



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

DISPOSITIVO DE BACTERIAS LÁCTICAS INMOVILIZADAS
EN UN SOPORTE DE CELULOSA PARA LA PRODUCCIÓN
DE UNA BEBIDA TIPO YOGUR.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICA DE ALIMENTOS

PRESENTA
DULCE ADRIANA DE LA CRUZ MENDIETA



MÉXICO, D.F.

2013



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 esta 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.

JURADO ASIGNADO

Presidente: M. en C. Lucia Cornejo Barrera
Vocal: Q. F. B. Rodolfo Fonseca Larios
Secretario: Dr. José Pablo Pérez-Gavilán Escalante
Primer Suplente: Dra. Iliana Elvira González Hernández
Segundo Suplente: Q. A. Valentín Gómez García

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TRABAJO EXPERIMENTAL:

Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.
Departamento de Biología Molecular y Biotecnología.

ASESOR DEL TEMA

Dr. José Pablo Pérez-Gavilán Escalante _____

SUPEVISOR TÉCNICO

Q.A. Luis Macedo Segura _____

SUSTENTANTE

Dulce Adriana de la Cruz Mendieta _____

AGRADECIMIENTOS

A **Dios**, por permitirme coincidir en tiempo y espacio en este mundo, por obsequiarme a la mejor familia y por todas y cada una de las personas que ha puesto en mi camino.

A **mis padres**, porque gracias a ellos estoy aquí, por darme todo su amor y apoyo incondicional durante toda mi vida.

A mi amada universidad, la **U.N.A.M.**, por abrirme sus puertas y permitirme ser parte de ella, a dos de sus dependencias; la **Facultad de Química**, que durante mi carrera, no sólo fue mi escuela, si no también, mi hogar, el lugar en donde pase una de las mejores etapas de mi vida, y el **Instituto de Investigaciones Biomédicas**, sitio que me abrió sus puertas para desarrollar este proyecto y con ello concluir una de las metas más importantes en mi vida.

A **Dr. Pablo Pérez – Gavilán**, por la confianza depositada en mí al aceptarme para desarrollar este proyecto, por su valiosa asesoría, sabios consejos, guiarme y compartir conmigo sus experiencias profesionales, porque para mí es un ejemplo a seguir.

A **Q. A. Luis Macedo Segura** que desde que lo conozco me brinda la confianza y apoyo incondicional en el desarrollo de este proyecto, además de su amistad.

A **E. en Biot. Marco Antonio Ortiz** por colaborar en el desarrollo de este proyecto, ya que siempre estuvo pendiente de lo que se ofreciera para ayudarme.

A los **honorables miembros del jurado**, excelentes personas y maestros, tuve la fortuna de conocerlos en las aulas de la Facultad de Química y fueron parte importante en mi formación académica además de destinar su tiempo para revisar esta tesis y enriquecerla con sus valiosas opiniones.

A mis compañeritos de laboratorio, **Laura, Denise, Néstor, Dnéfetm** ¡¡gracias!! porque el tiempo que compartimos en el laboratorio fue muy agradable, desde los momentos de trabajo intenso hasta los momentos más relax, además siempre que necesite ayuda, ustedes estuvieron ahí para apoyarme.

A todas y cada una de las personas que se han cruzado en mi camino, familiares, amigos, maestros y colegas ya que cada uno ha dejado huella en mí, me han dado una gran lección de vida y maravillosas experiencias.

DEDICATORIAS

A mis padres

Las personas que más amo en el mundo, ustedes que han dedicado su vida a darnos todo su amor y apoyo a mis herman@s y a mí, que han puesto su mayor esfuerzo para que cumplamos nuestras metas y sueños, este logro es de ustedes, me siento tan feliz por pertenecer a su familia y darles esta gran satisfacción.

A mis herman@s

Mónica, Angie y Toño

Las personitas que han estado siempre a mi lado, apoyándome en todo momento, porque a pesar de todo, se que siempre estarán ahí cuando los necesite, porque sin ustedes la vida no sería la misma.

A mi tío Toño

Por ser un excelente tío y el apoyo incondicional que me has brindado.

A mis amiguis Q.A.'s

Que son personitas maravillosas!!

Lau y Marifer con ustedes el tiempo el laboratorio era increíble, porque entre todas nos motivamos y apoyamos para seguir luchando por nuestras metas ¡las quiero mucho!

A mis B*FF

Beto, Bri, Bren, Eli, Eve, Marce, Mari, Miriam y Nil
Por compartir conmigo estos años de universidad, porque encontré en ustedes a unas personitas bien loquitas, pero bien buena onda, a las cuales aprecio y quiero mucho, se que siempre estarán cuando l@s necesite al igual que yo para ustedes y porque junt@s “hacemos buena química” ;)

A mis tíos

Mi hermosa tía, que ha sido como otra mamá, y mi tío Roberto que al igual que mi tía siempre me han apoyado en todos los aspectos, les agradezco todo el amor que siempre nos han brindado, ustedes que siempre me han alentado para cumplir las metas que me proponga y por sus sabios consejos.

A mis primos

Pavel y Vladimir

Por el cariño, amistad y apoyo incondicional, por ser los mejores primos del mundo, porque me han demostrado su amor y cariño en todos los momentos de mi vida.

Abuelita Marina

Que has sido una excelente abuela, porque has visto por nosotros desde que nacimos, por tu fortaleza y cariño incondicional.

A mis sobrinitos

Anaid y Victor

Que desde que nacieron llegaron para hacer más feliz mi vida, ¡los amo como si fueran mis hijos! :)
porque son un motivo para seguir luchando por ser mejor cada día, ¡siempre estaré para ustedes peques!

A mis incondicionales

Alex, Ligia, Oscar, Yair y Yeka

Me siento tan afortunada de coincidir con ustedes en este mundo, de verdad con ustedes he vivido experiencias maravillosas y de todo tipo, me han demostrado que con ustedes siempre podre contar, por eso y más ¡los súper quiero!

