas dispersas coloidalmente.
- c) Los glóbulos de la grasa se encuentran en un estado de emulsión. Su característico color opaco, "lechoso", es debido principalmente a la dispersión de sus proteínas y sales de calcio. Aparte de las condiciones patológicas de las vacas que originan la producción de la leche (1,2,16,18,37).

1.3.- Valor Nutritivo

La importancia de la leche se debe a su alto valor nutritivo, ya que sus componentes se encuentran en forma y proporción adecuadas. El desarrollo de la ciencia de la nutrición permitió identificar la importancia de la leche como una buena fuente de proteínas de alta calidad, calcio, riboflavina y vitamina A (37). La leche contiene proteínas superiores, no solo porque éstas encierran todos los aminoácidos esenciales, sino también por que la leche posee además cantidades de otros aminoácidos que se encuentran en pequeñas cantidades en las proteínas vegetales. La grasa es una fuente rica de energía, aproximadamente un 4%, y rinde 9 kcal/g (60).

Los carbohidratos son otro elemento que aporta energía, 4 kcal/g. La lactosa es el azúcar de la leche y está constituida por partes iguales de glucosa y galactosa. Se digiere y se asimila un tanto menos rápidamente que la mayoría de los otros azúcares. Por otra parte la leche es una fuente importante de galactosa, azúcar poco común en forma aislada, que está relacionada con la síntesis de cerebrosidos (60).

Los minerales de la leche y sus productos asegura una ingestión adecuada de calcio y contribuye con cantidades sustanciales de fósforo, potasio, sodio, cloro, magnesio y azufre. Los minerales tales como el zinc, cobre, cobalto también se encuentran en la leche (15,37).

En cuanto al aporte vitamínico de la leche, la ingesta de raciones alimentarias (250 ml), se reconoce sobre todo las vitaminas A, B₁ y B₂ las que se consideran dentro del valor nutritivo de la leche. Sin embargo, no deben despreciarse el aporte de ácido pantoténico, vitamina B₁₂ y vitamina D ya que estos factores no son abundantes en la alimentación habitual del hombre (37).

1.4.- Composición Química

Hablar del contenido cuantitativo de los constituyentes de la leche es aventurado, debido a que estos no son muy estables considerando los puntos antes mencionados; pero lo que si se puede decir es que la leche es una mezcla de sustancias definidas tales como: carbohidratos menores, lípidos, proteínas, sales minerales, vitaminas, etc., que existen en emulsión, suspensión y solución.

La composición media de la leche normal de vaca es la siguiente:

Extracto seco 12.5%	}	Extracto seco desgrasado 9.0%	}	Agua 87.5%	
				Grasa 3.5%	
				Proteínas 3.5%	
				Lactosa 4.7%	
				Sales	
				minerales 0.8%	
				100.0%	

La leche contiene además enzimas (fermentos), vitaminas y ácidos libres (60).

Proteínas:

Las proteínas son constituyentes fundamentales de la leche. La caseína, componente principal de la proteína láctea (80%) y que no se encuentra en ningún otro producto aparte de la leche, tiene una atención preferente por pasar a formar parte del queso y por sufrir transformaciones en muchos procesos tecnológicos (60).

Lípidos:

La cantidad de lípidos o grasa que contiene la leche y su composición son muy diversos en las distintas razas bovinas. La alimentación de las vacas ejerce también una gran influencia en este sentido. Los lípidos de la leche se clasifican en tres grupos que son:

- 1.- La materia grasa propiamente dicha, que son los triglicéridos que forman el 96% del total de los lípidos de la leche.
- 2.- Fosfolípidos que constituyen el 0.8% a 1.0% de los lípidos.
- 3.- Sustancias insaponificables, que constituyen aproximadamente el 1% (57).

Carbohidratos:

Los carbohidratos los podemos encontrar, libres en solución en fase acuosa de la leche y unidas principalmente con las proteínas. En la leche se encuentran la lactosa, polisacáridos, glucosaminas, etc.. La lactosa es el carbohidrato dominante, es un disacárido compuesto de los monosacáridos: glucosa y galactosa, se encuentran en solución en forma libre y en concentraciones importantes en las leches; es también el componente más abundante, más simple y más constante en la leche (57,60).

Minerales:

En la leche los minerales pueden variar de 3 a 10 g por litro. El contenido de minerales varía poco según la raza, la alimentación del animal, la época de lactación, tienen poca influencia en el contenido de sales. El fósforo y el calcio, forman parte esencial de la porción mineral-coloidal de la leche. Aunque también el magnesio en pequeñas cantidades. Asociado a estos minerales se encuentra el ácido cítrico (57).

Ácidos Orgánicos:

El ácido cítrico se encuentra en la leche de vaca en 1.8%, este ácido interviene en el equilibrio de calcio en las micelas. La leche contiene normalmente otros ácidos orgánicos en muy pequeñas cantidades, como es el ácido neuramínico, ácidos alifáticos de bajo peso molecular, especialmente los ácidos fórmico, acético y láctico en la proporción de 0.04, 0.038 y 0.55% respectivamente (57).

Enzimas:

En la leche se encuentran varias enzimas relacionadas con el grupo de albúminas, con las cuales generalmente floculan. En disolución acuosa son poco estables y muy sensibles a ciertas influencias externas, en especial a las temperaturas elevadas se inactivan a temperaturas superiores a 60°C. Algunas de estas enzimas se encuentran concentradas en la membrana de los glóbulos de la grasa entre las que tenemos a las reductasas, fosfatasa, proteasas y catalasas (37).

Vitaminas:

Las vitaminas son principios activos indispensables para el curso normal de los procesos metabólicos del hombre y de los animales. El contenido vitamínico de la leche puede ser muy variado. Depende sobre todo, del estado sanitario de los animales y del tipo y calidad de la alimentación. La leche figura entre los alimentos que contienen la variedad más compleja de vitaminas (37).

1.5.- Conservación de la leche.

La leche resulta muy perecedera, pues su estado líquido y su composición nutritiva la hacen muy propensa a alterarse por la acción de los microorganismos. La leche puede encerrar desde el principio organismos perjudiciales para el hombre, como los de la tuberculosis (*Mycobacterium tuberculosis*), entre otros o adquirir gérmenes nocivos cuando se manipula (1,28). También se debe protegerla de las alteraciones de origen químico y fisicoquímico, por lo cual se aplican diferentes procedimientos de conservación:

(1,28). También se debe protegerla de las alteraciones de origen químico y fisicoquímico, por lo cual se aplican diferentes procedimientos de conservación:

Procedimientos Físicos:

La modificación de la temperatura es un parámetro importante pues como todos los seres vivos, los microorganismos reaccionan a las modificaciones de la temperatura del medio en que viven, y se caracterizan por:

- una temperatura óptima de desarrollo que favorece el máximo de multiplicación.
- una temperatura mínima de desarrollo, por debajo de la cual no se multiplican.
- una temperatura máxima de desarrollo, por encima de la cual el microorganismo muere (56).

Procedimientos Químicos:

Determinadas sustancias, añadidas al medio, dificultan el desarrollo de los microorganismos o provocan su destrucción. Otras actúan energicamente, aún a bajas concentraciones. Siendo éstos los antisépticos como: agua oxigenada, ácido bórico, ácido salicílico, etc. (65). Estos procedimientos son peligrosos e incluso están prohibidos como métodos de conservación en México, tanto en la leche como en los productos derivados, según la Norma Oficial Mexicana (45).

Procedimientos Biológicos:

En este caso se favorece el desarrollo en el producto a conservar de ciertos gérmenes capaces de limitar el crecimiento de otros microorganismos que atacan a los componentes del producto cuya integridad quiere conservarse. Los métodos biológicos se usan raras veces de manera aislada, por modificar notablemente el desarrollo de la leche (59).

1.6.- Leche y productos lácteos elaborados.

Las formas de usar la leche son muchas y variadas: desde la leche líquida sin cambio aparente de composición, pero tratada por el calor para hacerla bacteriológicamente inócua y dotarla de la propiedad de conservarse, que haga posible su transporte y distribución, hasta la extracción de los distintos componentes como la grasa, lactosa y caseína, es evidente que los distintos productos lácteos difieren mucho entre sí en cuanto a valor nutritivo (37). En la tabla 1.1, se muestra de manera general la clasificación de las leches y sus derivados.

TABLA 1.1

CLASIFICACION DE LAS LECHE Y SUS DERIVADOS

LECHE BRONCA

LECHE FLUIDA

- Leche Pasteurizada

- Leche Rehidratada

LECHE INDUSTRIALIZADA

- Leche en Polvo

- Leche Evaporada

- Leche Condensada

DERIVADOS LACTEOS

- Queso

- Fresco

- Crema

- Maduro

- Helados

- Mantequilla

TABLA 1.2
TIPOS DE CONSERVACION DE LA LECHE

PROCESO	TRATAMIENTO	FINALIDADES	VIDA DE ANAQUEL
PASTEURIZACION	TERMICO - LENTA: 63°/30 MIN. - RAPIDA: 85°/15 SEG.	DESTRUCCION DE BACTERIAS PATOGENAS POR ACCION DE LA TEMPERATURA	HASTA UNA SEMANA
ESTERILIZACION	TERMICO: - 121 °C /2 SEG.	DESTRUCCION DE BACTERIAS PATOGENAS POR ACCION DE LA TEMPERATURA "ESTERILIZACION COMERCIAL"	3 MESES A TEMPERATURA AMBIENTE
EVAPORACION Y/O CONDENSACION	TERMICO - PRECALENTAMIENTO 180 °C /15 MIN.	ALTA CONCENTRACION DE AZUCAR. BAJA ACTIVIDAD DE AGUA (AW)	POR UN AÑO
DESHIDRATACION	SECADO EN CILINDROS 150 °C /SEG. SECADO POR ASPERSION 200 °C /SEG	BAJA ACTIVIDAD DE AGUA (AW) ALTA CALIDAD BACTERIOLOGICA	1 A 2 AÑOS EN CONDICIONES ASEPTICAS
FERMENTACION	POR ADICION DE MEZCLAS DE CULTIVOS LACTICOS ACTIVADOS E INCUBADOS DE 2 A 8 HORAS.	ACIDIFICACION DEL MEDIO CONSERVACION DE SU VALOR NUTRITIVO	POR 25 DIAS

La descomposición rápida de la leche no elaborada ha inducido al hombre desde tiempos muy antiguos a idear medios para preservar algunos o la mayor parte de los nutrientes de la leche. La bacteriología y la tecnología moderna han descubierto muchos modos de hacerla inócua y estable (37). En la tabla 1.2, se resume los diversos tratamientos que se utilizan para la conservación de la leche.

De manera general se presenta una breve descripción de los tratamientos a la que es sometida la leche fluida para su conservación y en algunos casos prolongar su vida de anaquel.

1.- Leche pasteurizada.

La pasteurización es un tratamiento que consiste en calentar la leche a una temperatura suficientemente alta, durante un tiempo adecuado, para destruir los gérmenes patógenos y debilitar otros, de manera que el producto pueda transportarse, distribuirse y consumirse sin peligro alguno (1,65).

2.- Leche esterilizada.

En el sentido bacteriológico, la esterilización es un proceso que debería asegurar la destrucción de todos los microorganismos, pero en varios países se admiten que no siempre se

alcance este objetivo. Es el producto que puede contener un residuo mínimo de esporas termorresistente no patógenas. Se trata de un proceso continuo, llamado tratamiento a temperatura ultraelevada (UHT-Ultra-High-Temperature) (37).

3.- Leche evaporada o condensada.

Es la leche de la cual se ha eliminado parte del agua y se ha tratado térmicamente para hacerla bacteriológicamente inócua y estable (15). El reglamento general de salud (18 de Enero de 1988), en su capítulo VII artículo 326 da la siguiente definición: Se entiende por leche evaporada, el producto líquido obtenido mediante la evaporación de la leche entera pasteurizada, cuya concentración deberá alcanzar un punto en que contenga no menos de 7.9% de grasa y no menos de 25.9% de sólidos totales, provenientes de la leche utilizada (51).

La leche condensada azucarada, es un producto que logra su estabilidad bacteriológica, no por tratamiento térmico, sino agregando sacarosa, que actúa como bacteriostático (37). Según el reglamento general de salud (18 de Enero de 1988), en su capítulo VIII artículo 331 dice Se entiende por la leche condensada azucarada, el producto líquido o semilíquido obtenido mediante evaporación parcial o presión reducida de la leche de vaca limpia y pasteurizada, a la cual se le ha mezclado sacarosa.

4.- Deshidratación (leche en polvo).

Los microorganismos no pueden reproducirse en ausencia del agua, por ello la eliminación virtual de ésta hace que se conserve mucho tiempo. Los métodos modernos de deshidratación están basados en dos principios técnicamente diferentes: (65).

- a) Deshidratación por el método de cilindros secadores. La leche previamente calentada, se extiende en delgada capa, en la superficie lisa de uno o dos cilindros que giran y se calientan al vapor; la película de leche deshidratada se raspa con una cuchilla a medida que se forma y luego se muele para convertirla en polvo (1,37).
- b) Deshidratación por aspersión. Por este método la leche concentrada se "atomiza" transformándose en una llovizna como niebla en medio de una corriente de aire caliente. Las menudas partículas de leche pierden la humedad casi instantáneamente y caen al fondo de la cámara secadora en forma de pequeños granos (15).

5.- Fermentación (Leches fermentadas).

La leche de vaca se autoacidifica después de algún tiempo y el hombre se ha servido de esta propiedad desde hace siglos para la preparación de incontables y sabrosas formas de leche acidificada y fermentada, evitando así a la leche un indeseable deterioro. Ahora sabemos que la acidificación es debida a la acción de microorganismos productores de ácido que convierten el azúcar de la leche, o la lactosa, en ácido láctico (como el yoghurt que se inocula con cepas termofílicas) y que si están presentes ciertas levaduras y posiblemente bacterias específicas, la lactosa se fermenta transformándose también en alcohol (como el kefir que puede contener 0.9 a 1%, además alcohol etílico). Las leches cultivadas pueden definirse como productos rígidamente controlados en su fabricación y que poseen una flora específica bien conocida, completa o predominantemente formada por estreptococos, lactobacilos y algunas veces levaduras (30,42,59).

Capítulo II

GENERALIDADES

2.1.- Yoghurt, su historia.

Los productos fermentados de leche, datan desde hace 2000 A.C., están disponibles en muchas formas en muchos países del mundo. El modelo usado varía de país a país y dentro del área geográfica de uno mismo (27). Los productos fermentados de leche reciben un nombre colectivo tales como yoghurt, ymer, kefir, etc. El nombre genérico de los productos fermentados de leche se deriva de hecho de cultivos iniciadores. El origen de los productos fermentados es del Cercano Oriente y subsecuentemente ganó popularidad en el Oeste y Europa Central. Una de las leches fermentadas más importantes es la leche ácida conocida con el nombre de yoghurt (leche cuajada búlgara), tiene su origen en Turquía y regiones orientales de los balcanes (40).

2.2.- Definición:

El yoghurt es un producto lácteo fermentado que resulta del crecimiento de las bacterias Lactobacillus bulgaricus y Streptococcus thermophilus, y se caracteriza por una textura suave y delicado aroma (38). Para algunos otros autores es un producto que se obtiene a partir de leche tipificada o desnatada, sembrada con un cultivo láctico y concentrada por evaporación o por adición de leche en polvo (60). Este producto es también definido por la Secretaría de Salud de México, en el reglamento general de salud (18 de Marzo de 1988), en su capítulo XVI artículo 382.- Se entiende por yoghurt el producto obtenido de la mezcla de la leche entera, semi-descremada o descremada con leche descremada deshidratada, sometida a un proceso de pasteurización y coagulada por la fermentación, mediante la inoculación con bacterias Lactobacillus bulgaricus y Streptococcus thermophilus. El producto final deberá contener los microorganismos señalados vivos. Su acidez estará comprendida entre 0.8% y 1.8%, expresado en ácido láctico y no contendrá conservadores (51,54).

2.3.- Microbiología y Bioquímica del yoghurt.

El cultivo para el yoghurt debe constar de las especies de bacterias termófilas siguientes: Lactobacillus bulgaricus y Streptococcus thermophilus. Ambas bacterias viven en el yoghurt en simbiosis (vida asociada de organismos distintos con beneficio mutuo). Esta simbiosis exige una determinada proporción entre cocos y bacilos en el cultivo (60). El Lactobacillus bulgaricus, es un microorganismo altamente productor de ácido láctico, éste proporciona aminoácidos originados de la ruptura de las proteínas de la leche, los cuales estimulan el desarrollo del Streptococcus thermophilus, éste a su vez produce ácido fórmico, el cual estimula al Lactobacillus bulgaricus (20,65). Como consecuencia de la acidificación las proteínas de la leche se coagulan y precipitan (47).

Al comienzo de la preparación, el pH de la leche es favorable a los estreptococos los cuales predominan poniendo en marcha la fermentación láctica. La acción caseolítica de los lactobacilos estimula el desarrollo de los estreptococos. Por lo consiguiente la temperatura de incubación influye sobre la proporción entre ambas especies bacterianas. Lo mismo cabe decir respecto a la duración de la incubación y cantidad sembrada (65).