Con todo mi ♥

Dulce Adriana

ÍNDICE.

| | Pág. |
|--|----------|
| 1. Introducción..... | 1 |
| 2. Objetivos..... | 4 |
| 3. Marco Teórico..... | 6 |
| 3.1 Antecedentes Históricos..... | 7 |
| 3.2 Leche..... | 8 |
| 3.3 Producción de leche en la glándula mamaria..... | 8 |
| 3.4 Composición química de la leche..... | 11 |
| 3.4.1 Agua..... | 12 |
| 3.4.2 Grasa (Biosíntesis de lípidos de la leche)..... | 12 |
| 3.4.3 Proteína (Biosíntesis de proteínas de la leche)..... | 16 |
| 3.4.4 Lactosa (Biosíntesis de lactosa de la leche)..... | 18 |
| 3.4.5 Minerales..... | 18 |
| 3.4.6 Vitaminas..... | 20 |
| 3.5 Leche y Productos lácteos..... | 21 |
| 3.6 Proceso de industrialización de la leche..... | 23 |
| 3.6.1 Proceso de industrialización de leche fluida..... | 23 |
| 3.6.2 Proceso de industrialización de leche en polvo..... | 28 |
| 3.7 Bacterias Ácido Lácticas (BAL)..... | 29 |
| 3.7.1 Clasificación de BAL..... | 30 |
| 3.7.2 Fermentación de hidratos de carbono..... | 32 |
| 3.7.3 Proteólisis..... | 33 |

| | | |
|-----------|--|-----------|
| 3.7.4 | Transformación de aminoácidos libres..... | 33 |
| 3.7.5 | Lipólisis..... | 34 |
| 3.7.6 | Beneficios de las BAL..... | 35 |
| 3.8 | Características del género <i>Lactococcus</i> | 39 |
| 3.9 | <i>Lactococcus lactis ssp. lactis</i> | 40 |
| 3.10 | Yogur..... | 42 |
| 3.11 | Leches fermentadas..... | 46 |
| 3.11.1 | Importancia de las leches fermentadas como alimentos funcionales..... | 48 |
| 3.11.2 | Valor nutricional de las leches fermentadas..... | 50 |
| 3.12 | Inmovilización celular..... | 52 |
| 3.13 | Conservación de bacterias..... | 56 |
| 4. | Materiales y Métodos..... | 58 |
| 4.1 | Materiales..... | 59 |
| 4.1.1 | Microorganismo..... | 59 |
| 4.1.2 | Medios de cultivo..... | 59 |
| 4.1.3 | Soporte sólido..... | 61 |
| 4.1.4 | Leches empleadas..... | 61 |
| 4.2 | Metodología..... | 63 |
| 4.2.1 | Propagación de la cepa <i>Lactococcus lactis ssp. lactis</i> | 63 |
| 4.2.2 | Curva de crecimiento..... | 64 |
| 4.2.3 | Inmovilización de <i>Lactococcus lactis ssp. lactis</i> en celulosa..... | 65 |
| 4.2.4 | Cuantificación de <i>Lactococcus lactis ssp. lactis</i> antes y después de la inmovilización..... | 66 |

| | | |
|-----------|---|------------|
| 4.2.5 | Aplicación del dispositivo a diferentes tipos de leche incubadas a diferentes temperaturas..... | 66 |
| 4.2.6 | Evolución de pH, acidez y viscosidad al aplicar el dispositivo en diferentes tipos de leche a temperatura ambiente..... | 68 |
| 4.2.7 | Prueba de preferencia de la bebida tipo yogur..... | 68 |
| 4.2.8 | Influencia del tiempo de almacenamiento en el dispositivo..... | 70 |
| 5. | Resultados y Discusión..... | 72 |
| 5.1 | Curva de crecimiento..... | 73 |
| 5.2 | Cuantificación de <i>Lactococcus lactis ssp. lactis</i> antes y después de la inmovilización..... | 76 |
| 5.3 | Aplicación del dispositivo a diferentes tipos de leche y diferentes temperaturas..... | 76 |
| 5.4 | Evolución de pH, acidez y viscosidad al aplicar el dispositivo en diferentes tipos de leche a temperatura ambiente..... | 84 |
| 5.5 | Prueba de preferencia de la bebida tipo yogur..... | 90 |
| 5.6 | Influencia del tiempo de almacenamiento en el dispositivo..... | 94 |
| 6. | Conclusiones..... | 98 |
| 7. | Bibliografía..... | 100 |
| 8. | Anexos..... | 109 |
| | Anexo A Determinaciones..... | 110 |
| | Anexo B Viscosímetro Brookfield..... | 112 |
| | Anexo C Tablas estadísticas utilizadas..... | 120 |

Índice de Cuadros

| | Pág. |
|--|------|
| Marco Teórico | |
| Cuadro 1. Composición general de la leche de vaca..... | 12 |
| Cuadro 2. Composición química de la leche de diferentes razas de vacas (%)..... | 13 |
| Cuadro 3. Especificaciones de leche pasteurizada y ultrapasteurizada..... | 22 |
| Cuadro 4. Composición aproximada (% p/p) de leche entera en polvo..... | 22 |
| Cuadro 5. Resumen de los efectos beneficiosos de las BAL..... | 35 |
| Cuadro 6. Composición típica del yogur (g/100 g de producto) en México..... | 43 |
| Cuadro 7. Clasificación de las leches fermentadas de acuerdo con el tipo de flora dominante..... | 47 |
| Materiales y Métodos | |
| Cuadro 1. Composición del medio industrial..... | 60 |
| Cuadro 2. Composición del agar APT..... | 60 |
| Resultados y Discusión | |
| Cuadro 1. pH de las bebidas tipo yogur a diferentes temperaturas..... | 78 |
| Cuadro 2. Acidez (% ácido láctico) de las bebidas tipo yogur a diferentes temperaturas.... | 80 |
| Cuadro 3. Tiempo de escurrimiento (segundos) de las bebidas tipo yogur a diferentes temperaturas..... | 83 |
| Cuadro 4. pH y acidez de las leches fermentadas con el dispositivo (25 horas) a temperatura ambiente para realizar la prueba de preferencia..... | 91 |
| Cuadro 5. Diferencia de Σ con tablas de Newell y MacFarlane..... | 92 |
| Cuadro 6. Acidez y pH de las bebidas fermentadas (25 horas) a temperatura ambiente con el dispositivo almacenado a diferente tiempo..... | 94 |
| Cuadro 7. Resultados prueba triangular..... | 95 |