En la tabla 2.1, se muestran algunas de las características de las cepas lácticas para la elaboración de yoghurt (54,62).

El único carbohidrato que se presenta en la leche es la lactosa, el cual satisface los requerimientos nutricionales de las cepas lácticas, aunque la componen también las proteínas, minerales y vitaminas (60). Basándose en el uso de la lactosa, los microorganismos lácticos han sido clasificados como homofermentativos y heterofermentativos. Los microorganismos homofermentativos producen 1.8 moles de ácido láctico por mol de glucosa, mientras que los heterofermentativos generan productos diferentes al ácido láctico como el etanol, acetato, glicerol, manitol y dióxido de carbono (36).

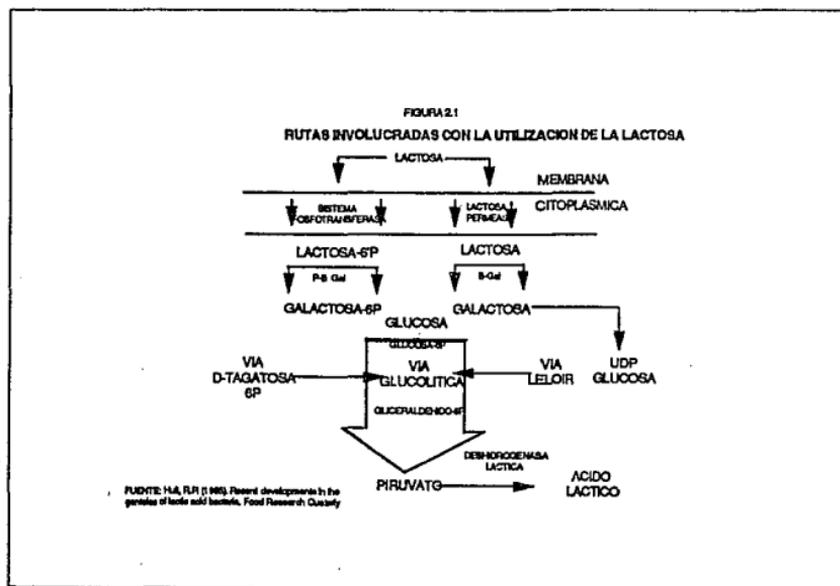
TABLA 2.1
CARACTERÍSTICAS PRINCIPALES DE LAS BACTERIAS DEL YOGHURT

CARACTERÍSTICAS	STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS	LACTOBACILLUS BULGARICUS
CATALASA	-	-----
GRAM	+	+
MORFOLOGIA	CELULAS ESFERICAS U OVOIDES, OCURREN EN PARES O CADENAS LARGAS.	BASTONES A VECES CON FORMAS LARGAS INDIVIDUALES O EN PARES.
ATMOSFERA	ANAEROBIO FACULTATIVO	ANAEROBIO FACULTATIVO
TEMPERATURA DE DESARROLLO	OPTIMA DE 40°C-45°C, SE DESARROLLA A 50°C, NO SE DESARROLLA A 55°C NI POR DEBAJO DE 20°C.	OPTIMA A 45°C, SE DESARROLLA ENTRE LOS 50°C A 52°C, NO CRECE A 15°C.
SENSIBILIDAD AL CALOR	SOBREVIVE A 65°C, POR 30 MINUTOS.	-----
SENSIBILIDAD AL NaCl	NO SE DESARROLLA A 2.0%	-----
FERMENTACION		
FRUCTOSA	+	+
GALACTOSA	+	+
GLUCOSA	+	+
LACTOSA	+	+
MALTOZA	+	-
SACAROSA	+	+
ROTACION OPTICA DEL ACIDO LACTICO	L(+)	D(-)
SENSIBILIDAD AL ANTIBIOTICO (ML/L.ECHB)	FENICILINA 0.05 U.I. ESTREPTOMICINA 250 mcg CLOROTETREICICLINA 120 mcg CLORANFENICOL 50 mcg	0.5 U.I. 500 mcg 120 mcg 50 mcg

FUENTE: RUIZ, M.A.(1990). FABRICACION DE YOGHURT. MEMORIAS DEL CURSO: TECNOLOGIA DE LACTEOS (PUAL). STAMER, J.R.(1979). THE LACTIC ACID BACTERIA MICROBES OF DIVERSITY. FOOD TECHNOLOGY.

Ambas bacterias transforman la lactosa en ácido láctico, el cual es responsable de la formación del coágulo (a un pH de 4.65 se coagula la mayor parte de las fracciones de la caseína), firmeza y sabor ácido característico del yoghurt (20,60). La formación del ácido láctico

por ambas especies es a través de la vía Embden Meyerhof. La lactosa no se usa directamente en el proceso fermentativo por las bacterias ácido lácticas, es convertida primero por hidrólisis en glucosa y galactosa por la enzima beta-galactosidasa (lactasa), llevada a cabo preferentemente por el *Lactobacillus bulgaricus*. La glucosa es fermentada a ácido láctico, con un paso terminal de conversión de piruvato a lactato, realizada por varias enzimas, la lactosa es tomada como lactosa-fosfato (Lactosa-P), en la ruta de la fosfoenolpiruvato dependiente del sistema fosfotransferasa (PEP:PTS). La beta-D-fosfogalactosidasa (beta-P-Gal), entonces es hidrolizada la lactosa-P a glucosa y galactosa-6-P, donde la glucosa es normalmente metabolizada por la ruta de la glicolisis y la galactosa-6-P es metabolizada por la ruta tagatosa-difosfato (31). El *Streptococcus thermophilus*, efectúa esta conversión por medio de la beta-galactosidasa, pues carece de las enzimas capaces de fermentar a la galactosa (20). La galactosa no es fermentada directamente, pero es convertida en glucosa por la enzima galactosa 1-fosfato uridintransferasa, con la presencia de un agente acelerador el uridin difosfato de glucosa (UDPG), como se muestra en la figura 2.1 (39).



El aroma característico del yoghurt fué atribuido al principio exclusivamente al desarrollo del estreptococo. Sin embargo, se insistió recientemente en la importancia de los bacilos al respecto. El principal componente responsable del sabor del yoghurt es el acetaldehído (CH_3CHO). Las vías degradativas del citrato y lactosa es a través de un intermediario común, el piruvato. El piruvato puede ser convertido en una variedad de combinaciones de sabor. La figura 2.2, muestra la vía degradativa del citrato y lactosa a través del piruvato. El acetaldehído es un compuesto del sabor, importante en el yoghurt, normalmente resulta del desecho del piruvato (36). Se ha observado que el acetaldehído puede ser producido por el estreptococo del sustrato timidina. La conversión de la timidina a acetaldehído es vía a una envolvente reacción secuencial de la enzima timidina fosforilasa, desoxiribodolasa y desoxirubomutasa (36). Este es producido como un subproducto de la vía de Embden-Meyerhof (que es la principal ruta del Streptococcus thermophilus), o bien a partir de la treonina (ruta preferida por el Lactobacillus bulgaricus). Pues ambas bacterias carecen de la enzima alcohol deshidrogenasa para transformar el acetaldehído en etanol. Otros metabolitos que ayudan al sabor del yoghurt son el diacetilo ($\text{CH}_3\text{COCOCH}_3$) y la acetofina, aunque estos tienden a desaparecer con rapidez por lo que el acetaldehído se encuentra en mayor proporción (20,40,54).

El uso de hidrolizados de lactosa en la leche para la producción de productos lácticos, tiene muchas aplicaciones. La lactosa es un disacárido con un relativo bajo nivel de solubilidad y edulcorante, el cual se encuentra en su forma natural en la leche de los mamíferos. Esta constituido por los monosacáridos, glucosa y galactosa que son más solubles y edulcorantes que la lactosa (35). Con la eliminación de la barrera restrictiva de la lactosa y la fácil disponibilidad de la glucosa, un azúcar que es fácilmente fermentable por una amplia variedad de microorganismos (64). Para su uso en leche o derivados lácteos es aprovechada en fermentaciones poco ácidas, para conservar la función caseolítica de los cultivos iniciadores, los cuales aseguran una buena producción de acidez y biomasa. Los microorganismos iniciadores en las fermentaciones lácticas son capaces de fermentar hidrolizados de lactosa, donde la mezcla de glucosa/galactosa son generalmente más fácilmente fermentables, resultados experimentales han mostrado que la proporción de producción de ácido puede ser aumentado en el yoghurt (35).

Los beneficios, mejoras y otras consideraciones por el uso de hidrolizados de lactosa en el yoghurt son las siguientes:

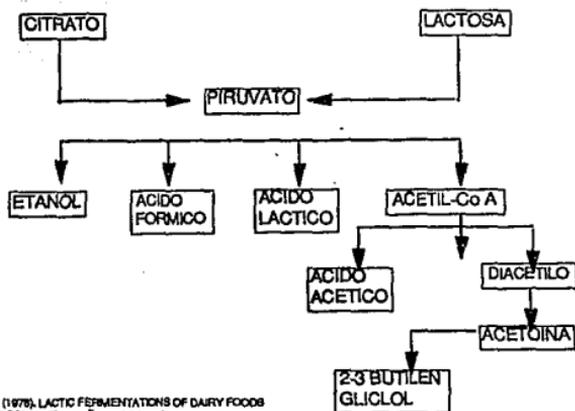
- a) el tiempo requerido para alcanzar los valores de pH deseados reducen por 40 minutos, del tiempo total de la fermentación
- b) el sabor fuertemente ácido del yoghurt es iniciado por el dulzor impartido por la glucosa,
- c) el consumo de productos lácteos con lactosa hidrolizadas puede reducir la reacción a la intolerancia de la lactosa, mejorando de manera general la alimentación de los consumidores (11).

2.4.-Aspecto nutricional del yoghurt.

El yoghurt es un excelente alimento. Sin embargo, como muchos productos fermentados de la leche tiene una interrelación que concierne a las bacterias o la posible influencia terapéutica de los productos metabólicos, lo cual lo hace un alimento interesante (38).

FIGURA 22

UTILIZACION DEL CITRATO Y LACTOSA POR CEPAS DE ESTREPTOCOCCO PARA LA PRODUCCION DE SABOR



FUENTE: KILARA, A (1978). LACTIC FERMENTATIONS OF DAIRY FOODS AND THEIR BIOLOGICAL SIGNIFICANCE. Journal dairy sci.

Al igual que otros productos lácteos fermentados estimula las secreciones del aparato digestivo, aumenta la digestión y la absorción de las proteínas, disminuye el riesgo de acumular colesterol en la sangre, eleva el ácido láctico y reduce moderadamente la lactosa, por lo que las personas con deficiencias de la lactasa (enzima necesaria para digerir la leche), lo toleran mejor que a la leche (21).

Los microorganismos lácticos modifican significativamente las proteínas, lípidos y la lactosa en los productos lácteos y producen una deseable calidad. Sin embargo otras modificaciones menos obvias y su significancia no son entendidas. Esas modificaciones competen a la producción de antibióticos, vitaminas y enzimas por la flora microbiana. Numerosos microorganismos lácticos producen antibióticos naturales por ejemplo: el *Streptococcus lactis* produce nisina, el *Lactobacillus bulgaricus* produce bulgaricanos, el *Lactobacillus acidophilus* produce acidofilina, acidolina, etc. Tales antibióticos son inhibitorios de bacterias gram positivas y negativas, bacterias patógenas y no patógenas (36).

Grasa

El valor energético del yoghurt es muy similar al de la leche del cual fué hecho. Aun así los cultivos lácticos poseen la lipasa poniendo como evidencia de que los lípidos son parcialmente degradados. Sin embargo, en ensayos realizados con la lipasa activada en cultivos lácticos, no demostró que se activaran los lípidos en los productos lácteos. Los cultivos iniciadores tienen una limitada capacidad para hidrolizar la grasa. La presencia de ácidos grasos en el yoghurt teóricamente no ayuda a la digestión o absorción de las grasas y de hecho pueden dar productos pobres en propiedades organolépticas. Por lo cual la dirección de la producción es ahora hacia el yoghurt bajo en grasa (26).

Carbohidratos

Mientras que la leche contiene una insignificante cantidad de ácido láctico el resultado del proceso de la fermentación es la conversión de la lactosa en ácido láctico. Las personas que sufren de intolerancia a la lactosa no parecen presentar síntomas cuando consumen yoghurt, debido a la ausencia de la enzima lactasa. Da como resultado que no se aproveche en el proceso de la digestión de los azúcares simples. Al consumir el yoghurt parece ser que las mismas bacterias suministran la lactasa necesaria para la hidrólisis del azúcar aún dentro del tracto intestinal (20,26).

El ácido láctico puede ser benéfico por:

- a) actúa como conservador del producto,
- b) contribuye con una moderada acidez y un sabor refrescante,
- c) influye en las propiedades físicas de coagulado de la caseína y facilita la digestibilidad y
- d) mejora la utilización del calcio y de otros minerales. Esta energía tiene un valor de 15 KJ/G (26).

Proteínas

Aunque el contenido total de aminoácidos y la composición no difieren substancialmente de la leche con la cual fué hecho, es pretender ir más allá de los beneficios de los productos lácteos. El yoghurt resulta muy atractivo pues tiene una mayor digestibilidad de las proteínas, que la leche natural, por la peptonización de la caseína (debido a una fina coagulación), confiriéndoles así un mayor valor biológico (21,40). Los productos lácticos tienen un incremento de concentración de aminoácidos debido a la proteólisis por el Lactobacillus lactis. La caseína alfa y beta muestran varios OH del aminoácido Serina esterificados con ácido fosfórico, como este ácido está ionizado forma complejos S de tipo de sales de calcio Ca^{2+} . Debido a las propiedades químicas de la caseína, la ingestión de la leche constituye una fuente adecuada de aminoácidos, de fosfatos y calcio (20,56).

Vitaminas

La cantidad de las diferentes vitaminas de la leche con la cual se prepara el yoghurt, pueden de hecho ser influenciadas por el tratamiento térmico que recibe. Aunque más significativamente puede ser la influencia de la cantidad y tipo de inóculo, las subsiguientes condiciones de incubación, en la manufactura y almacenaje del producto terminado. Mientras que algunas bacterias lácticas requieren de la vitamina B para su crecimiento, algunos

microorganismos son capaces de sintetizar, durante la fermentación algún tipo de vitaminas. Por lo tanto es imposible evitar los valores característicos del contenido de vitaminas en los productos lácteos por los factores antes mencionados. Sin embargo, se estudió el enriquecimiento del yoghurt con vitamina C porque el organismo humano no almacena esta vitamina y por lo tanto debe ser aportada por la dieta. Además se considera a dicho alimento un buen vehículo para suministrar el nutriente. La vitamina sintética agregada no afecta la actividad de los cultivos o la relación entre los bacilos y estreptococos. Además el desmejoramiento del aspecto, consistencia, olor y sabor es mínimo (3,21,26).

2.5.-Cultivos lácteos comerciales.

Los cultivos lácteos pueden presentar problemas de un lento crecimiento debido a la presencia de antibióticos (por ejemplo la penicilina) o también por bacteriófagos. Por lo que se requiere extremar las medidas sanitarias desde la recepción de la leche, efectuando las pruebas de plataforma (acidez, estabilidad, antibiótico, lactocoagulación, etc.), así como en la planta y de aquellas posibles fuentes de contaminación (20,54). Para la selección de las cepas lácticas, generalmente se toman las siguientes consideraciones:

- 1.- La temperatura de crecimiento y su actividad.- El grado óptimo no siempre es igual para las diferentes actividades; por ejemplo algunos estreptococos lácteos dan un aroma más pronunciado a una temperatura inferior a la óptima para su desarrollo y producción de ácido. Se debe considerar la temperatura límite de crecimiento y la resistencia al calentamiento (1).
- 2.- Acidificación.- La aptitud de una cepa determinada no se mide solamente por el máximo de acidez que pueda producir, es necesario también conocer la velocidad de acidificación. Las curvas de la figura 2.3, ilustran ejemplos de diferentes niveles de desarrollo de acidez. El Streptococcus thermophilus, produce después de 10 horas a 42°C, mucha más acidez que el Lactobacillus helveticus, la primera cepa esta cerca del máximo, mientras que la segunda tras 30 horas, ha producido una más rápida (1).
- 3.- Producción de aroma.- Las bacterias fermentadoras del ácido cítrico, se les conoce también como bacterias productoras de sabor. Fermentan al ácido cítrico de la leche y producen diacetil, ácidos volátiles y dióxido de carbono. Todos los compuestos afectan el sabor de los cultivos lácteos y el sabor de los productos a los que se les añade cultivos. La acumulación de compuestos saborizantes ocurre solamente cuando el pH es menor a 5.2, el pH óptimo para la producción de estos compuestos es aproximadamente 4.3 (58).
- 4.- Bacteriófagos.- Los bacteriófagos son virus bacterianos que desintegran ciertas células bacterianas susceptibles. La industria de los productos lácteos ha tenido dificultades considerables con la acción de los bacteriófagos, pero por otro lado, cada día se conoce más acerca de la acción de las bacterias y de los métodos para controlarlos (58).