Índice de Figuras

| | Pág. |
|--|------|
| Marco Teórico | |
| Figura 1. Esquema general de la glándula mamaria y sistemas involucrados en la producción de leche..... | 9 |
| Figura 2. Diagrama de un corte transversal de una célula en el epitelio mamario, de una glándula en lactación..... | 11 |
| Figura 3. Esquema de la actuación de células inmunocompetentes ante la llegada de un antígeno..... | 38 |
| Figura 4. Diagrama de elaboración de yogur..... | 46 |
| Figura 5. Unión química..... | 54 |
| Figura 6. Retención física..... | 56 |
| Materiales y Métodos | |
| Figura 1. <i>Lactococcus lactis</i> 1µm 20000X..... | 59 |
| Figura 2. Leches empleadas..... | 62 |
| Figura 3. Ejemplo de cuantificación de crecimiento bacteriano a las 24 horas..... | 64 |
| Figura 4. Inmovilización de <i>Lactococcus lactis ssp. lactis</i> en celulosa..... | 65 |
| Figura 5. Proceso de aplicación del dispositivo en leche de establo pasteurizada..... | 67 |
| Figura 6. Cuestionario empleado para la prueba de preferencia..... | 69 |
| Figura 7. Cuestionario empleado para la prueba triangular..... | 71 |

Resultados y Discusión

| | | |
|-----------|--|----|
| Figura 1. | Tinción Gram <i>Lactococcus lactis ssp. lactis</i> | 73 |
| Figura 2. | Curva de crecimiento <i>Lactococcus lactis ssp. lactis</i> en medio industrial a 29 °C.... | 74 |
| Figura 3. | pH de <i>Lactococcus lactis ssp. lactis</i> en medio industrial a 29 °C..... | 74 |
| Figura 4. | Acidez de <i>Lactococcus lactis ssp. lactis</i> en medio industrial a 29 °C..... | 75 |
| Figura 5. | Evolución del pH en diferentes tipos de leche con dispositivo..... | 87 |
| Figura 6. | Evolución de la acidez en diferentes tipos de leche con dispositivo..... | 88 |
| Figura 7. | Evolución de la viscosidad en diferentes tipos de leche con dispositivo..... | 89 |
| Figura 8. | Preferencia entre bebidas tipo yogur..... | 92 |
| Figura 9. | Grado de aceptación..... | 93 |
| Figura10. | Preferencia entre bebidas..... | 97 |

INTRODUCCIÓN

*En el fondo, los científicos somos gente con suerte:
podemos jugar a lo que queramos durante toda la vida.*

*Lee Smolin
(1955-)*

1. INTRODUCCIÓN

Actualmente son muy conocidos los beneficios para la salud que se les atribuye a las bacterias ácido lácticas (BAL), tales como la disminución de intolerancia a la lactosa, inhibición de patógenos intestinales, propiedad protectora de la mucosa gástrica, actividad antagonica contra rotavirus, prevención de reacciones alérgicas, disminución del riesgo de enterocolitis necrotizante neonatal y por las propiedades inmunomoduladoras que presentan, entre otros. Todos los beneficios mencionados son atribuibles a las bacterias lácticas vivas, metabólicamente activas y capaces de reproducirse.

Los productos que contienen bacterias lácticas se venden en muchos países en diversas presentaciones, sin embargo la supervivencia y concentración en que llegan al organismo del consumidor es dudosa, ya que las bacterias lácticas como producto biológico vivo sufren desde su producción hasta su consumo una serie de manipulaciones durante su industrialización, que modifican las condiciones óptimas para su conservación de no ser suficientemente bien cuidados los productos, por lo tanto la importancia no reside en sí los tiene o no, sino en qué cantidad y con qué actividad metabólica (capacidad de producción de ácido láctico).

Han sido establecidas una serie de cantidades mínimas en los productos que contienen dichas bacterias para asegurar su efectividad en el organismo que los ingiere, de tal forma que los productos fermentados deben contener al menos 10^6 UFC/mL. De acuerdo a lo reportado por Montero et al. (2006) la concentración sugerida de BAL está en el rango 10^6 - 10^7 UFC/g o mL.

En estudios previos se ha encontrado que es posible conservar a las bacterias lácticas desecadas y fijadas en un soporte de celulosa, por lo que partiendo de ello se pretende desarrollar un dispositivo práctico y comercialmente viable de bacterias lácticas inmovilizadas junto con otros nutrientes que puestas en contacto con leche entera sean capaces de fermentarla, obteniéndose una bebida tipo yogur, garantizando de esta manera la supervivencia y cantidad de las BAL para

que presenten los beneficios que se les atribuyen, dicha fermentación brindará además los perfiles de sabor característicos a los del yogur para que sea agradable al gusto del consumidor.

Si dicho dispositivo se aplica a las marcas de leche entera: En polvo (Nido y Alpura), Pasteurizadas (Lala, Alpura y Liconsa) y Ultrapasteurizadas (Lala, Alpura y Liconsa) a temperatura ambiente (aproximadamente 23°C) serán capaces de fermentarlas produciendo una bebida tipo yogur, garantizando que dichas bacterias llegaran vivas y en concentraciones suficientes al organismo del consumidor, para que éste goce de los beneficios que aportan, esto se verá reflejado si dichas leches presentan descenso de pH hasta 4.5 e incremento en la acidez (% de ácido láctico) y viscosidad.

2 OBJETIVOS

*Que nuestro alimento sea nuestra medicina;
que nuestra medicina sea nuestro alimento.*

*Hipócrates
(500 a. C.)*

2. OBJETIVOS

OBJETIVO

- ☆ Desarrollar un dispositivo con *Lactococcus lactis ssp. lactis* inmovilizadas en un soporte sólido de celulosa que sea práctico y fácil de utilizar, con la cantidad necesaria de *Lactococcus lactis ssp. lactis* para ser aplicado en leche y obtener una bebida tipo yogur que provea al consumidor con los beneficios que se le atribuyen a las BAL.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ☆ Inmovilización de *Lactococcus lactis ssp. lactis* en un soporte sólido.
- ☆ Determinación de tiempo de secado y viabilidad de las bacterias secadas.
- ☆ Evaluar el efecto del dispositivo en diferentes tipos de leche entera.
- ☆ Realizar prueba de preferencia de la bebida tipo yogur.
- ☆ Determinar la vida de anaquel del dispositivo almacenado a 4°C.