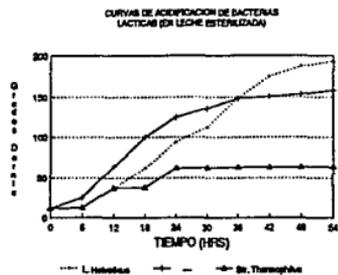
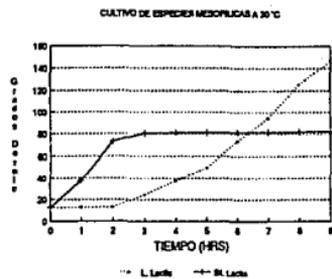


FIGURA 2.3



FUENTE: Nish Oki, (1978): La ciencia de la leche
Principios de tecnología Láctea. Ed. C.E.C.S.A.

Prácticas preventivas como la rotación de cultivos, uso de cultivos resistentes y medios inhibitorios de fagos para la propagación de los inóculos. La ingeniería genética ofrece perspectivas muy interesantes para la obtención de cultivos estables resistentes a fagos (20).

Los cultivos bacterianos más usados son los cultivos lácticos mesófilos aromáticos, que son esenciales en la elaboración de varios tipos de quesos, crema agria, etc. Para la elaboración de productos fermentados como yoghurt, la leche búlgara, etc. se utilizan cultivos mesófilos homofermentativos (10). La presentación en forma comercial de los cultivos es:

- Como indicador y se presenta en forma de cultivo liofilizado.
- Como líquido concentrado intermedio (para su uso directo en el cultivo intermedio).
- Como líquido directo a tanque fermentador.
- Como líquido concentrado directo al tanque fermentador y se presenta en forma de liofilizado. La principal diferencia de las presentaciones mencionadas es por la concentración de bacterias que contiene. Aunque esto va a depender también del fabricante (10,54).

2.6.- Métodos de fabricación y clasificación del yoghurt.

De los productos fermentados de leche, el yoghurt es el más conocido y más popular en casi todos los rincones del mundo. La fabricación del yoghurt debe efectuarse procurando mantener un equilibrio adecuado entre el desarrollo de ambos gérmenes, con el objeto de obtener un producto final suficientemente ácido y aromático (40).

Se han desarrollado dos formas de fabricación de yoghurt:

El método de lote o batch, que consiste en una serie de etapas de tratamiento previo a la leche, donde el inóculo se adiciona a un tanque en donde la temperatura se controla mediante tanques con agua. El tanque debe estar provisto de paletas que deberán romper y agitar delicadamente el coágulo al final de la fermentación (20).

El método continuo, es una técnica de fabricación de yoghurt que se basa en el principio de la fermentación continua y que se aplica a muchas industrias. El elemento esencial de la instalación es una cuba de siembra en la que se encuentra permanentemente el cultivo en fase logarítmica de crecimiento. Esta cuba es alimentada por una corriente de leche tratada por procedimiento UHT. El vaciamiento de la leche ya fermentada es igualmente continuo gracias a una máquina llenadora automática (40). El yoghurt es producido en forma de un líquido altamente viscoso o batido, aunque también se puede producir como postres congelados.

El yoghurt se clasifica en tres tipos:

- Yoghurt rígido (o duro).- El cual es empacado inmediatamente después de la inoculación partiendo de un volumen y es incubado en los empaques, donde se lleva a cabo la fermentación (27).
- Yoghurt batido o cremoso.- Es batido e inoculado en un tanque. Después de la inoculación, es enfriado antes de empacarlo. En algunos casos son usadas gomas para espesar el producto para superar el tenue corte causado por el mezclado del producto terminado (27).
- Yoghurt líquido.- La forma de producción es igual al yoghurt batido, pero la diferencia estriba en que este después del batido, se somete a una baja homogenización para evitar el menor daño mecánico (20,54,60).

Para efectos legales y de aplicación dentro del país, la Norma Oficial Mexicana (NOM-F-1990), establece la clasificación en base a los siguientes puntos (46):

- 1) Por su composición en:
 - Tipo I Yoghurt al natural.
 - Tipo II Yoghurt de sabores.
 - Tipo III Yoghurt preparado.

- 2) Al tipo de leche empleada:
 - Variedad 1 : Yoghurt entero o de leche entera.
 - Variedad 2 : Yoghurt semidescremado o leche semidescremado.
 - Variedad 3 : Yoghurt descremado o semidescremado.
 - Variedad 4 : Yoghurt cremoso o con crema.

- 3) Por su presentación en :
 - a) sólido o firme.
 - b) semisólido o batido.
 - c) líquido.

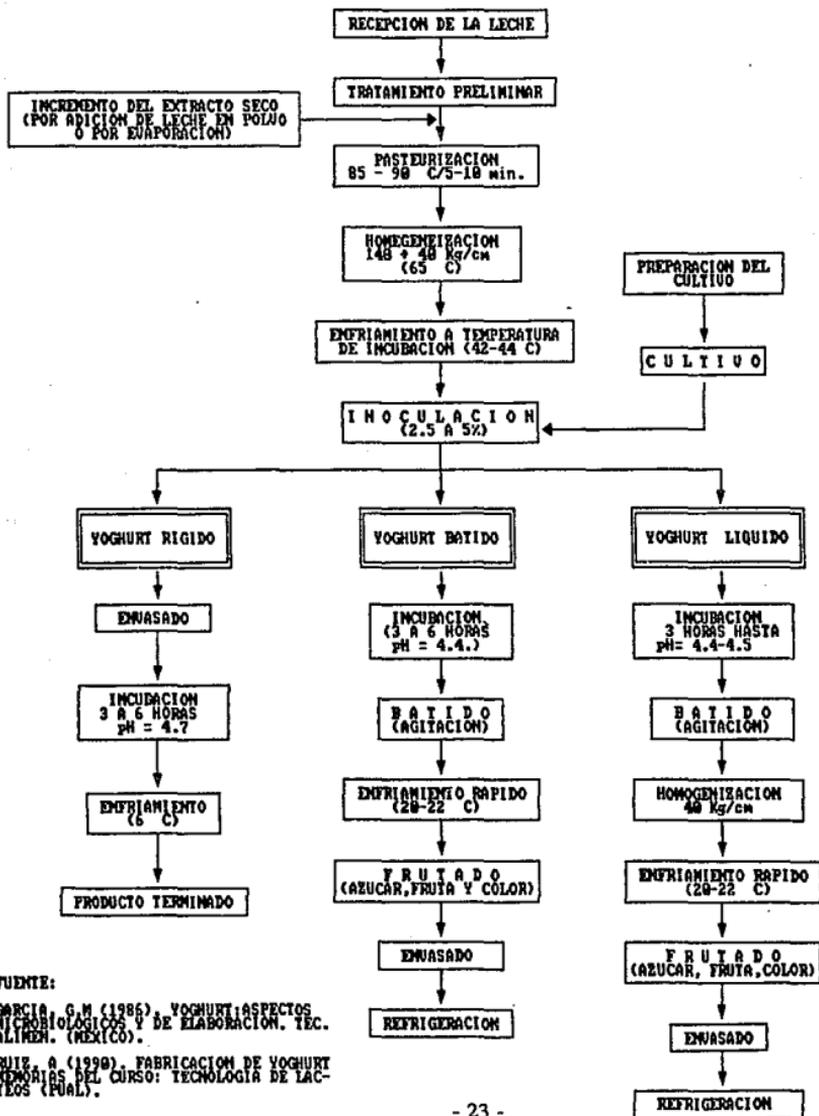
2.7.- Tecnología de elaboración de yoghurt batido.

La tecnología de elaboración de las distintas clases de yoghurt no difieren mucho en lo esencial, en el figura 2.4, se muestran las operaciones para la fabricación de los diferentes tipos de yoghurt.

De estos métodos se describirá a continuación el proceso de yoghurt batido que es el más conocido y más comercializado.

FIGURA #2.4

DIAGRAMA PARA LA FABRICACION DEL YOGHURT



FUENTE:

GARCIA, G.M (1986). YOGHURT: ASPECTOS MICROBIOLÓGICOS Y DE ELABORACION. TEC. ALIMEN. (MEXICO).

RUIZ, A (1990). FABRICACION DE YOGHURT. MEMORIAS DEL CURSO: TECNOLOGIA DE LACTEOS (FUAL).

Recepción de la leche.

La selección de la leche más apropiada es la que posee un contenido elevado de proteína. A pesar de ello, no es necesario elegir una leche con una proporción elevada de extracto seco para la producción de yoghurt. Debe tener un bajo contenido de bacterias y sustancias las cuales pueden impedir el desarrollo de los cultivos para el yoghurt. En suma la leche no debe contener penicilina, bacteriófagos, o agentes estabilizantes (60). El uso de estabilizantes es práctica común en algunos países, sin embargo, el yoghurt puede ser elaborado sin estos aditivos. El uso de estabilizantes no está permitido por las legislaciones de algunos países como Francia, Holanda y México (21).

Estandarización.

Este es el proceso normal que se aplica a la leche después de la recepción, por ejemplo, el pesado, clarificado, enfriado. En este paso se debe verificar la calidad de la leche para su aceptación o rechazo como se señaló antes. El proceso usado hoy en día es estandarizar el contenido de grasa y sólidos secos de la leche (54).

Contenido de grasa.- La cantidad de grasa tiene un rango de 0.1 a 4.0% y puede ser clasificada en los grupos siguientes en base al contenido de grasa (21).

- Yoghurt alto en grasa.- Contenido de grasa de 3.0%
- Yoghurt bajo en grasa.- Contenido de grasa sobre 1.5%
- Yoghurt libre de grasa.- Contenido de grasa sobre 0.1%

Incremento en extracto seco.

Un incremento en el contenido total de sólidos secos, particularmente en la proporción de caseína y proteína de suero, resulta un yoghurt con coágulo más uniforme y la tendencia a la separación será reducida simultáneamente (20).

La experiencia práctica ha demostrado que el yoghurt será más viscoso y tendrá una consistencia más fina y una superficie más brillante si el aumento de sólidos secos (por adición de leche en polvo generalmente de 0.5 a 2.5% en peso), es seguido por evaporación, más que por la adición de sólidos de leche descremada, pero tiene el inconveniente de que los cultivos lácticos se desarrollen a veces con dificultad en ésta (20,27,60).

Pasteurización.

Es fundamental que la leche destinada a la elaboración de yoghurt sea pasteurizada. Esta tiene como objetivo eliminar la flora asociada a la leche, dejando así un medio adecuado para el cultivo de las bacterias del yoghurt, estas no pueden ser inhibidas en su desarrollo por otras cepas extrañas. Asegura que al coágulo sea firme, reduce la separación del suero en el producto final. Se consiguen resultados óptimos con tratamientos térmicos de la leche de 86°C a 90°C por un período de 5 a 10 minutos. Las proteínas del suero se desnaturalizan y contribuyen a la estabilidad del cuerpo del yoghurt (20,60).

Homogenización.

La homogenización se puede efectuar antes o después de la pasteurización y tiene las siguientes ventajas:

Evita la separación de la grasa y se obtiene una mezcla más uniforme. - Incrementa la consistencia, viscosidad y estabilidad del yoghurt, previene la separación del suero (54).

Enfriamiento.

La leche después de la pasteurización y homogenización, se enfría hasta 42°C-44°C. La actividad de las bacterias esta determinada principalmente por la temperatura de incubación y cantidad de inóculo agregado. Mientras mayor sea la diferencia con la temperatura óptima y menor la cantidad de inóculo adicionado, mayor será el tiempo de fermentación, la temperatura y el tiempo de incubación, así como la cantidad de inóculo, no solo influyen en la acidez final sino también en la relación entre las bacterias (20,54).

Preparación del inóculo.

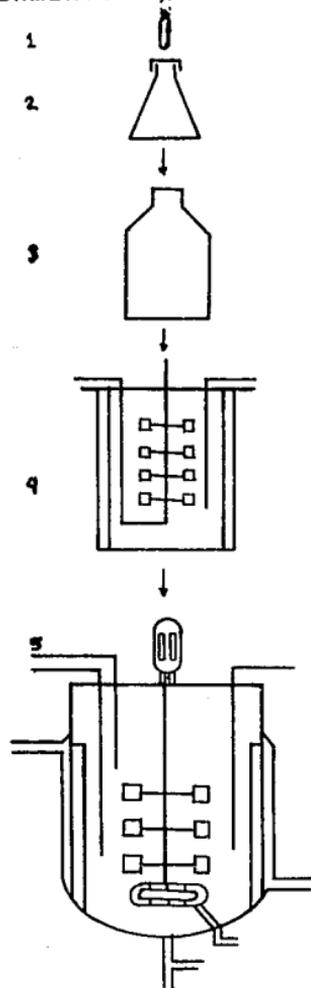
Dependiendo de la presentación de los cultivos lácticos comerciales se debe realizar una preparación previa a usarse como cultivo iniciador y su posterior propagación a nivel industrial, una técnica simplificada se muestra en la figura 2.5.

La selección del tipo de leche usada para propagar cultivos lácticos ya que de esto va a depender la actividad del cultivo. La velocidad de desarrollo de acidez y la producción de aroma y sabor se ven influenciados por el por ciento de sólidos sin incluir grasas, los minerales, etc. (58), aunque el contenido de carbohidratos en la mezcla de yoghurt en especial la lactosa varía en relación del nivel de los sólidos no grasos y produce una fuente esencial de energía para el cultivo iniciador.

Las presentaciones comerciales de cultivos lácticos más comunes son congelados o liofilizados. Se tiene que considerar que la composición del cultivo se cambia durante la propagación del fermento industrial.

Los cultivos lácticos congelados se propagan específicamente para la inoculación directa. Por lo que corresponde a los cultivos liofilizados requieren algunas veces una o dos propagaciones para lograr una actividad apropiada. Un paquete de cultivo seco se puede utilizar como inoculante para un cultivo madre, o se puede utilizar cantidades mayores para inocular un volumen de leche (58).

FIGURA #2.5
PREPARACION DE FERMENTOS LACTICOS



- 1.- LIOFILIZADO DE LA CEPA COMERCIAL.
- 2.- PROPAGACION EN MATRAZ (CON LECHE ESTERILIZADA EN AUTOCLAVE).
- 3.- PROPAGACION EN BOTE (1er. CULTIVO MADRE A NIVEL LABORATORIO).
- 4.- PROPAGACION DEL INOCULO EN EL FERMENTADOR (1er. FERMENTO EN PLANTA).
- 5.- PROPAGACION DEL INOCULO EN FERMENTADOR INDUSTRIAL.

FUENTE: ALAIS, CH. (1988). LA CIENCIA DE LA LECHE. PRINCIPIOS DE TECNOLOGIA LECHERA. ED. C.E.C.S.A. MEXICO.

Cultivo.

La preparación del cultivo inicial en la producción del yoghurt demanda máxima precisión e higiene, debe constar de las especies bacterianas termófilicas siguientes: Streptococcus thermophilus y Lactobacillus bulgaricus (27). No debe contener otras especies no termófilicas ya que originalmente contenía otros tipos de organismos fermentados de la alfa-lactosa, tales cultivos ahora se consideran contaminantes (60).

Ambas especies viven en el yoghurt en una simbiosis (vida asociada de organismos distintos con beneficio mutuo). La relación cuantitativa entre coco y bacilo es de 1:1 a 2:3, aproximadamente (38,60).

Siembra.

La mezcla de dichos microorganismos debe ser enfriada a 1°C a 2°C sobre la temperatura de incubación y se siembra con el 2 al 5% de cultivo (20,60).

Incubación.

La temperatura de incubación es de 42°C, de 3 a 6 horas hasta alcanzar una acidez de 0.8% a 1.2% de ácido láctico o pH cercano 4.4. A este pH se coagulan la mayor parte de las fracciones de caseína, por lo que a ese valor se le considera como el punto isoeléctrico (20). A esta temperatura se logra la acidificación, la consistencia y el sabor deseados. La temperatura de incubación se mantendrá constante para regular el proceso de acidificación de manera que pueda establecerse la debida relación entre cocos y bacilos (60).

Batido.

Cuando la fermentación se efectúa a granel en tanques provisto de paletas que rompen y agitan delicadamente el coágulo, con el cual se consigue una masa homogénea, brillante y viscosa. El coágulo debe batirse antes de alcanzar un pH de 4.7, porque se produciría el desuerado y por consiguiente una consistencia muy débil (20,54).

Enfriamiento.

Se lleva a cabo tan pronto como sea posible para que la leche no se acidifique después en exceso, a temperatura de 16 a 17°C. Para el yoghurt batido a granel se utilizan intercambiadores tubulares o de placas y se consigue por lo tanto un producto con una consistencia cremosa y uniforme (20,60).

Frutado.

El yoghurt preparado como se ha descrito es de un color blanco, con una apariencia placentera como a queso con un pequeño sabor ácido. El cual es un factor de aceptabilidad por parte de los consumidores, por esta razón, frecuentemente se le añaden edulcorantes (21).