3 MARCO TEÓRICO

La mejor forma de predecir el futuro es implementarlo
David Heinemeier Hansson.
(1979-)

3. MARCO TEÓRICO

3.1 Antecedentes Históricos.

En condiciones naturales los mamíferos producen únicamente leche suficiente para sus crías. Sin embargo, mucho antes de que el hombre hiciera historia, encontró que la leche era buena para él, lo que resultó en la domesticación de animales productores de leche y comenzó a utilizarlos y seleccionarlos para aumentar la producción para su consumo (Pérez-Gavilán, 1984)

Parece probable que el ganado vacuno fue domesticado por primera vez en Europa y Asia durante la nueva Edad de Piedra. Esto trajo como consecuencia una más abundante fuente de alimentación, lo que hizo al hombre interesarse en una mayor producción de leche y carne. Existen reportes sobre la ordeña de la vaca desde los años 9000 a.C.

La producción de leche por la domesticación del ganado productor también trajo como consecuencia la elaboración de derivados de la misma. (Pérez-Gavilán, 1984).

El científico ruso Ellia Metchnikoff propuso una teoría ligada a la observación de la ingestión regular de yogur en los Balcanes: la teoría de la longevidad. Este científico fue el primero que estableció, desde el Instituto Pasteur, una clara división entre la microbiología “negativa”, relacionada con los microorganismos patógenos, y la “positiva” ligada a las leches fermentadas y al yogur. Actualmente existen numerosos tipos de leches fermentadas junto al yogur, siendo éstas una alternativa láctea interesante para los consumidores. (Aranceta et al., 2002)

3.2 Leche.

En México la definición de leche es, de acuerdo a la NOM-155-SCF1-2012, “el producto obtenido de la secreción de las glándulas mamarias de las vacas, sin calostro el cual debe ser sometido a tratamientos térmicos u otros procesos que garanticen la inocuidad del producto; además puede someterse a otras operaciones tales como clarificación, homogeneización, estandarización u otras, siempre y cuando no contaminen al producto y cumpla con las especificaciones de su denominación”

3.3 Producción de leche en la glándula mamaria.

La leche se forma en las células del epitelio que recubre los alvéolos de la mama, que los contiene en gran número; su forma de agruparse y el dispositivo colector varían de unas especies a otras. La embriología demuestra que la mama no es otra cosa que un grupo de células sudoríparas modificadas. (Alais, 2003)

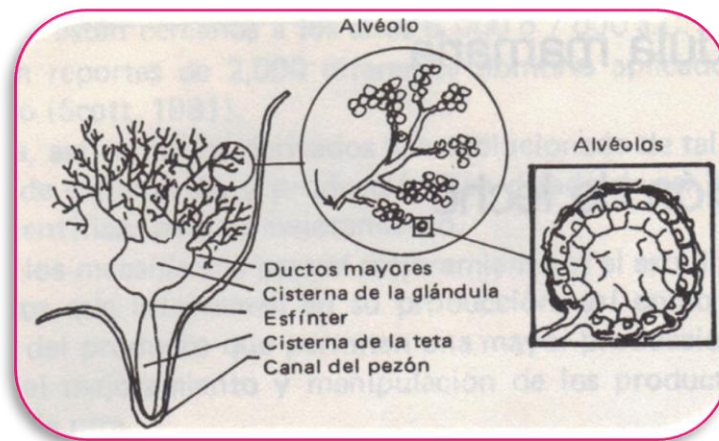
La glándula mamaria y las células que la constituyen representan un órgano bajo un complejo control endocrinológico que va desde los estados tempranos de desarrollo, a la preñez y lactación en un ciclo regresivo.

La leche se mantiene en la ubre. Las bacterias se mantienen en el exterior de la ubre, principalmente por la constricción del canal del pezón. Dentro de la teta el canal del pezón es un ducto que se comunica con una cavidad cuya capacidad es de 30 a 45 mL llamada cisterna de la teta, que se separa del canal del pezón por una serie de tejido plegado, generalmente en número de 4 a 8, que se radia en varias direcciones, recibiendo el nombre de rosetas de Furstenberg, y sirven como un medio adicional para prevenir la salida de la leche.

La cisterna de la teta se separa de la cisterna de la glándula por un nuevo doblez de tejido. La cisterna de la glándula es capaz de contener más de 400 mL de leche y actúa como un área colectora de los ductos mamarios. (Pérez-Gavilán, 1984)

Ramificaciones de la cisterna de la glándula forman un sistema extensamente ramificado con ductos mamarios de 8 a 50 en número. El alvéolo (la unidad funcional) descarga su secreción en estos ductos. (Figura 1.)

La unidad básica productora de leche en la ubre es pequeña y semejante a un bulbo con un centro hueco y recibe el nombre de alvéolo. Se estima que cada pulgada de cuadrada de tejido de la ubre contiene un millón de estos alvéolos. Cuando un alvéolo se llena con leche tiene un diámetro aproximado de 0.1 a 0.3 mm.



Fuente: Pérez-Gavilán, 1984.

Figura 1. Esquema general de la glándula mamaria y sistemas involucrados en la producción de leche

Los alvéolos están formados por una sola capa de células epiteliales, que son responsables de secretar la leche. La función es triple: 1) Remover nutrimentos de la sangre, 2) transformar estos nutrimentos en leche y 3) descargar la leche en el lumen. Cada alvéolo está rodeado por una red de capilares de los cuales se extraen los nutrimentos. También se encuentran rodeados por un tipo especializado de células musculares llamadas células mioepiteliales, que son sensibles a los efectos de la oxitocina. Cuando la oxitocina es secretada en la sangre estimula la concentración de estas células musculares (mioepiteliales), iniciándose entonces la eyección de la leche.

La acción de la oxitocina está mediada por la presencia de receptores específicos, donde la presencia de Mg^{2+} incrementa la afinidad de la oxitocina por los receptores; esto debido probablemente a que se aumenta la velocidad de asociación y disminuye la velocidad de disociación. (Pérez-Gavilán, 1984)

La secreción de la leche está regulada primordialmente por mecanismos hormonales. Sin embargo, la excreción de la leche se inicia a través de mecanismos nerviosos.