Con mucho el más usado de ellos es la sacarosa aunque hay otros como la miel de abeja, los jarabes de maíz, jarabes fructosados y ultimamente se utilizan los edulcorantes no calóricos como la sacarina y el aspartame, que aunque son sintéticos tienden a ser más comercializados,

en contraparte con los productos naturales que han sido poco explotados (21,53). El yoghurt que es de sabor ácido se mezcla muy bien con sabores de frutas. Los yoghurts con frutas se obtienen al agregar una cantidad proporcionada de jarabes con sabor (frambuesa, fresa, durazno, etc.), adicionados al yoghurt inmediatamente después de la coagulación. El mejor jarabe empleado en la elaboración de productos lácteos es el que está basado en jugos de frutas naturales o jugos concentrados cuando no se requiere dulce (32). Con respecto a los saborizantes se basan casi siempre en la fruta troceada o pure. La fruta o pure por sí solos, no siempre resultan de un nivel de sabor satisfactorio, por lo cual tales productos necesitan la adición de niveles bajos de sabor para realzar el producto con un perfil de aceptabilidad. Los saborizantes para yoghurt por lo tanto pueden ser adicionados de tres formas:

- a) mezcla de saborizantes, azúcar y color, siendo adicionados previo a la fermentación;
- b) en el fondo del envase antes del llenado;
- c) en granel: pure de fruta, saborizantes, azúcar y color son adicionados en el enfriamiento después de la fermentación, por ejemplo en la elaboración del yoghurt batido (29).

Envasado.

La incubación se efectúa en envases de vidrio o plástico, debe envasarse en recipientes adecuados con tapa de sello hermético (54).

Almacenamiento.

El almacenamiento se lleva a una temperatura de refrigeración más intensa (5 a 6°C), donde la fermentación se detiene por completo, y después de un almacenamiento de dos horas se desarrolla principalmente el aroma. Así como para adquirir textura y apariencia (20,54).

2.8.- Defectos en el yoghurt.

Aunque el yoghurt es una forma de conservación de la leche y por ser un alimento tan complejo puede presentar defectos durante el proceso y al final de éste. De ahí la importancia de realizar un buen proceso de elaboración, de lo contrario el producto presentará algunos defectos de los siguientes tipos:

a) Microbiano:

- Un sabor amargo o agrío.- Resultado de una excesiva acidez, debido a una desenfrenada generación de ácido láctico (2 a 3%), por el Lactobacillus bulgaricus. Con respecto al sabor amargo generalmente causado por microorganismos como el B. cereus y el B. subtilis, forman esporas aerobias que sobreviven a altas temperaturas, las levaduras y los mohos pueden contaminar el yoghurt. Puede ser también provocada por un prolongado tiempo de almacenamiento (54).
- Cuando las mezclas de las resiembras no presentan una relación 1:1 entre las bacterias, el Lactobacillus bulgaricus produce un penetrante sabor de acetaldehídos y por el contrario si el Streptococcus thermophilus es transferido a una temperatura más baja que las normales, 31°C éste domina y hay una producción de ácido láctico (38).
- Baja acidez provocada por la presencia de inhibidores en la leche. Bacteriófagos en el cultivo del yoghurt destruyen los fermentos (54).

b) Proceso

- Acido.- Demasiada acidez durante la incubación o después de ésta. Debido quizá a una alta temperatura de almacenamiento. La acidez es una de los mejores índices de aceptabilidad de los consumidores, ya que el desarrollo de la acidez y aroma van mano a mano en los productos lácticos que utilizan bacterias simbióticas. La amplia variación de la acidez en un rango de pH de 4.53 a 3.27 ha sido reportado en el yoghurt comercial, lo cual concierne a la relación entre la acidez inicial y los cambios que sufren durante el almacenamiento en la refrigeración se debe estimar el punto de acidez inicial para su venta así como el tiempo y temperatura (55).
- Sabor amargo.- Temperaturas de almacenamiento mas altas a 5°C, pueden provocar defectos en el sabor, impartiendo un sabor amargo (20).
- Sabor rancio.- Que es provocado por la degradación de la grasa contaminada (54).
- Arenoso.- Debido a la concentración de partículas, por una mala homogenización de la leche en polvo o disolución de los estabilizantes (54).
- Gomoso.- Debido al uso excesivo o no adecuado de estabilizantes y una mala incorporación de ellos (38,54).
- Cristales.- Temperaturas demasiadas bajas pueden provocar la formación de cristales de hielo (20).

CAPITULO III

METODOLOGIA

En el presente trabajo se plantea como una alternativa la utilización de cepas productoras de acidez para la obtención de un producto tipo yoghurt, para lo cual se planteron los siguientes objetivos.

Objetivo General

Evaluar un producto tipo yoghurt elaborado con especies de lactobacilos diferentes al Lactobacillus bulgaricus clasicamente empleado.

Objetivos Particulares

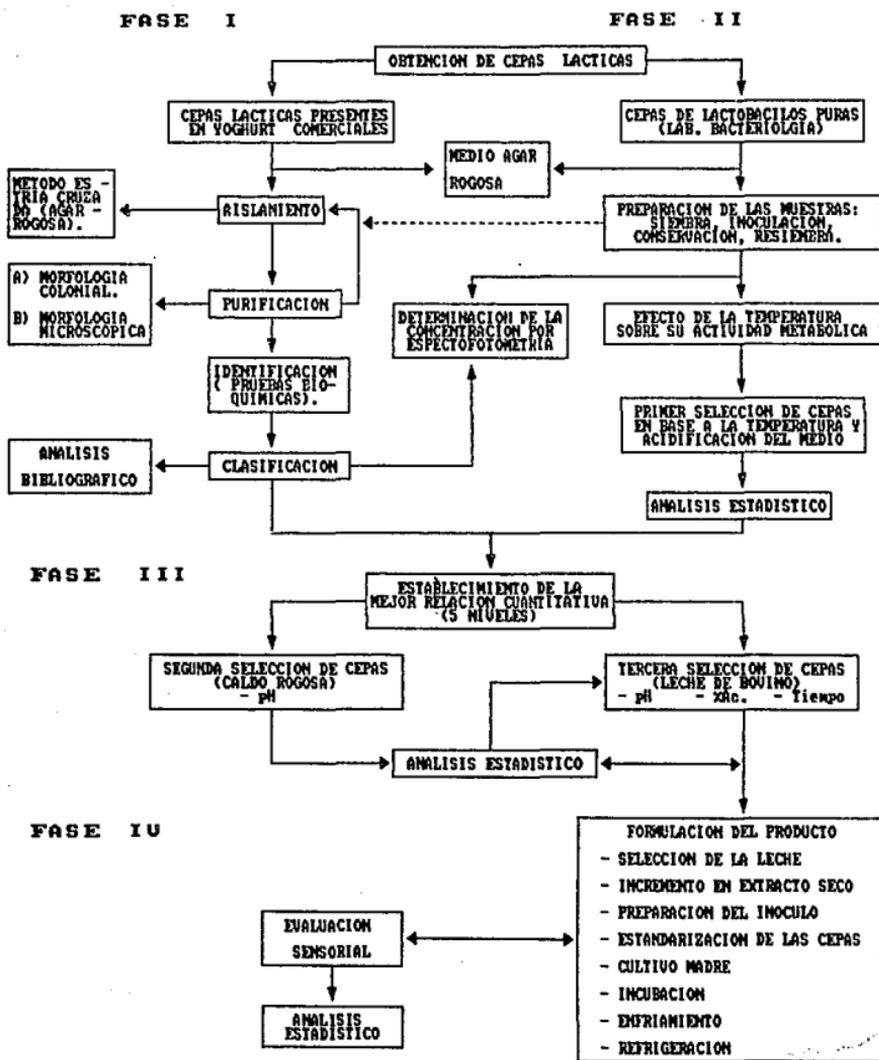
- 1) Caracterización bioquímica de cepas de lactobacilos de origen animal y de uso en la reconstitución de la flora intestinal en base a la producción de acidez.
- 2) Selección de cepas de lactobacilos en base a la acidez bajo diferentes condiciones de temperatura.
- 3) Realizar el seguimiento fisicoquímico de la fermentación láctica y seleccionar la mejor relación cuantitativa coco-bacilo.
- 4) Elaboración y evaluación sensorial del producto tipo yoghurt, elaborado con las cepas seleccionadas, y compararlo con uno comercial.

Desarrollo Experimental

La experimentación se realizó en cuatro fases, como se muestra en el cuadro metodológico (figura 3.1).

FIGURA #3.1

CUADRO METODOLÓGICO



3.- Origen de las muestras.

Se trabajaron 7 cepas de Lactobacillus casei (4C, 5C, 130C, SN1, SN2, 7 y 8), suministradas por el Laboratorio de Bacteriología en la Unidad de Investigación y Estudios de Posgrado de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán (fase I), una cepa de Lactobacillus lactis y una cepa de Streptococcus thermophilus, aislados de cuatro diferentes marcas de yoghurt comerciales (A, B, C y D).

3.1.- Aislamiento, purificación e identificación de las cepas a partir de yoghurt comercial (Fase I).

Se aislaron y purificaron las cepas lácticas presentes en yoghurt comerciales en el medio Agar Rogosa (14), utilizando una atmósfera de CO₂.

Por el método de estría cruzada se aislaron las cepas utilizando como medio de soporte el Agar Rogosa (14).

Purificación.- Por morfología presentada por las colonias y confirmación por microscopía.

- a) Identificación de lactobacilos (Pruebas Bioquímicas). Las cepas identificados como lactobacilos de los diferentes yoghurts comerciales, fueron caracterizados por las pruebas siguientes: Gram, catalasa, oxidasa, utilizando los siguientes carbohidratos según Bergey's (6), arabinosa, celobiosa, dextrosa, galactosa, glucosa (Ac./Gas), lactosa, maltosa, melobiosa melozitosa, refinosa, sacarosa, salicin, sucrosa, trehalosa y xilosa.

Se utilizó el caldo MRS modificado para carbohidratos el cual contiene un indicador de pH (Caldo Rojo de Fenol). Al lactobacilo identificado se le asignó el código Lm arbitrariamente.

- b) Identificación de estreptococos. Para las cepas de estreptococo aisladas de yoghurt comercial se caracterizaron mediante las pruebas siguientes:
- Crecimiento del estreptococo bajo diferentes condiciones de temperatura: 10°C/45°C.
 - Crecimiento en un pH básico.
 - Crecimiento en NaCl (6.5%).
 - Catalasa. Fué codificado como St. arbitrariamente también.

3.2.- Determinación de la concentración por espectrofotometría (fase II).

Las cepas se sembraron en caldo Rogosa, en tubos de rosca e incubándose durante 24 horas a temperatura de 37°C, la turbidez que se presenta en el cultivo fué determinada en el espectrofotómetro, empleando una longitud de onda de 660 nm (25,61), y a su vez se llevó a cabo la cuantificación de los microorganismos en agar Rogosa, por el método del número viable realizando diluciones de 10⁻¹ a 10⁻⁴ (13).

3.3.- Efecto de la temperatura sobre su actividad metabólica (Fase II).

Se observó el efecto de la temperatura (37°C y 42°C) sobre las cepas de lactobacilos (4C, 5C, 130C, 7, 8, SN1 y SN2), utilizando caldo Rogosa, se determinó el pH como una medida indirecta de la producción de acidez durante 8 horas de incubación.

Se seleccionó la temperatura de 37°C, en la cual se presenta una mayor actividad y a 42°C, que es la temperatura óptima de desarrollo sin modificar su metabolismo (54).

Las cepas que no alcanzaron un pH de 4.5 se eliminaron (1° Selección), debido a que son condiciones recomendadas para la elaboración de yoghurt (21,37,60), y se corroboró con un análisis de varianza (12).

3.4.- Establecimiento de la mejor relación cuantitativa coco-bacilo (fase III):

a) Empleando Caldo Rogosa.

Se probaron las cepas lácticas (obtenidas de las 1° selección, así como el lactobacilo del yoghurt comercial) en combinación con el estreptococo, en diferentes relaciones cuantitativas para establecer la relación óptima del inóculo (1:1 a 2:3), se utilizó el medio agar Rogosa y a una temperatura constante de 42°C, evaluando el pH durante un tiempo de 8 horas, se sembraron por duplicado y con un análisis estadístico se seleccionaron (2° Selección), las cepas con mayor producción de acidez (20,54,60).

b) Empleando leche de bovino.

Las cepas seleccionadas fueron probadas con los mismos niveles de relaciones cuantitativas, empleando como medio leche de vaca, ajustando a un 12% de sólidos, con leche en polvo en un volumen determinado, el cual fue dividido en partes iguales en matraces, uno de ellos se utilizó en la determinación de los parámetros pH y % de acidez, con respecto al tiempo, en periodos constantes de 60 minutos. La fermentación se detuvo al alcanzar un pH de 4.5. El ácido láctico producto de ésta, se neutralizó con NaOH (0.1N) y como indicador fenofaleína (16,54).

El otro matraz se mantuvo intacto durante la fermentación, se enfrió a 10°C, con el objeto de inactivar las cepas, después se observó las características de formación de gel y textura, así como la evaluación de aroma por un panelista calificado.

En base a los datos obtenidos en ésta parte del trabajo se realizó la selección de cepas y relaciones cuantitativas con los mejores resultados tanto de los parámetros pH y % de acidez y de las características organolépticas del producto (20,60,65).

3.5.- Formulación del producto (Fase IV).

Se siguió la metodología de elaboración de yoghurt batido (según la figura 2.4), adaptándolo a las condiciones del laboratorio.

Preparación del inóculo.

Con las cepas seleccionadas, así como la relación cuantitativa óptima, se preparó el inóculo. En base al valor leído de absorbancia se determinó el número viable de células que se tiene a este valor, lo cual permitió mantener constante la concentración de microorganismos.

Una vez estandarizado el inóculo bajo las anteriores condiciones, con las cepas seleccionadas se adicionaron a la leche y se incubó a 42°C, el volumen total se separó en dos partes iguales, uno de ellos se mantuvo intacto como cultivo madre y del otro se realizaron las determinaciones de los parámetros pH y % acidez.

Cultivo Madre.

El cultivo madre se utilizó en una concentración del 5%, el cual se tomó del matraz que permaneció intacto durante la preparación del inóculo (refrigerado a 10°C), se reactivó atemperando en un baño térmico hasta alcanzar una temperatura de 40°C.

Selección de la leche.

Se trabajó con una leche comercial ultrapasteurizada y estandarizada a un 3% de grasa.

Incremento en extracto seco.

Se utilizó leche en polvo descremada ajustada a un 12% de sólidos (sin considerar el porcentaje de grasa), agitando por 10 minutos, para su disolución y evitar la formación de grumos. Se efectuó a una temperatura de incubación de 45°C, con el fin de que no disminuyera por debajo de la temperatura de incubación (42°C), a la cual se efectúa la fermentación (20,38).

Inoculación.

Se inoculó con un 5% de cultivo madre en la leche en un rango de temperatura de 42°C a 44°C, se agitó para homogenizar la mezcla. Del cual se tomó una cantidad del volumen original, para el seguimiento de la fermentación (38).

Incubación.

Los matraces se sellaron e introdujeron a la estufa a temperatura de 42°C. Durante el transcurso de la fermentación se realizaron las determinaciones de los parámetros pH y % Acidez. Utilizando para la neutralización del ácido láctico NaOH al 0.1N y como indicador fenoftaleína (16). La fermentación se detuvo al alcanzar valores de pH próximos a 4.5 (20,54,60).

Enfriamiento.

Se utilizó agua fría a una temperatura de 10°C con la cual se disminuye la actividad simbiótica de los microorganismos, impidiendo la producción de acidez en el medio y evitando un desuerado en el producto (60).

Refrigeración.

El producto después del enfriamiento se mantuvo en refrigeración a 8°C, donde se observaron las características que las cepas impartieron al producto final en cuanto a la formación del gel, textura y aroma (54,60).

3.6.- Evaluacion Sensorial.

Para el desarrollo de nuevos productos y/o tipos, se debe buscar información de la aceptabilidad relativa de la muestra experimental mediante pruebas con consumidores, por lo que es deseable el someter los productos a una prueba de aceptabilidad, ya que al establecer las evaluaciones sensoriales nos permite comunicar lo que es el alimento, cómo se ha transformado y lo más importante finalmente si gusta o no el producto alimenticio al consumirse (48). Por lo anterior se procedió a realizar una evaluación sensorial a los mejores productos obtenidos. Dentro de las medidas sensoriales se utilizó, la que corresponde al rango de pruebas discriminatorias y específicamente a las calificadas como pruebas de diferencia (5).

Las pruebas de diferencia se aplican en la determinación de la existencia de diferencias entre muestras. Se utilizó la prueba del triángulo, en este análisis el juez recibió tres muestras, se le dijo que dos muestras son iguales y una distinta y se le pidió que identificara la muestra diferente. Este método se emplea para determinar si la sustitución de algún ingrediente o algún otro cambio en el proceso resulta detectable en el producto terminado. Calificándose el grado de acidez, que se presenta en ambos productos (5,44,50,63). Dicha prueba se realizó con un panel de 20 jueces no entrenados. Para la prueba del triángulo se plantearon las siguientes hipótesis:

Ho: Las muestras son iguales.

Ha: Al menos una de las muestras es diferente.

El tratamiento de los datos fué mediante el empleo de la estadística no paramétrica, para lo cual se fijó un nivel de significancia del 5%, con tres grados de libertad, el dato obtenido fué 7.815, evaluado de la tabla de valores críticos de la distribución de la ji-cuadrada, con los valores obtenidos en tres días de experimentación (12,66).