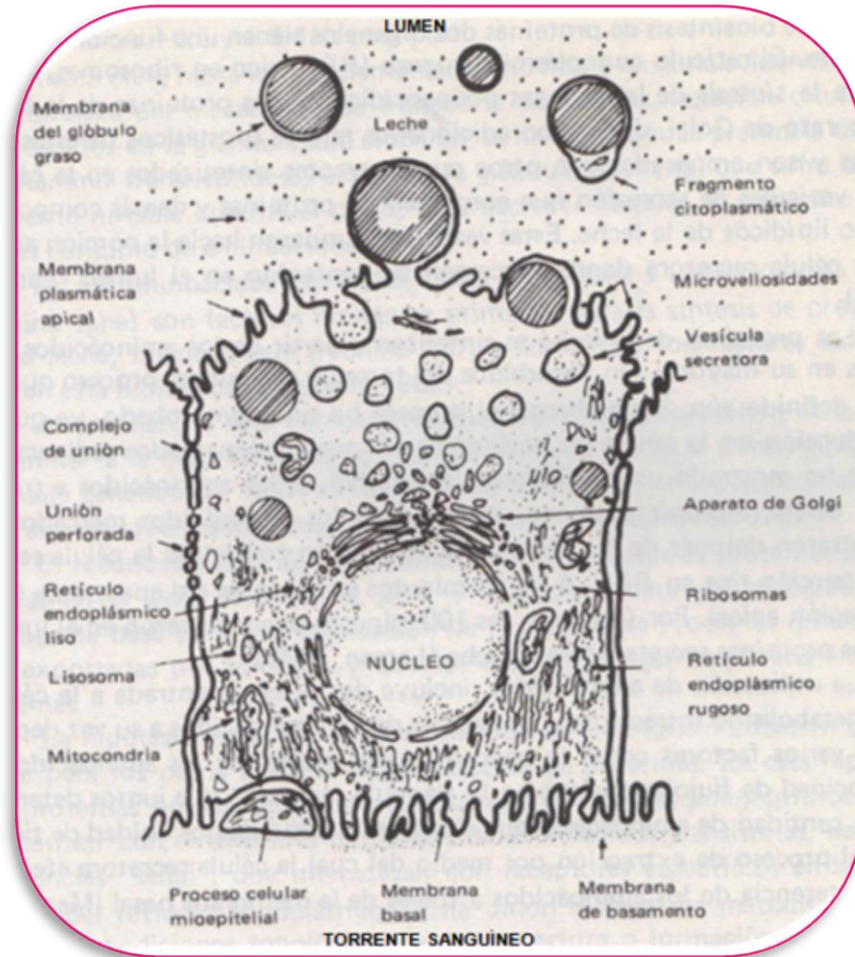
La eficiencia de la secreción de leche es clara si se considera que una vaca que produce aproximadamente 6,583 kg de leche durante un año, de los cuales se manufacturan 237.5 kg de grasa, 306 kg de azúcar, 214.5 kg de alimento; equivale al peso en canal de 2.5 reses de 18 meses y más aún, la vaca permanece viva y puede repetir esta productividad varias veces. Para lograr esta alta productividad, el alvéolo es en realidad una fábrica de leche. Tiene la capacidad de tomar los nutrientes de la sangre y transformarlos en uno de los alimentos naturales más perfectos. Galactopoyesis es el término que describe la biosíntesis de la leche.

Para entender el proceso de secreción de la leche es necesario familiarizarse con la anatomía de la célula secretora. (Figura. 2)

Pese a que las células de los vasos sanguíneos y la membrana basal de las células secretoras se encuentran entre la sangre y la leche, algunos componentes de la sangre se encuentran en los espacios intersticiales debajo y entre las células secretoras epiteliales, hasta el complejo de unión presente entre las células.

Los precursores entran en la célula a través de la membrana basal y la leche es liberada hacia el lumen a través de la membrana plasmática apical.

Deben de existir intercambios importantes de material de bajo peso molecular entre las células secretoras adyacentes a través de uniones perforadas presentes en la célula secretora. Esto puede contribuir a explicar las observaciones de que todas las células secretoras de un alvéolo en particular están sincronizadas en su liberación de leche hacia el lumen. (Pérez-Gavilán, 1984)



Fuente: Pérez-Gavilán, 1984.
Figura 2. Diagrama de un corte transversal de una célula en el epitelio mamario, de una glándula en lactación.

3.4 Composición química de la leche.

La leche de bovino está constituida principalmente de hidratos de carbono (lactosa), proteínas (caseínas, lactoalbúmina, lactoglobulina, etc.), así como por un número importante de enzimas, lípidos y sales minerales. La composición general se indica en el cuadro 1

Cuadro 1. Composición general de la leche de vaca

| Macro componentes | | Porcentaje aprox. |
|------------------------|--|-------------------|
| Agua | | 87.0 |
| Grasa | | 3.75 |
| Proteínas | | 3.38 |
| Lactosa | | 5.0 |
| Sales | | 0.9 |
| Constituyentes menores | | |
| Vitaminas | Solubles en grasa (A, D, E, K) Solubles en agua (C, gpo. B) | |
| Enzimas | Lipasas, proteasa, reductasas, fosfatasa, lactoperoxidasa, catalasa, oxidasa, etc. | |
| Pigmentos | Carotenos, riboflavina, xantofila. | |

Fuente: Pérez-Gavilán, 1984

3.4.1 Agua: El contenido de agua de la leche de las diferentes especies de mamíferos puede variar del 36 al 90.5%; sin embargo normalmente representa el 87% del contenido total de la leche. (Pérez-Gavilán, 1984)

3.4.2 Grasa: Los lípidos figuran entre los constituyentes más importantes de la leche y sus derivados, ya que confieren características únicas de sabor, contenido nutrimental y propiedades físicas. La grasa de la leche es una buena fuente de energía y un excelente medio de transporte de las vitaminas liposolubles A, D, E, y K. El caroteno, precursor de la vitamina A, da a la leche el color “crema”.

La fracción grasa de la leche se presenta en forma de glóbulos microscópicos de unas 4.4 μ de diámetro en forma de emulsión. Tanto el contenido total de lípidos como el de ácidos grasos puede variar considerablemente como respuesta a cambios en la dieta, raza del animal y el estado de lactancia entre un 3 y un 6%, aunque típicamente el contenido de grasa puede estar entre 3.5% y 4.7% (NOM-155-SCF1-2012). El factor que más influye en el contenido de lípidos en la leche es, en definitiva, la especie animal (cuadro 2).

Cuadro 2. Composición química de la Leche de diferentes razas de vacas (%)

| Raza | Agua | Grasa | Proteínas | Lactosa | Cenizas |
|------------|------|-------|-----------|---------|---------|
| Holstein | 88.1 | 3.4 | 3.1 | 4.6 | 0.71 |
| Ayshire | 87.3 | 3.9 | 3.4 | 4.4 | 0.73 |
| Suiza café | 87.3 | 3.9 | 3.3 | 4.6 | 0.72 |
| Guernsey | 86.3 | 4.5 | 3.6 | 4.7 | 0.75 |
| Jersey | 85.6 | 5.1 | 3.7 | 4.7 | 0.74 |

Fuente: Badui, 2006

La composición grasa de la leche está conformada en su mayoría por triglicéridos (aproximadamente 98%). Los otros lípidos que se encuentran en menor concentración desempeñan funciones importantes; los lípidos que destacan son los diacilglicéridos (2.1%), monoacilglicéridos (0.08%), fosfolípidos (1.10%), ácidos grasos libres (0.20%), esteroides y sus ésteres de colesterol (menos del 0.5%) (Badui, 2006).

En la leche de vaca, los ácidos grasos saturados constituyen el 70% del peso total de la grasa, siendo el ácido palmítico (16:0) el más común ya que representa el 30% de la grasa láctea por peso, seguido por el ácido mirístico (14:0) y esteárico (18:0), que constituyen el 11 a 12% del peso. El 10.9% de los ácidos grasos saturados son de cadena corta (C4:0-C10:0). El contenido de ácido butírico (4:0) y capríco (6:0) en promedio es del 4.4%, y apenas representan el 2.4% del total de ácidos grasos (García, et al., 2004).

El ácido butírico es un ácido graso saturado de cuatro átomos de carbono, único en los lácteos. (Aranceta, et al., 2005)

Biosíntesis de lípidos de la leche.

La grasa se sintetiza en el citosol de la célula secretora. De la grasa, sólo 25% de los ácidos grasos que la componen son originados de la dieta, los demás son sintetizados en la célula secretora. Dos mecanismos intervienen en la síntesis de ácidos grasos, así como en su elongación. El primer mecanismo considera al ácido acético, donde se condensan unidades de 2 carbonos hasta alcanzar el tamaño de la cadena de los diferentes ácidos grasos. El segundo mecanismo considera al ácido β -hidroxibutírico como el elemento a partir del cual la síntesis

de ácidos grasos comienza. Sin embargo, de los dos mecanismos propuestos, el primero parece ser el más extensamente utilizado en la vaca.

Los ácidos grasos de cadena larga son absorbidos de la sangre e incorporados en la leche. Ocasionalmente la β -oxidación de los ácidos grasos de cadena larga (C_{16} - C_{18}) puede dar origen a ácidos grasos de 14 y 16 carbonos, respectivamente.

El mecanismo exacto de elongación o crecimiento de la cadena en la glándula mamaria, así como la naturaleza de los pasos reductivos intermedios no se han establecido todavía. Un esquema propuesto con base en la evidencia es el siguiente:

1) Tanto la malonil CoA como la acetil CoA (cuando la síntesis comienza con ácido acético), se unen a la enzima de síntesis de los ácidos grasos en una reacción de intercambio en la que la CoA es liberada y se forman tioésteres con los grupos sulfhidrilo de la enzima.

2) Los grupos acilo, unidos a la enzima, sufren descarboxilación y ésta debe ser seguida tanto por la reducción, deshidratación y una nueva reducción para formar un compuesto C_4 saturado unido a la enzima, o por condensación repetida de múltiples grupos malonil en la unidad acetil para formar un compuesto ceto unido a la enzima. Los grupos carbonilos del compuesto cetoácido son entonces reducidos, deshidratados y reducidos nuevamente al derivado acil saturado que se disocia en el ácido graso libre.

Mientras que las enzimas de la glándula mamaria están caracterizadas en forma incompleta, existe alguna evidencia de que la ruta del malonil CoA es una ruta importante en la síntesis de ácidos grasos en la glándula.

Por su parte, los ácidos grasos insaturados parecen formarse a partir de la deshidrogenación de los ácidos grasos saturados correspondientes. (Pérez-Gavilán, 1984)

El glóbulo graso: Casi todos los lípidos de la leche se encuentran en la forma de pequeños glóbulos con un rango de tamaño aproximado que va desde 0.1 hasta 20 μ de diámetro. La estabilidad de estos glóbulos de grasa depende principalmente de la película interfacial en la superficie del glóbulo, que separa los lípidos del ambiente acuoso del suero de la leche. A esta película se le conoce como la membrana del glóbulo graso (MGG); está compuesta de lípidos polares y neutros, enzimas, glicoproteínas y trazas de diferentes elementos.

La composición de aminoácidos de las proteínas de la MGG total tiene altos niveles de ácido glutámico, ácido aspártico, leucina; muy altos niveles de serina y treonina y niveles bajos de tirosina, histidina y aminoácidos sulfurados. En general, la composición química gruesa de la MGG es bastante constante y las pequeñas variaciones que presenta no parecen deberse al estado de lactación, lo que no acontece con las enzimas presentes.

Se han identificado muchas enzimas en la MMG, como: acetilcolinesterasa, fosfatasa alcalina, catalasa, citocromo C oxidasa, β -galactosidasa, Glucosa 6-fosfatasa, deshidrogenasa del ácido láctico, lipasa, NADH deshidrogenasa, entre otras.

La cantidad de enzimas presentes se ve influida quizá por numerosos factores que influyen al método de separación, estado de lactación, especie y enfermedades de la ubre. Muchas de las enzimas se originan del retículo endoplásmico (RE) o del plasmalema (membrana citoplasmática apical) de las células secretoras de la glándula mamaria.

Altos niveles de cobre, molibdeno, zinc y hierro, así como bajos niveles de calcio y magnesio se encuentran asociados a la MGG.

Inmediatamente después de la secreción del glóbulo graso, éste es rodeado por una unidad de membrana, una película interfacial interna y entre éstas una capa de origen citoplasmático que separa a ambos componentes.

Los fosfolípidos y proteínas contribuyen a la carga neta de la superficie de la membrana, lo que a su vez influye en la unión de componentes no membranosos de la superficie.

La composición de la MGG se puede modificar por 2 tipos de variables; las variables endógenas o factores directamente relacionados con la vaca y los factores exógenos, como: efectos de procesado (calentamiento, batido, homogeneización, concentración), efectos de producción (bacterias de la leche, agitación y enfriamiento).

Los ácidos grasos presentes en la leche pueden tener teóricamente hasta 200,000 diferentes arreglos, lo que ejemplifica la complejidad del sistema graso de la leche. El complejo de grasa se funde en un rango de temperatura que va de los 28 a los 33°C y solidifica entre los 24 y 19°C.