Con respecto a la evaluación sensorial de algunas de las características específicas del producto (en una escala del nivel de agrado), se empleó diferentes expresiones (verbales y numéricas), se empleó la prueba de diferenciación (escala de intervalos) (49). En esta prueba se determinó la influencia de la adición de azúcar (5%), en las características del yoghurt, comparando el producto obtenido en el laboratorio contra un yoghurt comercial, para lo cual se utilizó una escala hedónica de 7 puntos y 5 atributos (olor, sabor color, textura y una calificación general).

Los datos obtenidos se trabajaron por el método de estadística no paramétrica con la prueba de Kruskal-Wallis (33,66). Asignando 4 tratamientos y 20 bloques con los valores promedio de 3 días de experimentación, los cuales fueron transformados a rangos. Se plantearon las siguientes hipótesis para cada uno de los atributos.

Olor:

Hipótesis:

Ho: La percepción del olor el mismo para todas las muestras.

Ha: La percepción del olor es mayor al menos en una de las muestras.

Sabor:

Hipótesis:

Ho: El sabor es uniforme en todas las muestras.

Ha: Al menos una de las muestras se percibe un sabor diferente.

Color:

Hipótesis:

Ho: El color es igual en todas las muestras.

Ha: Al menos una de las muestras es diferente.

Textura:

Hipótesis:

Ho: No hay diferencia entre las muestras.

Ha: La textura es diferente en una de las muestras.

Calificación General:

Hipótesis

Ho: Presentan iguales atributos todas las muestras.

Ha: Hay mayor preferencia en base a sus atributos, por una de las muestras.

CAPITULO IV

ANÁLISIS DE RESULTADOS

4.1.- Aislamiento, purificación e identificación de las cepas de yoghurt comercial (Fase I).

4.1.1.- Identificación de cepas (Pruebas Bioquímicas).

La identificación de las cepas aisladas de yoghurt comercial fué por medio de pruebas bioquímicas de reducción de azúcares para los lactobacilos. Los datos obtenidos se analizaron en base a la clasificación establecida en el Manual de Berbey's (6). Por lo que el lactobacilo aislado es el Lactobacillus lactis, para los tres yoghurt comerciales (Tabla 4.1).

TABLA 4.1
IDENTIFICACION DE LACTOBACILOS A PARTIR DE YOGURT COMERCIAL

CEPA	A (1)	B (1)	C (1)	L-LACTO (2)	L-LACTULO (2)	L-ALLOSANTO (2)
AZÚCAR						
1 Arabinosa	ND	ND	ND	-	-	+
2 Celobiosa	-	-	-	-	-	+
3 Dextrina	+	+	+	N.R.	N.R.	N.R.
4 Fructosa	+	+	+	+	+	+
5 Galactosa	+	+	+	+	+	+
6 Glucosa	+	+	+	+	+	+
7 Lactosa	+	+	+	+	+	+
8 Maltosa	+	+	+	+	+	+
9 Manosa	+	+	+	+	+	+
10 Melzitosa	+	+	+	-	-	-
11 Melobiosa	-	-	-	-	-	D
12 Rafinosa	-	-	-	-	-	D
13 Sacarosa	+	+	+	N.R.	N.R.	N.R.
14 Salicin	+	+	+	+	+	+
15 Sucrosa	+	+	+	+	-	+
16 Tuleosa	+	+	+	+	-	+
17 Xilosa	-	-	-	-	-	-

ND No Determinado

D Dulces

NR No Reportado

1 Datos experimentales

2 Buchanan and Gibbons, Berbey's Manual of Determinatives
Bacteriology The Williams and Wilkins, Baltimore, U.S.A (1974)

Los resultados obtenidos para la identificación del estreptococo (Tabla 4.2), corresponden al Streptococcus thermophilus, obtenido a partir del yoghurt B.

TABLA 4.2
IDENTIFICACION DEL ESTREPTOCOCO A PARTIR DE YOGHURT COMERCIAL

CRECIMIENTO				PRUEBA DE LA CATALASA
TEMPERATURA		EN NaCl (6.55 %)	CON UN pH DE 9.6	
10°C	45°C			
1)	-	+	-	-
2)	n.d.	+	-	-

- 1) FUENTE: COWAN, S.T.(1982). MANUAL PARA LA IDENTIFICACION DE BACTERIAS DE IMORTANCIA MEDICA. ED. C.E.C.S.A. MEXICO.
 2) EXPERIMENTAL.
 n.d. NO DETERMINADO.

TABLA 4.3
DETERMINACION DE LA ABSORBANCIA PARA LAS CEPAS LACTICAS

CEPA	Absorbancia
4C <u>Lactobacillus casei</u>	0.692
5C <u>Lactobacillus casei</u>	0.550
130C <u>Lactobacillus casei</u>	0.460
SN1 <u>Lactobacillus casei</u>	0.450
SN2 <u>Lactobacillus casei</u>	0.560
7 <u>Lactobacillus casei</u>	0.771
8 <u>Lactobacillus casei</u>	0.680
Lm <u>Lactobacillus casei</u>	0.567
St <u>Streptococcus Thermophilus</u>	0.754

4.2.- Determinación de la concentración por espectrofotometría (fase II).

Las cepas lácticas puras proporcionadas por el Laboratorio de Bacteriología fueron sembradas en Agar Rogosa, para su conservación, durante la experimentación.

La absorbancia de las cepas se realizó en el espectrofotómetro (Spectronic 88) y los resultados se muestran en la tabla 4.3 .

4.3.- Efecto de la temperatura sobre su actividad metabólica (fase II).

a) Temperatura de 37°C.- Las cepas 8 y SN1, muestran una lenta adaptación al medio, después de 6 horas de postincubación se manifiesta un cambio en las condiciones iniciales de pH, al pasar de 5.30 a 5.0 y alcanza su valor final de 4.90 hasta las ocho horas. La cepa 4C, mostró una fase de adaptación más prolongada, su acidificación por tanto es lenta, siendo su pH final de 5.1, a ocho horas de postincubación (gráfica 4.1).

Por lo que a las cepas 5C y 130C, a la sexta hora de postincubación presenta una mayor actividad por acidificar el medio llegando a alcanzar un valor (ambas) de 4.5 (gráfica 4.1).

Del análisis de varianza realizado bajo esta condición nos indicó una diferencia significativa para las cepas 4, 8 y SN1, mientras que para las cepas 7 y SN2, no se presentó una diferencia significativa.

b) Temperatura de 42°C.- La cepa 4C presenta el mismo comportamiento (una fase lenta de adaptación), como a la anterior condición de temperatura; su pH final es de 4.9. En tanto que para la cepa SN2 y 8 después de 4 horas de postincubación tienen una afinidad hacia el medio, estableciendo un pH de 4.8 (gráfica 4.2).

Con respecto a las cepas 5C, 130C, y 7, muestran una mayor tendencia a acidificar el medio reflejándose en una acentuada disminución del pH, siendo éste de 4.6 aproximadamente (gráfica 4.2).

El análisis de varianza nos indicó que las cepas 4C, 8 y SN1, presentaron una diferencia significativa, con respecto a las demás cepas y no se vio afectada su actividad metabólica a diferentes condiciones de temperatura, el cual se reflejó en el pH. Mostrando mejores resultados las cepas 7 y 5C. Sin embargo, la cepa SN2 fué influenciada por el cambio de temperatura ya que su actividad metabólica disminuyó.

En base a estos resultados las cepas que se seleccionaron fueron la 5C, 130C, 7 y SN2.

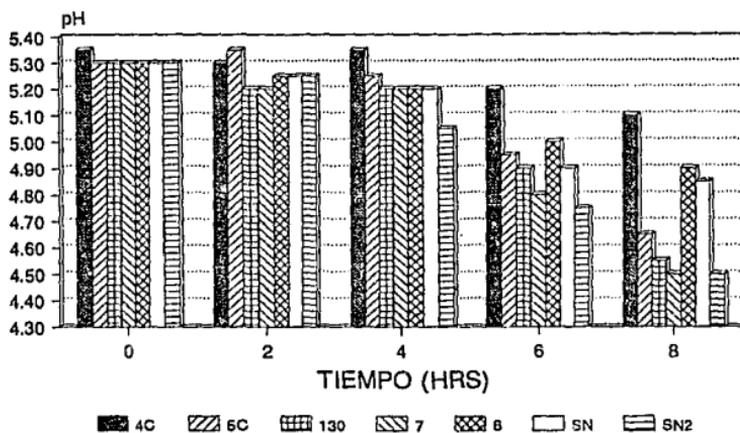
4.4.- Establecimiento de la mejor relación cuantitativa cocobacilo (fase III).

a) Empleando caldo Rogosa (T=42°C).

Las cepas seleccionadas del anterior experimento (5C, 130C, 7 y SN2), y la cepa Lm en combinación con el estreptococo en cinco diferentes relaciones cuantitativas, donde se obtuvieron los siguientes resultados: Las cepas 5C, 130C y 7, muestran una tendencia a disminuir el pH, estas cepas después de cuatro horas de postincubación presentan una mayor adaptación al medio (pH = 7), y en la última hora alcanza un pH de 4.5, como se muestra en las gráficas 4.3, 4.4 y 4.5, respectivamente. Las diferentes relaciones cuantitativas tuvieron un similar comportamiento y su pH final es de 4.5.

La cepa SN2, tuvo una lenta adaptación al medio aún después de ocho horas de postincubación presentó un lento descenso en el pH, y solo alcanzó un pH de 4.7,

VARIACION DEL pH CON RESPECTO AL TIEMPO
TEMPERATURA 37 GRADOS CENTIGRADOS



GRAFICA 4.1

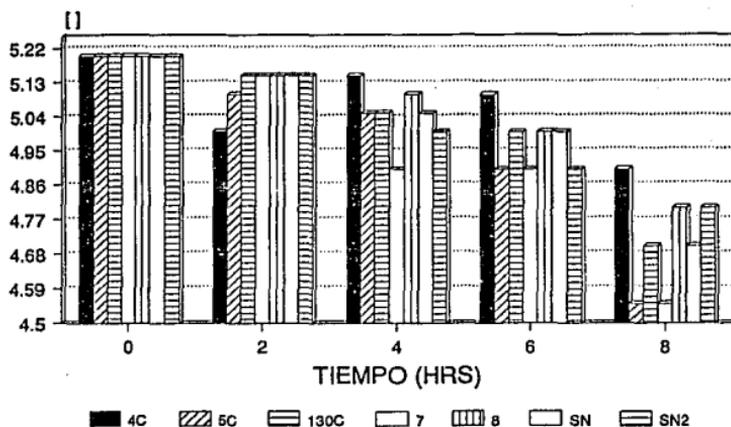
siendo la relación cuantitativa 2:3, la que mejor se adaptó, como se muestra en la gráfica 4.6.

La cepa Lm, a partir de la 1° hora de postincubación mostró una afinidad hacia el medio, el pH inicial fué 6.10, para la tercer hora de 5.50 y en la quinta hora de postincubación alcanza un pH de 4.4 (gráfica 4.7), y siendo las mejores relaciones 2:2 y 2:3, ambas con un pH = 4.3.

De los resultados obtenidos a través del análisis de varianza, la concentración fué una variable que influyó significativamente en la variación del pH de cada una de las cepas. Los mejores resultados se encontraron para la concentración 2:3, utilizando como medio de acidificación caldo Rogosa.

- b) Empleando leche de bovino (3° Selección de cepas). Utilizando como medio de cultivo leche, se facilitó el seguimiento de la fermentación de las cepas 7 y Lm, alcanzaron un pH de 4.1 y 4.25 (gráficas 4.8 y 4.10 respectivamente), mientras que el ácido láctico producto de la fermentación alcanzó valores finales de 0.85 para la cepa 7 y de 0.75 para la cepa Lm (gráficas 4.9 y 4.11), para la relación 2:3, con la formación de un gel delicado de estructura grumosa y de un aroma suave, durante un tiempo de

VARIACION DEL pH CON RESPECTO AL TIEMPO
TEMPERATURA 42 GRADOS CENTIGRADOS



GRAFICA 4.2

8 horas. Las relaciones 1:1 y 2:1, se eliminaron ya que no impartieron modificaciones al medio.

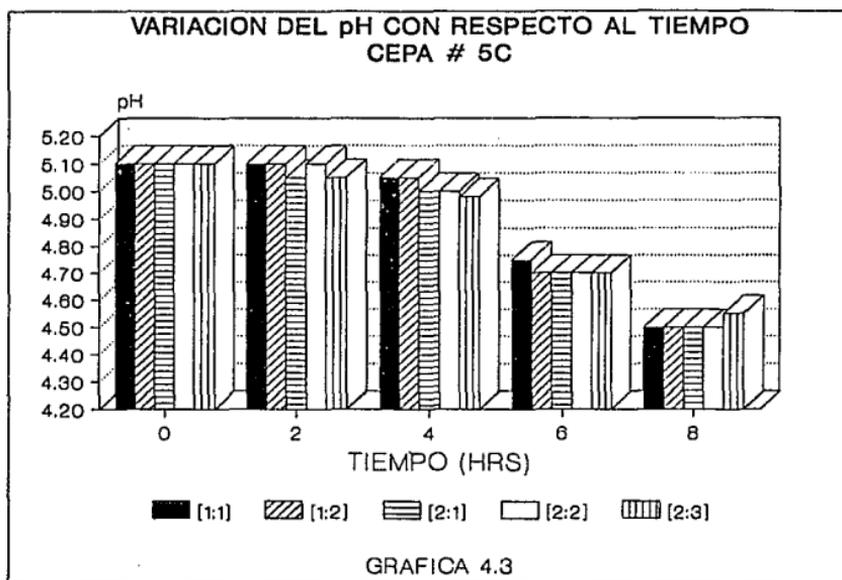
Los resultados obtenidos a través del análisis de varianza, nos indicó que al eliminar las concentraciones 1:1 y 2:1, mostraron una diferencia significativa con respecto a las concentraciones 1:2, 2:2 y 2:3, tomando en cuenta que con la combinación del estreptococo y la cepa Lm, que fueron aislados del yoghurt comercial, sirvieron de referencia para la evaluación del producto obtenido, no presentaron formación de gel y aroma.

La cepa 5C, después de dos horas, muestra un cambio alcanzó un pH promedio de 5.4, y baja producción de ácido de 0.44 (gráficas 4.12 y 4.13 respectivamente), correspondiendo a la relación 2:3, la cual no presentó formación de gel, así como tampoco desarrolló aroma.

La cepa 130C, presentó una fase de adaptación de 4 horas, después de la cual muestra una mayor afinidad por el medio, siendo su pH final de 5.6 y una acidez de 0.475

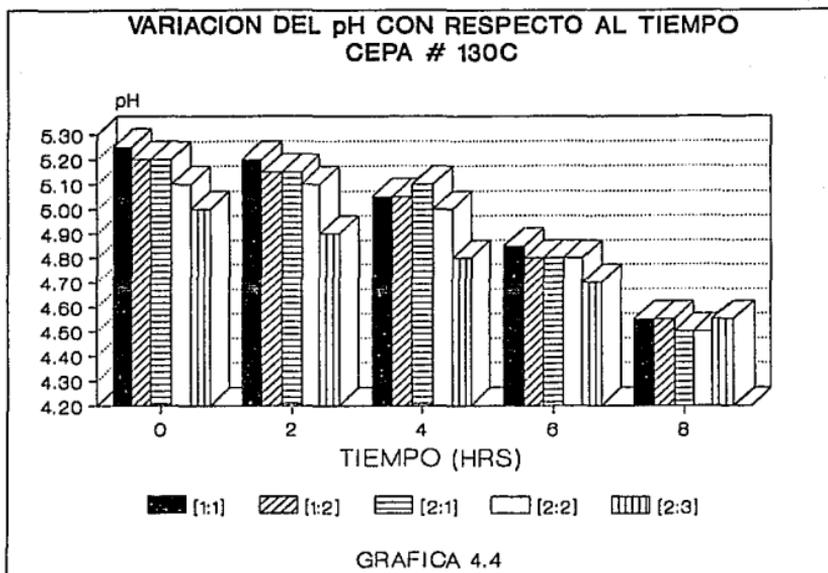
(gráficas 4.14 y 4.15), siendo la concentración 2:2 la que mejor se adaptó. Sin embargo tampoco presentó formación de gel y aroma.

La cepa SN2, presentó un descenso escalonado (concentración 1:2 y 2:2), el pH final alcanzado fué 5.45 y una acidez de 0.4 (gráficas 4.16 y 4.17), la mejor relación fué 2:3, no se presentó modificación alguna al medio en cuanto a la formación de gel y aroma.



En base a los resultados obtenidos, solo se seleccionaron dos cepas, las cuales son: la cepa 7 (*Lactobacillus casei*) y Lm (*Lactobacillus lactis*), esta última aislada del yoghurt comercial y se obtiene que la relación 2:3, fué la mejor ya que alcanzó los valores óptimos de pH (4.4 ambas cepas) y % acidez (0.85 y 0.75 respectivamente). Así como de impartir las características organolépticas que se requiere en un producto fermentado en cuanto a la formación del gel y aroma.