La composición porcentual de los diferentes ácidos grasos presentes en la grasa de la leche determinan en forma importante las características de fundido de la grasa, sumamente importante tanto en su secreción como en su utilización y comercialización. (Pérez-Gavilán, 1984)

3.4.3 Proteínas: La función primaria de las proteínas lácteas es el aporte suficiente de aminoácidos indispensables y de nitrógeno orgánico para la síntesis y reparación de tejidos y otras proteínas de importancia biológica (Aranceta et al., 2005). La leche de vaca es considerada una excelente fuente de proteínas de alto valor biológico, ya que contiene los diez aminoácidos indispensables.

La fracción de proteínas de la leche corresponde regularmente al 3-4% y se distinguen dos categorías principales que se definen por su composición química y propiedades físicas: la caseína, que constituye el 80% de las proteínas de la leche, contiene fósforo y coagula o se precipita a un pH de 4.6; y las seroproteínas (proteínas del suero de la leche), que representan el 20% restante, no contienen fósforo sino sulfuro y permanecen en solución en la leche a un pH de 4.6 (Badui, 2006).

★ *Caseínas:* están constituidas por las fracciones α , β , κ y γ caseínas, que se distinguen entre sí por su composición de aminoácidos y propiedades funcionales. Las caseínas se encuentran suspendidas en la leche a través de micelas, formadas por complejos macromoleculares de fosfoproteínas y

glucoproteínas en suspensión coloidal. El papel nutrimental de la caseína es el suministro de aminoácidos, calcio y fósforo inorgánico (Aranceta et al., 2005).

- ★ *Proteínas del suero de leche:* también conocidas como seroproteínas, se consideran proteínas solubles y se clasifican principalmente en albúminas y globulinas, entre las que se incluyen α -lactoalbúminas, β -lactoglobulinas, inmunoglobulinas, proteasas-peptonas y otros compuestos nitrogenados minoritarios no específicos como lactoferrina y lisozima. Las seroproteínas son consideradas proteínas de alto valor biológico que cuentan con un amplio perfil de aminoácidos que incluye aminoácidos azufrados como la cisteína y la metionina, aminoácidos de cadena ramificada y lisina y triptófano, con lo que se compensan las deficiencias de la caseína (Maza et al., 2011).

Biosíntesis de proteínas de la leche.

En la biosíntesis de proteínas dos organelos tienen una función muy importante. El retículo endoplásmico rugoso (RER) rico en ribosomas, donde ocurre la síntesis de las cadenas polipeptídicas de las proteínas de la leche.

El aparato de Golgi donde son adicionados grupos prostéticos de estas proteínas y son empacadas con otros constituyentes sintetizados en la célula; y las vesículas de secreción que contienen las proteínas y demás componentes no lipídicos de la leche. Estas vesículas se mueven hacia la porción apical de la célula secretora donde descargan su contenido en el lumen.

Las proteínas de la leche se sintetizan a partir de los aminoácidos, los cuales en su mayoría son absorbidos del torrente sanguíneo, proceso que no se ha definido aún. Sin embargo el proceso ha sido comprobado con la introducción en la sangre de bovinos de aminoácidos marcados radioactivamente. (Pérez-Gavilán, 1984)

3.4.4 Lactosa: es el principal hidrato de carbono de la leche, y la contiene en un 4.5% aproximadamente. Es un 85% menos dulce que la sacarosa o azúcar común y contribuye, junto con las sales, en el sabor global de la leche, siendo las cantidades de lactosa y sales inversamente proporcionales. La lactosa es fácilmente transformada en ácido láctico por la acción de bacterias.

Para el ser humano, la lactosa constituye la única fuente de galactosa, un importante constituyente de los tejidos nerviosos. (Maza et al., 2011)

Biosíntesis de lactosa de la leche.

La lactosa se sintetiza únicamente de glucosa. Las células secretoras absorben la glucosa y convierten parte de esta en galactosa y con ello proveen las unidades necesarias para la producción de la lactosa.

En los rumiantes, la mayoría de los carbohidratos en la dieta se rompen y se forman ácidos grasos volátiles. Los principales ácidos grasos volátiles son el ácido acético, ácido propiónico y el ácido butírico. El ácido propiónico es convertido en glucosa que se usa posteriormente en la síntesis de la lactosa. (Pérez-Gavilán, 1984)

3.4.5 Minerales: Otro componente no proteico que tiene importancia capital en los fenómenos de estabilización y coagulación es el calcio, y otras sales. En la leche de vaca, casi 2/3 partes del total de calcio es coloidal, en su mayoría formando complejos de calcio y fosfato con las caseínas. (Pérez-Gavilán, 1984)

La leche aporta elementos minerales indispensables para el organismo humano y es la fuente más importante de calcio biodisponible de la dieta. Su buena absorción se da gracias a la presencia de lactosa y de vitamina D y a su unión con los fosfopéptidos derivados de la hidrólisis de la caseína, además de que la adecuada relación calcio: fósforo favorece su absorción en el intestino humano (Bourges, 1995). Por ello se considera que la leche de vaca es la mejor fuente de calcio tanto para el crecimiento de los huesos en jóvenes como para el mantenimiento de la integridad ósea en los adultos (Aranceta et al., 2005).

La leche de vaca contiene alrededor de 7 gramos de minerales por litro en promedio. La distribución y concentración de estos elementos en la mezcla de fases que la constituyen varía de acuerdo al mineral de que se trate (Maza et al., 2011)

En la *fase acuosa* continua se encuentran disueltas, conjuntamente con lactosa y compuestos nitrogenados solubles, sales minerales u orgánicas como citratos, fosfatos y cloruros de calcio, potasio, magnesio, sodio y trazas de hierro.

En la *fase coloidal* están en suspensión micelas de caseína insoluble que contienen aproximadamente un 20% del calcio y fósforo unidos a su estructura y sales compuestas de fosfato de calcio coloidal, citratos y magnesio en proporciones fijas, que contribuyen a estabilizar las micelas. Los glóbulos de grasa emulsionados contienen un 1% de fosfolípidos y en sus membranas se fijan hierro, cobre, zinc y manganeso.

Más de la mitad del hierro y alrededor del 80% del zinc y cobre se fijan a micelas de caseína y entre el 15 y 30% del hierro, zinc y cobre se unen a las proteínas solubles.

La alimentación del animal y los cambios estacionales no influyen de manera significativa en la concentración de minerales en la leche, por lo tanto el contenido mineral casi no varía a lo largo del año.