Al cambiar el medio de acidificación el comportamiento de las cepas y concentraciones cambiaron, el parámetro de la concentración es una variable determinante para la obtención del producto, por lo cual se eliminaron las concentraciones 1:1 y 2:1, ya que mostraron una



diferencia significativa con respecto a la concentración 2:3.

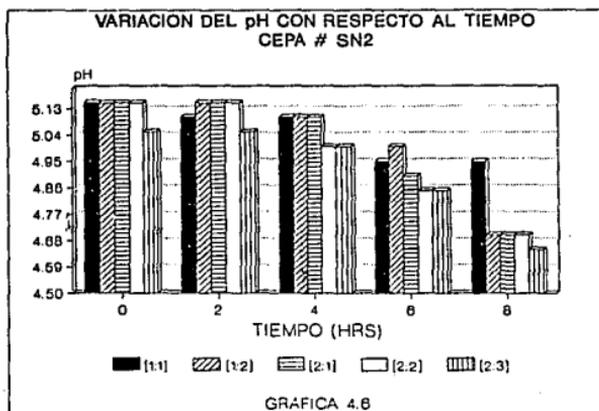
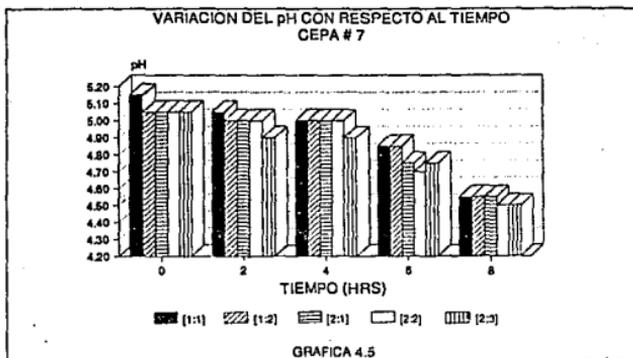
4.5.- Formulación del producto. (Fase IV) Preparación del inóculo.

Se tomó como el valor constante la absorbancia determinada en el espectrofotómetro para las cepas seleccionadas: 7 (0.771); Lm (0.567) y estreptococo (0.754).

Estandarización de las cepas.

El número viable de células para la absorbancia de cada una de las cepas se muestra en la tabla 4.4. Dichos valores de concentración corresponden a las diluciones 10^{-5} y 10^{-6} , al primer número le corresponde el mayor número de colonias contables.

El inóculo preparado alcanzó valores de pH de 4.5 y 4.6, para las cepas 7 y Lm respectivamente (gráfica 4.18) y los valores de acidez de 0.68 y 0.67 para la cepa 7 y Lm respectivamente (gráfica 4.19). El resultado del análisis de varianza de las variables pH y % de acidez, no presentaron una diferencia significativa entre las cepas 7 y Lm. El tiempo tampoco influyó de manera significativa.



Cultivo madre.

Se inoculó con un 5%, previo atemperamiento a 40°C por 10 minutos.

Selección de la leche.

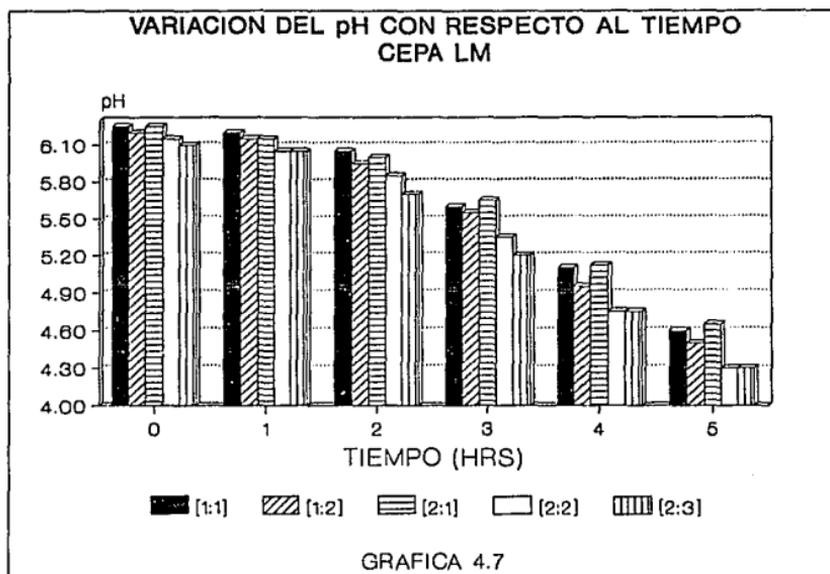
Se seleccionó una leche comercial ultrapasteurizada con un contenido mínimo de grasa (3%).

Incremento en extracto seco.

Los sólidos se ajustaron a un 12% (tomando como base los sólidos no grasos de la leche). Su clasificación corresponde al yoghurt natural tipo I, variedad I (leche entera), según la Norma Oficial Mexicana (1990).

Inoculación.

La inoculación se efectuó a una temperatura de 42 a 44°C, en condiciones asépticas.



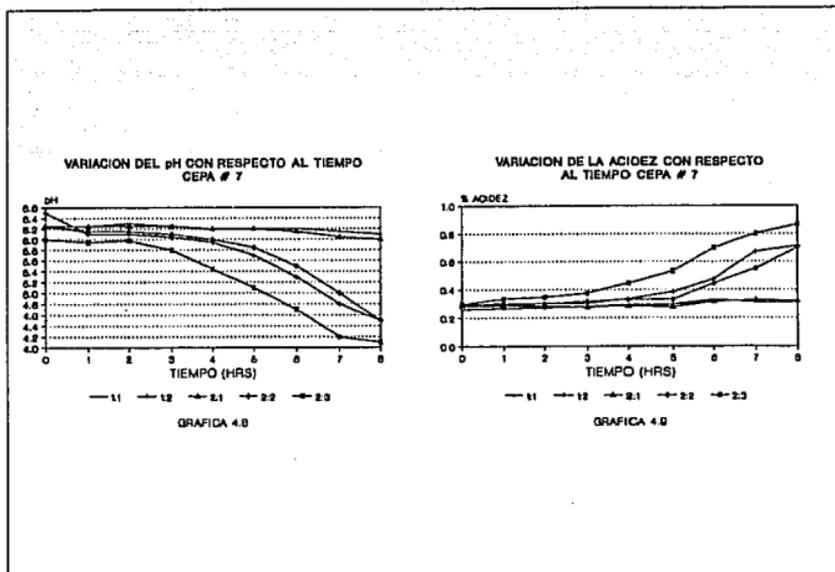
Incubación.

La incubación se efectuó a 42°C, ambas cepas (7 y Lm), mostraron una tendencia a disminuir el pH, en el menor tiempo posible, la cepa 7 alcanzó un pH = 4.5, en un tiempo total de 2.20 horas (140 minutos), mientras que la cepa Lm, necesitó de 20 minutos menos en alcanzar el pH = 4.5, es decir su tiempo final fué de 2.00 horas (120 minutos), como se muestra en la gráfica 4.20.

Por lo que respecta a la acidez producida durante la fermentación se obtuvieron 0.86 y 0.93% de ácido láctico para las cepas 7 y Lm respectivamente, como se muestra en la gráfica 4.21

Los resultados del análisis de varianza, nos indicaron que no hubo una diferencia significativa con respecto a las variables pH y % de acidez, pues ambas cepas alcanzaron valores dentro de los rangos establecidos para este tipo de productos.

El tiempo para llevar a cabo la fermentación mostró una diferencia significativa, alcanzando los valores óptimos de pH y acidez 20 minutos antes la cepa Lm, que la cepa 7. El tiempo fué la variable más significativa, ya que el tiempo para llevar a cabo la fermentación fué



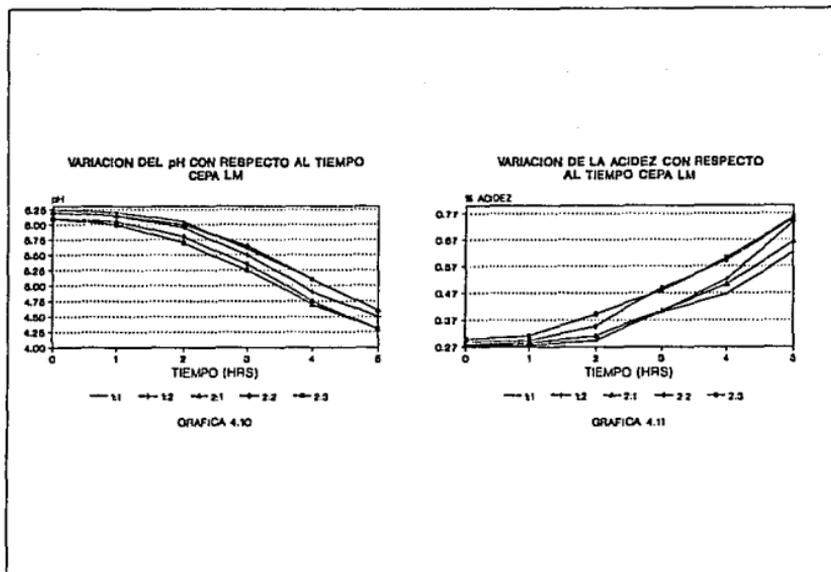
disminuido de 8 a 2 horas.

TABLA 4.4
DETERMINACION DEL NUMERO VIABLE DE CELULAS

CEPA	ABSORBANCIA	DILUCION	NUMERO DE COLONIAS	CONCENTRACION
ESTREPTOCOCO (St)	0.754	10^{-5} 10^{-6}	381 31	$381(10)^5$ C/ML $31(10)^6$ C/ML
LACTOBACILO (7)	0.771	10^{-5} 10^{-6}	483 79	$483(10)^5$ C/ML $79(10)^6$ C/ML
LACTOBACILO (Lm)	0.567	10^{-5} 10^{-6}	158 40	$150(10)^5$ C/ML $40(10)^6$ C/ML

Enfriamiento.

Se utilizó agua a una temperatura de 10°C/30 minutos.



Refrigeración.

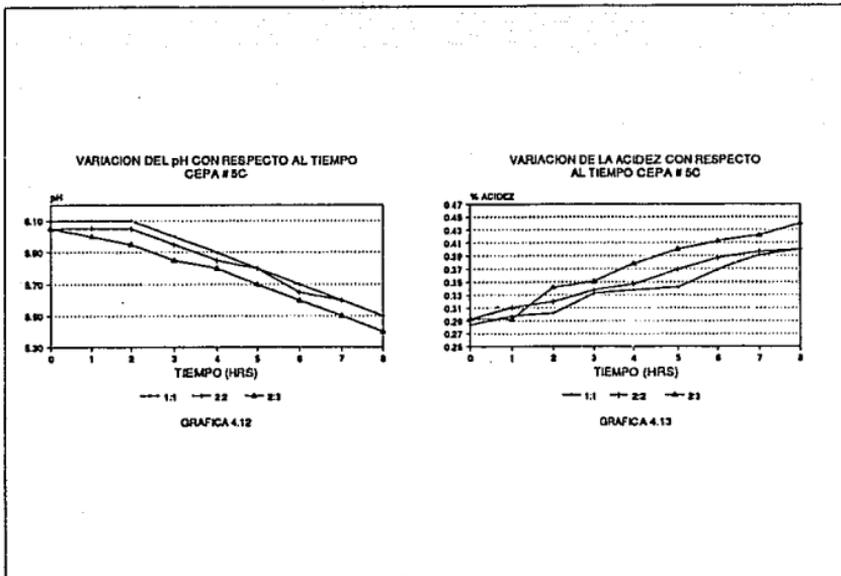
El producto obtenido se mantuvo en refrigeración a 8°C.

4.6.- Evaluación Sensorial.

Para establecer las diferencias que pudieran percibir los panelistas se seleccionaron yoghurts de similares características es decir en su sabor natural. Para la evaluación de los datos obtenidos, se realizó la prueba estadística de la prueba ji-cuadrada.

En la prueba de diferenciación entre las muestras se obtuvieron los siguientes resultados:

Para la cepa Lm comparada con los yoghurts comerciales A y B, el valor obtenido apartir de los datos experimentales fué de 0.62, tenemos que la hipótesis H_0 se acepta, ya que no hay diferencia significativa entre el número de aciertos.



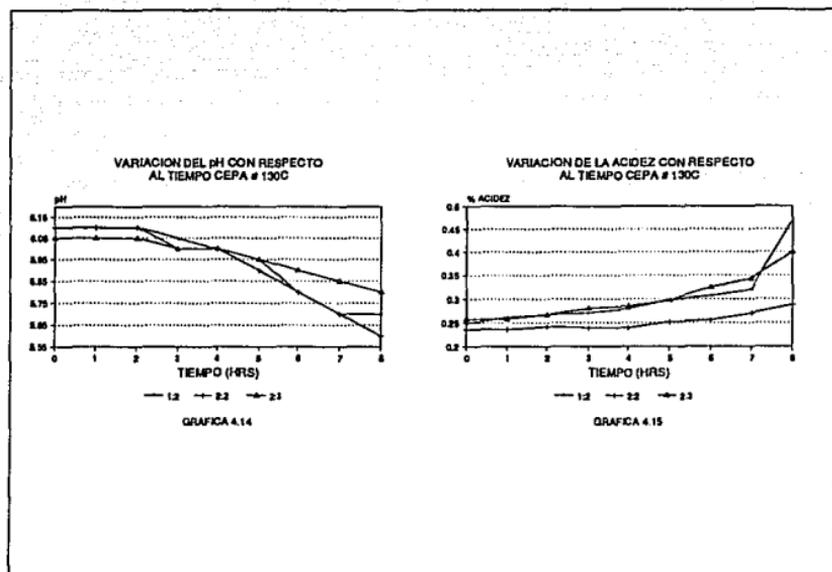
El mismo calculo estadístico se realizó para el yoghurt realizado con la cepa 7 con los yoghurt comerciales A y B. De igual forma la hipótesis H_0 se acepta, el valor obtenido de los datos experimentales es de 0.30 y el obtenido de tablas es 7.815 por lo que nuevamente no hay diferencia significativa entre el número de aciertos.

Como se modificó el sabor tanto del yoghurt comercial como el del experimental, a los cuales se les adicionó 5% de azúcar. Se realizó una prueba de análisis de preferencia, para cada uno de los atributos siguientes:

Olor

Para un valor de significancia de 0.005 y con 3 grados de libertad el resultado obtenido de la tabla de distribución Ji cuadrada obtenemos el valor 7.815. Del tratamiento estadístico obtenido de los datos experimentales la h calculada tiene un valor igual a "cero" por lo cual no cae dentro de la región crítica $h < 7.815$.

Por lo tanto se acepta H_0 ya que no hay diferencia significativa entre las muestras.



Sabor

La h calculada con los datos experimentales tiene un valor de $16.10 > h = 7.815$, se rechaza la H_0 y se concluye que se presenta una diferencia significativa, por lo cual se acepta la H_a .

Color

Comparando la h calculada con la H de tablas bajo los mismos parámetros $h = 3.461 < h = 7.815$, por lo tanto se acepta la H_0 , no hay diferencia significativa entre las muestras.

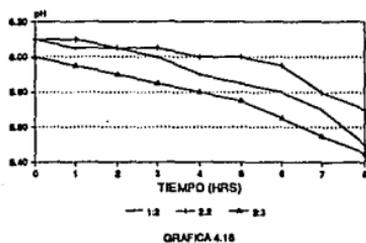
Textura

La h calculada tiene un valor de $h = 15.03 > h = 7.815$, por lo cual la H_0 es rechazada y se acepta la H_a , donde sí hay diferencias significativa entre las muestras.

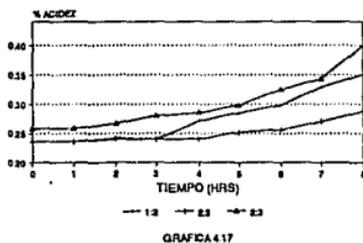
Calificación General.

La h calculada tiene un valor de $h = 3.346 < h = 7.815$, por lo cual aunque no son suficientes evidencias se acepta H_0 , no hay diferencia significativa.

VARIACION DEL pH CON RESPECTO AL TIEMPO
CEPA # SN2



VARIACION DE LA ACIDEZ CON RESPECTO
AL TIEMPO CEPA # SN2



En el tabla 4.5 se resume el total de los resultados obtenidos del análisis sensorial.

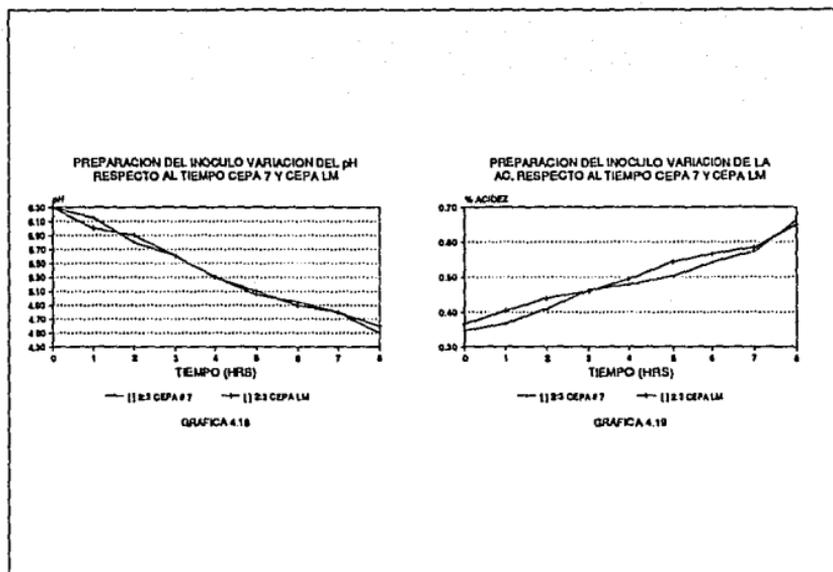


TABLA 4.5
ANALISIS ESTADISTICO DE LA EVALUACION SENSORIAL

ATRIBUTO	HIPOTESIS		h: CALCULADO	NIVEL DE SIGNIFICANCIA
	Ho	Ha		
OLOR	A=B=7=Lm	A>B>7>Lm	h=0	*
SABOR			h=16.10	**
COLOR			h=3.461	*
TEXTURA			h=15.03	**
CAL. GENERAL			h=3.346	*

NIVEL DE SIGNIFICANCIA = 0.005

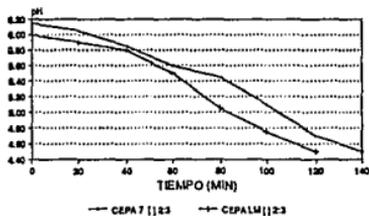
GRADOS DE LIBERTAD = 3

VALOR OBTENIDO DE TABLAS = 7.815

* NO SIGNIFICATIVO

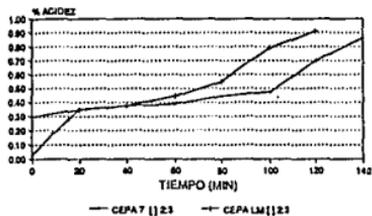
** SIGNIFICATIVO

PRODUCTO FINAL VARIACION DEL pH RESPECTO AL TIEMPO CEPA #7 Y CEPA LM



GRAFICA 4.20

PRODUCTO FINAL VARIACION DE LA ACIDEZ RESPECTO AL TIEMPO CEPA #7 Y CEPA LM



GRAFICA 4.21

CAPITULO V

DISCUSIONES

En base a los objetivos planteados y al desarrollo experimental, se obtuvieron los siguientes resultados para cada una de las fases propuestas:

Las cepas lácticas obtenidas de yoghurt comercial (fase I), y su posterior aislamiento y purificación fué mediante el empleo de medio agar Rogosa, el cual resultó ser un excelente medio de crecimiento de las cepas lácticas y de regeneración de éstas durante la experimentación. Sin embargo, recientes investigaciones han demostrado que las nuevas formulaciones o modificaciones a este medio de cultivo permiten una mejor identificación de cada una de las cepas por ser más selectivos para el crecimiento de dichas cepas (4,34). A nivel industrial las cepas usadas son mezclas tanto de lactobacilos como de estreptococos, y en algunas ocasiones se involucran cepas lácticas de otras especies, que favorecen la fermentación láctica, y que son especificaciones establecidas por el fabricante ya que el tiempo y la temperatura son parámetros importantes en el proceso industrial de obtención del yoghurt (42,45).

La prueba para la identificación de los lactobacilos fué por medio de las pruebas bioquímicas de reducción de azúcares. Un indicador del aprovechamiento del azúcar por el microorganismo fué el cambio de coloración del medio. Es importante resaltar en particular con respecto a la glucosa, que en dicho azúcar los lactobacilos aislados no presentaron producción de gas (no lo utiliza como fuente de energía), lo cual se vió reflejado en los tubos de Durham, aún después del tiempo de postincubación.

De acuerdo con los resultados obtenidos de las pruebas bioquímicas y según el manual Bergey's (6), las cepas identificadas correspondieron al Lactobacillus lactis.

Con respecto a la identificación del estreptococo, el aislamiento se logró en uno de los yoghurt comerciales (B), esto podría explicarse debido a la propia acidez del producto, ya que al principio de la fermentación crece mejor el estreptococo, por que el pH es alto y a medida que éste decrece, se favorece más el desarrollo de lactobacilo y éste domina la fermentación a pH inferior de 4.5 e incluso a pH de 4.2, inhibe el desarrollo de las bacterias (54), y por otro lado la presencia de sales o concentraciones altas de azúcar inhiben la fermentación (20). Es importante resaltar que no fué posible el aislamiento de lactobacilos, ni de estreptococos (en el yoghurt comercial D), quizá debido a que el producto recibió algún tratamiento térmico como parte de su elaboración.

Las pruebas realizadas para la identificación del estreptococo presentó resultados positivos de acuerdo a cada una de las pruebas de tolerancia para los esteptococos (8), con excepción de la temperatura de 10°C, la cual no se determinó, ya que no fué posible controlar dicha variable. En base a los resultados obtenidos el microorganismo identificado fué el Streptococcus thermophilus.

Con la obtención (fase II), de las 7 cepas de lactobacilos proporcionadas por el laboratorio de Bacteriología de la Unidad de Posgrado de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, las muestras fueron preparadas utilizando caldo Rogosa, para la conservación de éstas, durante toda

la experimentación. Sobre el efecto de la temperatura en su actividad metabólica (fase II), las cepas se sembraron en caldo Rogosa, durante 24 horas a 37°C, se determinó su absorbancia y el valor leído sirvió como referencia para la estandarización del inóculo. Se realizó la primer selección de cepas, utilizando el pH como parámetro de evaluación, se observó que conforme transcurrió el tiempo hubo un decremento en el pH, debido a la acidificación del medio; su fase de adaptación fué lenta, después de la cual empieza una fase más prolongada (y se provoca la disminución del pH) y finalmente una fase de estabilidad (hay una agotamiento del sustrato). Como lo muestran las cepas 5C, 130C, 7 y SN2 (gráfica 5.1), mientras que para la cepa 4C, su adaptación fué lenta y quizá hubiera requerido un tiempo mayor de adaptación, para presentar un similar comportamiento, tanto para la temperatura de 37°C como a 42°C (gráfica 5.2), por lo tanto la cepa 4C fué descartada, al ser lenta en la producción de acidez, corroborado por el análisis de varianza. Se realizó una segunda selección de cepas (fase III) utilizando la combinación de las diferentes cepas de lactobacilos con el Streptococcus thermophilus y el establecimiento de las diferentes relaciones cuantitativas empleando el mismo medio y estableciendo la temperatura óptima de 42°C, temperatura a la cual se realiza la fermentación láctica (37,65), se presentaron comportamientos similares tanto para la cepa comercial (Lm), como las de estudio (5C, 130C y 7). De las relaciones cuantitativas entre lactobacilos y estreptococos de los 5 niveles estudiados, 3 de ellos presentaron similar comportamiento (1:2, 2:2, 2:3), validado por el análisis de varianza. Como era de esperarse el pH alcanzó valores promedio de 4.5, en un tiempo de 8 horas. Cuando estas bacterias se desarrollan individualmente (aún en leche), su tiempo de coagulación es lento (de 8 a 10 horas aproximadamente) (54).

Para efectuar la 3ª selección de cepas, el medio de acidificación (caldo Rogosa) fué cambiado por leche de bovino, que es el medio natural para la obtención de yoghurt empleando las mismas cepas (5C, 130C, SN2, 7 y Lm) y las mismas relaciones cuantitativas (1:2, 2:2, 2:3). El comportamiento de las cepas fué similar al del caldo Rogosa. De los resultados obtenidos se tiene que las mejores cepas fueron Lm (Lactobacillus lactis) y 7 (Lactobacillus casei), así como que la mejor relación estreptococo/lactobacilo más adecuada fué la de 2:3, ya que se obtiene un producto tal que las características organolépticas (olor, sabor y formación de gel), son las que corresponden a un producto tipo yoghurt. Sin embargo el tiempo de fermentación no disminuyó, pues fué una etapa en la cual se evaluó la viabilidad de poder utilizar las cepas para el desarrollo de un producto láctico. El análisis de varianza reafirmó los resultados obtenidos a través de la experimentación.

Establecida la mejor relación (2:3) y para preparar el inóculo en la formulación del producto (fase IV), se realizó la estandarización de un volumen que mantuviera la misma concentración y relación cuantitativa de las cepas. Aunque el inóculo presentó una lenta adaptación quizá porque el volumen para preparar el inóculo fué mayor. Pero al utilizarlo ya como cultivo (5 %) el tiempo final de la fermentación fué reducido de las 8 horas totales hasta 2:00 horas para la cepa Lm (que fué la cepa aislada del yoghurt comercial) y de 2:20 horas para la cepa 7. Obteniendo los siguientes valores de acidez 0.93% y 0.86% expresado como ácido láctico, para la cepa Lm y 7 respectivamente. En recientes investigaciones se ha reportado que las bacterias no producen un agotamiento de la lactosa debido a que la acumulación del ácido en el medio actúa como inhibidor del desarrollo de las bacterias (54). El valor del pH fué de 4.5

(para ambas cepas), el cual es un rango adecuado en el cual alcanza su punto isoeléctrico, precipitan y forman el coágulo, característico en este tipo de productos. Estas cepas presentan cierta similitud al Lactobacillus bulgaricus, ya que alcanza los valores esperados de acidez (comprendida entre 0.8 a 1.8% expresado en ácido láctico). Con respecto a la utilización de otras cepas lácticas capaces de llevar a cabo la fermentación láctica se ha realizado una reclasificación de cepas; por ejemplo a partir del Streptococcus salivarius, en las subespecies salivarius y thermophilus, las cuales pueden emplearse en la elaboración de yoghurt el cual se vio reflejado en un buen desarrollo de aroma y sabor, esta es una importante consideración en la selección de cultivos y de la habilidad de crecimiento simbiótico (41).

Dependiendo de la presentación de cepas comerciales, cuando el cultivo iniciador se adquiere en ampollitas o liofilizados, a partir de éstos es necesario elaborar cultivos iniciadores en el laboratorio para después usarse en la producción industrial (54).

La propagación se lleva a cabo en varias etapas previas desde la preparación del cultivo madre en matraz (1ª etapa), a partir de éste se inocula otro volumen en bote (2ª etapa) y finalmente a una cuba de siembra (3ª etapa), siendo esta su propagación para su uso industrial. Si se considera el tiempo a partir del cultivo iniciador para que presente un yoghurt rígido o "aflanado" (en el matraz), le toma un tiempo hasta de 2.5 horas, y al utilizarlo para empezar la propagación (en botes), con un 2% o 3% de inóculo, su tiempo es de 1.5 a 2 horas y al propagarse finalmente en la cuba de siembra (fermentador), requiere del mismo tiempo, para que se presente dicha rigidez o "aflanado". La anterior metodología corresponde a un proceso batch o por lotes la cual es llevada a cabo a nivel industrial, ya que cada etapa requiere de un determinado tiempo, partiendo de estas bases y de acuerdo al desarrollo experimental en el laboratorio se comprobó la metodología propuesta, desde la preparación del cultivo madre y posterior seguimiento de la fermentación para elaborar el producto, estudiando las condiciones de operación, así como evaluar las características organolépticas de los productos y principalmente estudiar la variable del tiempo de fermentación siendo importante parámetro a nivel industrial. La cepa Lm obtenida del yoghurt comercial sirvió como referencia (tiempo total de fermentación de 2.00 horas), si se compara con la cepa 7 (tiempo de fermentación de 2:20 horas), ya que el tiempo para llevar a cabo la fermentación láctica (es aproximadamente de 2:30 horas), se encuentra dentro de los rangos establecidos cuando se utilizan las cepas originales para la elaboración del yoghurt, esto es de tomarse en cuenta como una opción para la producción de productos lácteos. Aunque en pocos países sin embargo, sólo requieren de una de las dos bacterias, como en Alemania e Inglaterra los cuales requieren solo el uso del Lactobacillus bulgaricus, mientras que en Australia requiere al Streptococcus thermophilus, con la elección de un lactobacilo asociado que se limita al uso del Lactobacillus acidophilus o Lactobacillus bulgaricus. Aunque esta selección está limitada no debe dudarse de un producto de cierto desagrado (52). Para poder evaluar el potencial real de las cepas 7 y Lm, estas deben sujetarse a un estudio a nivel de planta piloto, para poder establecer las variables de operación y condiciones de trabajo de donde se determinarían las bases para su desarrollo a nivel industrial. El análisis de varianza nos indicó que no hubo diferencia significativa de los resultados obtenidos, esto marcó la pauta para realizar un análisis estadístico no paramétrico sobre los productos obtenidos.

Con respecto a la última etapa se realizó una evaluación sensorial para la prueba del triángulo; tenemos que los panelistas identificaron la muestra diferente y los datos fueron analizados con estadística no paramétrica que es una herramienta de cuantificación matemática para determinar la validez y la confiabilidad de los análisis sensoriales. En dicha prueba los panelistas no encontraron una diferencia entre los yoghurts comerciales (A y B) de los yoghurts experimentales (cepas 7 y Lm), siendo el principal atributo a evaluar el sabor. Algunas otras características como la textura o consistencia y quizá el color, fueron tomadas en cuenta para evaluar en la 2ª parte cuando se realizó el análisis de preferencia. En base a una escala hedónica de 7 puntos, y en base al análisis estadístico con la prueba de Kruskal-Willis (33,49,66), tenemos que para el olor y el color no encontraron una diferencia entre las muestras experimentales con respecto a las comerciales lo cual no indica una aceptación respecto al primer atributo (al igual que en la prueba del triángulo), pero con respecto al sabor y la textura, se encontró que hay diferencias, pues se presenta una mayor aceptación en los productos comerciales cuya textura y consistencia fueron mejores.

Con respecto a los atributos analizados los yoghurts experimentales tuvieron menor aceptación que los comerciales lo cual era de esperarse, puesto que no son las cepas tradicionales con las que se elabora un yoghurt, este mismo comportamiento se presentó con la textura. Con respecto a este último es necesario remarcar que en la elaboración de los yoghurts experimentales no se empleó ningún tipo de estabilizante a diferencia del yoghurt comercial, que normalmente lo contiene, esto provoca la diferencia en aceptabilidad pues la utilización de espesantes o estabilizantes favorece las características de textura por parte del consumidor.

El uso de estabilizantes es una práctica muy común en algunos países, sin embargo, puede ser elaborados sin aditivos. Estos tienen la ventaja de conferirle mayor fuerza a la estructura del gel que la hace menos vulnerable a los cambios mecánicos que pueden ocasionar la ruptura del coágulo. Se mejora el cuerpo y la textura, así como la apariencia (21). Los estabilizantes comúnmente utilizados son la gretina, almidón, caragenina, gomas como la guar, algarrobo, pectina, etc, (52). Algunos autores señalan que los aditivos autorizados para utilizarse en productos lácteos pueden ser los que se obtienen de la adición de frutas o extractos de fruta, en diferentes formas (pulpas, saborizantes), que generalmente están asociadas con sacarosa con una proporción límite de aditivo de 25 al 30%, de acuerdo a cada país (52).

La preparación del yoghurt y de otros productos lácteos no están libres de presentar defectos en el cuerpo, consistencia y sinéresis, el cual es un problema en la industria láctea. La presencia del suero disminuye la preferencia del consumidor hacia este tipo de productos y esto usualmente indica formulaciones o tratamientos inadecuados. Muchas formulaciones de yoghurt incorporan hidrocoloides de plantas o animales, los cuales imparten un deseable espesamiento, estabilidad o efecto de gelatinización. Existe una gran variedad de compuestos denominados como estabilizantes y agentes fortificantes, entre los que se incluye 3 a 4% de leche en polvo descremada, suero en polvo, caseinato de sodio, y leche concentrada por ultrafiltración u ósmosis inversa. Sin embargo el uso de estos puede presentar problemas, el suero imparte un sabor desagradable y la leche en polvo descremada una producción excesiva de ácido (43).

Se encuentra en proceso de legalización un anteproyecto de la Norma Oficial para la elaboración de yoghurt, la cual establece que para el uso de gomas por ejemplo, como la arábica,

tragacanto y xantana debe ser en una cantidad máxima de 0.2%, así como también para la gelatina o alginato de sodio o potasio (46). Debido al manejo mecánico que requiere el yoghurt es común el rompimiento del gel y el desuerado, lo cual representa un problema de presentación y un defecto de elaboración. Para eliminar estos problemas se adicionan gomas, aunque la tendencia actual es sobre el uso de cepas formadoras de gomas o polímeros como la cepa Streptococcus filant, lo que reduciría tiempos de mezclado e insumos, ya que su uso presenta la ventaja de mantener la acidez, aroma y el sabor característico, y muestran una clara ventaja en el aumento de viscosidad y en la prevención de sinéresis, sobre las cepas originales que se utilizan para este tipo de productos (19,20). El Streptococcus filant ha sido empleada en la elaboración de leches fermentadas escandinavas. En recientes investigaciones se han encontrado que especies de Lactobacillus delbrueckii ssp.bulgaricus, que bajo diferentes condiciones de crecimiento producen polímeros (19,22). Lo cual es una ventaja sobre el uso de estabilizantes o espesantes para obtener un producto fermentado natural (21).

Cuando los panelistas evaluaron en forma global los atributos de cada una de las muestras presentadas, para dar una calificación general, se obtuvo un consenso de aceptabilidad. Se debe aclarar que fué necesario adicionar azúcar al yoghurt experimental, ya que para la venta al público el yoghurt comercial (algunos) vienen adicionados con edulcorantes.

Por último cabe señalar que se realizó el producto en su forma natural. Aunque la acidez es un parámetro de la aceptabilidad del producto, otro criterio de calidad de evaluación del yoghurt son las propiedades físicas del gel, el yoghurt rígido presenta un gel firme, y por otra parte el yoghurt batido tiene una consistencia "semi-sólida". Las propiedades físicas del yoghurt se ven influenciadas por la composición de la leche y las condiciones de operación. Las variables que pueden afectar dichas propiedades físicas, incluyen el tratamiento térmico aplicado a la leche, el contenido de proteína, homogenización y la presencia de estabilizantes (17). El crecimiento en el consumo de yoghurt, es generalmente atribuido a la introducción de fruta al producto. El yoghurt batido (o estilo suizo), ha reemplazado al yoghurt rígido, también frutado (fruta adicionada en el fondo del envase), en México los sabores más consumidos son fresa, durazno y mango (20,27).

CAPITULO VI

CONCLUSIONES

En base a los objetivos planteados y la metodología estudiada en el presente trabajo se concluye lo siguiente:

- Se aislaron, clasificaron e identificaron, las cepas lácticas presentes en yoghurt comerciales siendo estos el Lactobacillus lactis (Lm) y Streptococcus thermophilus (St).
- De las diferentes cepas lácticas proporcionadas por el laboratorio de Bacteriología, solo se seleccionó una de ellas en base a los resultados obtenidos en cada una de las diferentes fases experimentales siendo ésta la cepa 7 Lactobacillus casei.
- El medio agar Rogosa demostró ser un medio óptimo de desarrollo para las cepas identificadas (medio sólido), y se utilizó como medio de acidificación (medio líquido), para la selección de las cepas lácticas.
- Con la temperatura de 42°C, se obtuvo la mayor producción de acidez, el cual se vio reflejado en las determinación del parámetro pH.
- De las diferentes relaciones cuantitativas propuestas se determinó que la mayor relación fué la 2:3, con la cual se estableció el inóculo para la preparación del producto final.
- Al emplear como medio de acidificación leche de bovino y ajustada a un contenido de sólidos, lo que permitió observar las características organolépticas del producto y se confirmó la selección de la mejor relación cuantitativa.
- El posible uso de cepas de diferentes especies para la elaboración de productos fermentados fué factible ya que se seleccionó y evaluó las cepas tomando en cuenta la producción de acidez, la cantidad de inóculo, la temperatura y el tiempo de fermentación.
- El proceso se realizó por etapas (batch o lote), donde la variable tiempo fué disminuído hasta en aproximadamente 4 horas.
- En general el producto tipo yoghurt obtenido en el laboratorio tuvo una buena aceptación por parte de los panelistas.
- Se debe reconocer sus desventajas con respecto al sabor ya que obtuvo una diferencia significativa a través del análisis de varianza, siendo posible su utilización en mezclas con otras cepas lácticas y realzar el atributo del sabor.
- La evaluación sensorial mostró que no hubo diferencia significativa entre el producto obtenido en el laboratorio y el estandar comercial en cuanto al olor y sabor, pero no

así en cuanto a textura donde el producto comercial presento una mejor aceptación, posiblemente debida al uso de estabilizantes.

RECOMENDACIONES

Como recomendaciones en base a las observaciones realizadas en el presente trabajo son:

Llevar a cabo investigaciones para la identificación y aislamiento de cepas lácticas, basada en las técnicas establecidas, de bajo costo y en el menor tiempo posible. Debido a que las cepas lácticas que se utilizan en la industria láctea (quesos maduros, mantequilla, yoghurt, etc.), son productos de importación es necesario enfocar investigaciones biotecnológicas para la producción y comercialización de fermentos lácticos, adaptándolos a las necesidades de cada industria.

Entre los problemas más frecuentes con los cuales el consumidor rechaza el producto terminado, se enumeran varios como son: sinéresis, excesiva acidez y dependiendo del tipo puede ser viscoso (como el yoghurt líquido), sin cuerpo y consistencia (como el yoghurt rígido), con residuos de fruta o sin está, exceso de color, etc. Por lo cual es necesario realizar estudios de proceso, durante el almacenamiento, transportación y comercialización del producto hasta los centros de distribución.

La apertura del mercado traerá como consecuencia la competencia con mejores tecnologías, por lo cual es necesario innovar o modificar las técnicas establecidas en la producción de yoghurt, mejoramiento del producto, nuevos diseños de empaque, etc., basado tanto en estudios de mercado, así como proyecciones estadísticas sobre el perfil de aceptación del consumidor por este tipo de productos.

CAPITULO VII

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Alais, Ch. (1988). Ciencia de la leche. Principios de técnica lechera. Ed. C.E.C.S.A. 7ª Impresión. D.F. México.
- 2.- Badui, S. (1986). Química de Alimentos. Ed. Alambra Mexicana. 4ª Reimpresión. D.F. México.
- 3.- Bauernfeind, J.C, et al (1983). El ácido ascórbico en los productos lácteos. Industria Alimentaria, 5-13.
- 4.- Bracquart, P. (1981). An agar medium for the differential numeration of Streptococcus thermophilus and Lactobacillus bulgaricus in yoghurt. J. Applied Bacteriology, October, 51 (2) 303-305.
- 5.- Borderías, A.J. (1983). Análisis de textura. Grasas y Aceites. Nov.-Dic. 34 (6) 407-413.
- 6.- Buchanan, et al. (1974). Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. The Williams and Wilkins, Baltimore, U.S.A.
- 7.- Cámara de Productos y Alimentos Elaborados con leche. (1985). Estadísticas de leche y sus derivados en México.
- 8.- Cowan, S.T. (1982). Manual para la identificación de bacterias de importancia médica. Ed. C.E.C.S.A. D.F. México.
- 9.- Choi, H. (1985). Sweetened plain and flavored carbonated yogurt beverages. J. Dairy Sci. 68 (3) 613-619.
- 10.- Cultivos lácteos . Chr. Hansen's Laboratory. (1978). Milwaukee, Wisconsin, U.S.A.
- 11.- Dana, M.G. and Thompson, M.P. (1976). Hydrolyzed Lactose Cultured Dairy Products II. Manufacture of Yoghurt, Buttermilk and Cottage Cheese. Cultured Dairy Products Journal. August. 11 (16) 12-13.
- 12.- Daniels, W.W. (1985). Bioestadística. Bases para el Análisis de las Ciencias de la Salud. Ed. Limusa. D.F. México.
- 13.- Davis, B. (1978). Tratado de Microbiología. Ed. Salvat Editores. S.A. 2ª Ed. Barcelona, España.
- 14.- De Man, J.C., Rogosa, M. and Sharpe, M.E. (1960). A medium for the cultivation of lactobacilli. J. of Applied Bacteriology. 23: 131-135.
- 15.- Desrosier, N. (1983). Elementos de Tecnología de Alimentos. Ed. C.E.C.S.A. D.F. México.
- 16.- Egan, H. & Kirk, R. (1987). Análisis Químico de Alimentos de Pearson. Ed. C.E.C.S.A. D.F. México.
- 17.- Estelle, M., Parcell-Clunies, Y. et al (1986). Influence of heat treatment of milk on the flow properties of yoghurt. J. Food Sc. 51 (6) 1459-1462.
- 18.- Fennema, O. (1982). Introducción a la ciencia de los alimentos. Ed. Reverté, S.A., Barcelona, España.
- 19.- Galvan, M.M.G. (1989). Evaluación sensorial del yoghurt elaborado con cepas productoras de gomas. Tec. Aliment. (México). 24 (4) 28.
- 20.- García, G.M. (1986). Yogurt: Aspectos microbiológicos y de elaboración. Tec. Aliment. (México). 21 (6) 5-13.

- 21.- García, G.M. (1990). Yogurt : Opciones de desarrollo tecnológico. Boletín de Información Ciencia y Tecnología de Alimentos (PUAL). 1 (2) 9-13.
- 22.- García, G.M. (1991). Polymer production by Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus. J. of Applied Bacteriology. 70: 325-328.
- 23.- Gastelu, M.C. (1986). Elaboración de productos fermentados tipo yoghurt empleando mezclas de leche entera en polvo y suero dulce desmineralizado. Instituto Chihuahuense de Investigación y Desarrollo de la Nutrición. Chihuahua, Chih. México. 1-11.
- 24.- Gibbs, P.A. (1987). Novel uses for lactic acid fermentation in food preservation. J. of Applied Bacteriology Symposium Supplement. 515-585.
- 25.- González y Merchan, et al (1986). Manual de Prácticas de Microbiología General. Depto. Microbiología I.P.N. D.F. México.
- 26.- Gurr, M.I. (1984). The nutritional role of cultured dairy products. Can. Inst. Food Sci. Tech. 17 (2) 57-64.
- 27.- Harper, W.J.(1985). Cultured Dairy Products. Food. Tech. in New Zealand. 20 (10) 29-33.
- 28.- Harvey, C.(1967). Leche: Producción y control. Ed. Academia. Leon, España.
- 29.- Heath, H. (1983). Flavours for dairy products. Flav. Ing. Proc. Dic. 5 (12) 31 + (3 p).
- 30.- Hernández, S.H. y Kosikowski, F.V. (1986). Elaboración de bebidas tipo kefir empleando mezclas de suero dulce desmineralizado y leche entera en polvo. Tec. Aliment. (México) 21 (5) 9-12.
- 31.- Hull, R.R. (1985). Recent developments in the genetics of lactic acid bacteria. Food Research Quarterly. Jun. 45 (2) 40-46.
- 32.- Sabores y extractos para productos lácteos. (1985). Industrias Lácteas. Feb. 34 (1) 14-21.
- 33.- Infante, Said. (1984). Métodos Estadísticos. Un enfoque interdisciplinario. Ed. Trillas, D.F.México.
- 34.- Yoghurt : Enumeration of characteristic microorganismos and count technique at 37°C. International Organization for Standardization (1985). 150/DIS/7898.
- 35.- Keith, G. (1985). Lactose in dairy processes. Food Tech. in New Zealand, Jun. 20 (6) 32-33. 36.- Kilara, A. (1978). Lactic fermentations of dairy foods and their biological significance. J. Dairy Sci. 61 (12) 1793-1800.
- 37.- Kon, S. (1982). La leche y los productos lácteos en la nutrición humana. Ed. F.A.O. Roma, Italia.
- 38.- Kosikowski, F.V. (1977). Chesse and Fermented Milk Foods. F.V. Kosikowski and Associates. 2ª Edición. Brookfield. U.S.A.
- 39.- Martín, D.W; et. al (1986). Bioquímica de Harper. Ed. El Manual Moderno, S.A. D.F. México.
- 40.- Martínez, D. G. (1987). Contribución al estudio de la fabricación del yoghurt. Lácteos Mexicanos. Feb.-Mar. 2 (5) 8-12.
- 41.- Marsahl, W.N. (1985). Fermentation of milk by Streptococcus salivarius subspecies salivarius and Streptococcus salivarius subspecies thermophilus and

- their use to the yoghurt manufacturer. The Journal of applied bacteriology. August, 89 (2) 147-151.
- 42.- Mendoza, D.R. (1986). Elaboración de yoghurt bajo en grasa. Instituto Chihuahuense de Investigación y Desarrollo de la Nutrición. Chihuahua, Chih. (México) 1-15.
 - 43.- Modler, H.W; Larmond, C.S.; Lin, D.(1983). Physical and sensory propieties of yoghurt estabilized with milk proteins. J. Dairy Sci. 66; 442-429.
 - 44.- Noami, H. (1977). Sensory Panel Designs with Data Evaluation Procedures. The Coca-Cola Company, Food Division. Houston, U.S.A.
 - 45.- N.O.M.-F-446-1984.-Lácteos-Leche.
 - 46.- N.O.M-F-1990. Alimentos Lácteos-Yoghurt.
 - 47.- Pederson, C.S. (1971). Microbiology of food fermentations. A.V.I. U.S.A.
 - 48.- Pedrero, D. (1986). Análisis sensorial y algunas de sus consecuencias. Tec. Aliment. (México). XVII (3) 26-29
 - 49.- Pedrero, D. (1989). Análisis sensorial de los alimentos. Métodos analíticos. Ed. Alhambra Mexicana. 1ª Edición. D.F. México.
 - 50.- Prell, H. (1976). Preparation of reports and manuscripts which include sensory evaluation data. Food Tech. November 30 (11) 40-44.
 - 51.- Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Control Sanitario de Actividades, Establecimientos, Productos y Servicios. (1988)
 - 52.- Reines, D. (1984). Regulations concerning fermented milk products.-Foreign regulations. I.D.F. Bulletin. 179 (6) 100-105.
 - 53.- Rodríguez, F.J. (1986). Edulcorantes. Tec. Aliment. (México). 21 (4) 12-17.
 - 54.- Ruiz, A. (1990). Fabricación de yoghurt. Memorias Curso: Tecnología de lácteos. Programa Universitario de Alimentos. Octubre (22 al 26), p. 1-17.
 - 55.- Salji, J.P. and Ismail, A.A. (1983). Effect of initial acidity of plain yoghurt on acitiy changes during refrigerated storage. J. of Food Sci. 48 (1) p. 258-259.
 - 56.- Sampeiro, J.J.M. (1980). Estudio sobre la manufactura de algunos aspectos de control en el laboratorio en la elaboración de yoghurt. Tesis Profesional I.P.N., D.F. México.
 - 57.- Santos, A. (1982). Bioquímica de la leche y sus productos. Ed. U.A.Ch. Edo. de México. México.
 - 58.- Sellars, R. L. (1978). Cultivos para la elaboración de productos lácteos. CHR. Hansen-s Laboratory, Inc. Milwuakee, Wisconsin, U.S.A.
 - 59.- Soroa, J. (1974). Industrias Lácteas. Ed. Aedos. 5ª Edición. Barcelona, España.
 - 60.- Spreer, E. (1975) Lactología Industrial. Ed. Acribía. Zaragoza, España.
 - 61.- Stainer, R. (1986). Microbiología. Ed. REPLA.S.A. D.F. México.
 - 62.- Stamer, J.R.(1979). The lactic acid bacteria: microbes of diversity. Food Tech. January, 1 (33), 60-65.
 - 63.- Stone, H. (1985). Sensory Evaluation Practices. Ed. Academic Prees, Inc. Florida, U.S.A.
 - 64.- Vedamuthu, E. (1978). Natural (unhydrolized) milk versus lactosa hidrolized milk for culture. J. Food Protec. August, 41 (8) p. 654-659.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

- 65.- Veisseyre, R. (1988). Lactología Técnica. Ed. Acribfa. 1ª Reimpresión. Zaragoza, España.
- 66.- Walpole R. (1987). Probabilidad y Estadística para Ingenieros. Ed. Interamericana, 3ª Edición. D.F. México.

APENDICE

Agar Rogosa

Parte A

Extracto de carne	2.5 grs.
Extracto de levadura	1.25 grs.
Acido Ascórbico	0.25 grs.
Peptona de soya	2.5 grs.
Polipeptona	2.5 grs.
Acetato de Sodio anhidro	1.5 grs.
Agar Bacteriológico	5.5 grs.

Colocar los ingredientes en 450 ml de agua destilada, esterilizar a 121°C durante 15 minutos y una presión de 15 libras.

Parte B

Lactosa	2.5 grs.
---------	----------

Colocarla en 50 ml de agua destilada, esterilizar a 10 libras de presión durante 15 minutos. Mezclar la parte A y la parte B, servir en cajas de petrí estériles.

Caldo Rogosa

Parte A

Extracto de carne	2.5 grs.
Extracto de levadura	1.25 grs.
Acido Ascórbico	0.25 grs.
Peptona de soya	2.5 grs.
Polipeptona	2.5 grs.
Acetato de sodio anhidro	1.5 grs.

Colocarlos en 450 ml de agua destilada, esterilizar a 121°C por 15 minutos y una presión de 15 libras.

Parte B

Lactosa	2.5 grs.
---------	----------

Colocarlos en 50 ml de agua destilada, esterilizar a 10 libras de presión por 15 minutos. Mezclar la parte A y la parte B y servir en tubos de rosca estériles.

Caldo MRS (modificado para carbohidratos)

Extracto de levadura	5 grs.
Peptona	10 grs.
Tween 80	1 ml.
K_2HPO_4	2 grs.
$CH_3COONa \cdot 3H_2O$	5 grs.
$MgSO_4 \cdot H_2O$	0 grs.
Agua destilada	1000 ml

Preparar solución al 0.2% de rojo de clorofenol y agregar 20 ml por cada 1000 ml de caldo MRS modificado para carbohidratos y esterilizar a 20 libras de presión por 15 minutos, ajustando el pH entre 6.2-6.5.