El contenido de calcio, fósforo y magnesio no depende de la ingestión porque el animal puede recurrir a sus reservas óseas; tampoco se modifican las concentraciones de sodio, potasio y cloro aún cuando aumente la ingestión. (Maza et al., 2011)

3.4.6 Vitaminas: Las vitaminas son componentes menores de la leche, cuya importancia radica fundamentalmente en la calidad nutrimental de la misma.

Las vitaminas presentes en la leche son: la A, D, E, K, B1, B2, B6, B12, C, niacina, ácido pantoténico, biotina, folacina, colina. (Pérez-Gavilán, 1984)

★ *Vitaminas liposolubles:* tanto la leche como los productos lácteos son considerados una importante fuente alimentaria de vitamina A; dicha vitamina interviene en funciones relacionadas con la visión, expresión génica, desarrollo embrionario, crecimiento, reproducción e inmunocompetencia. Tanto la vitamina A como sus precursores llamados carotenoides, principalmente β -caroteno, están presentes en distintas cantidades en la fracción grasa de la leche.

La vitamina D interviene en la absorción del calcio y fósforo en el intestino y resulta indispensable para el buen mantenimiento del esqueleto a lo largo de la vida. Se encuentra en muy bajas concentraciones en el caso de leche y derivados a los que no se les ha adicionado esta vitamina.

La vitamina E también llamada *tocoferol* es considerada un antioxidante que protege a las membranas de las células del daño por radicales libres. Además, participa en la respuesta inmunitaria, incluso algunos estudios la consideran como un factor de protección de algunos tipos de cáncer y enfermedades cardiovasculares. Esta vitamina está presente en la leche en bajas concentraciones al igual que la vitamina K.

★ *Vitaminas hidrosolubles:* tanto la leche como sus derivados contienen la gran mayoría de las vitaminas solubles en distintas cantidades, aunque destacan el contenido de vitamina B2 (riboflavina) y niacina; la leche aporta en menor cantidad vitamina B1 (tiamina), vitamina B6 (piridoxina) y ácido fólico. (Maza et al., 2011)

3.5 Leche y productos lácteos.

Leche entera: Es el producto extraído por medio del ordeño que puede ser pasteurizado o ultrapasteurizado y puede o no someterse a estandarización, agregando o extrayendo grasa, ya que en general la leche contiene entre un 2.2% y un 3.8% de grasa en materia seca (por peso) (Pérez, 2011).

Leche descremada y leche parcialmente descremada: Son productos fabricados a partir de la reducción del contenido de grasa de la leche entera, ya sea de forma total o parcial a través de un proceso físico de separación que depende de la diferencia de densidades entre los glóbulos de grasa y la fase acuosa en la que están dispersos. Dicha separación puede hacerse por sedimentación, con centrifugas o bombas centrípetas (Walstra, 2001). Posteriormente, los productos con reducido contenido de grasa se someten a un proceso de estandarización y restauración o adición de nutrimentos con el fin de recuperar las vitaminas liposolubles y minerales perdidos, y ajustar el contenido de grasa a menos del 0.5% o entre 0.6% y 2.8% según sea leche descremada o parcialmente descremada y así adecuarse a la normatividad.

En México la leche que contiene entre 16 y 18 g/L de grasa butírica puede ser denominada “leche semidescremada” (NOM-155-SCF1-2012). De este proceso, se obtiene por un lado la crema y por el otro, la leche con una consistencia y apariencia más ligera, aún cuando el resto de los nutrimentos permanece prácticamente en la misma proporción.

Cabe mencionar que el aporte de calcio y su absorción son muy similares en las leches reducidas en grasa y en la leche entera (Pérez, 2011).

Las especificaciones para los diferentes tipos de leche según la norma oficial mexicana NOM-155-SCF1-2012 se muestran en el cuadro 3.

Cuadro 3. Especificaciones de leche pasteurizada y ultrapasteurizada

| Tipo de Leche | Densidad a 15°C (g/mL) | Grasa Butírica (g/L) | Acidez (ácido láctico) (g/L) | Sólidos no grasos (g/L) | Lactosa (g/L) | Proteínas (g/L) | Caseína (g/L) |
|-------------------------|------------------------|----------------------|------------------------------|-------------------------|------------------|-----------------|---------------|
| Entera | Min. 1.029 | Min. 30 | Min. 1.3 Max. 1.7 | Min. 83 | Min.43 Max.52 | Min. 30 | Min. 24 |
| Parcialmente descremada | Min. 1.029 | Max. 28 Min. 6 | Min. 1.3 Max. 1.7 | Min. 83 | Min.43 Max.52 | Min. 30 | Min. 24 |
| Descremada | Min. 1.031 | Max. 5 | Min. 1.3 Max. 1.7 | Min. 83 | Min.43 Max.52 | Min. 30 | Min. 24 |

Fuente: NOM-155-SCF1-2012

Leche en polvo: Es la leche que ha sido sometida a un proceso de secado por aspersion (deshidratación generalmente mediante atomización y evaporación). Puede estar estandarizada (en su contenido de grasa) o no, y si su contenido de grasa está entre el 12 y 14% puede denominarse “leche semidescremada”. Este producto llega también a producirse a partir de leche con grasa vegetal.

Se presenta como un polvo color crema y para su consumo debe rehidratarse con agua. (Pérez, 2011)

En el cuadro 4 se presenta la composición aproximada de leche entera en polvo.

Cuadro 4. Composición aproximada (%p/p) de leche entera en polvo.

| Componente | Leche entera |
|---------------------|--------------|
| Grasa | 26 |
| Lactosa | 38 |
| Caseína | 19.5 |
| Proteínas del suero | 4.8 |
| Cenizas | 6.3 |
| Agua | 2.5 |

Fuente: Walstra, 2001

3.6 Proceso de industrialización de la leche.

3.6.1 Proceso de industrialización de leche fluida.

La producción de los diferentes tipos de leche fluida combina una serie de operaciones como la clarificación y separación (para la producción de leches con menor contenido de grasa), estandarización, pasteurización o ultrapasteurización, y homogeneización. El objetivo de someter la leche cruda a estos procesos es obtener un producto de calidad sanitaria y organoléptica adecuada para las necesidades del mercado. No obstante, la producción de leche de calidad inicia desde el establo, en donde las buenas prácticas de crianza, ordeña, enfriamiento y almacenamiento de la leche inciden directamente con las características de calidad del producto final.

La manipulación, almacenamiento y transporte de la leche deben llevarse a cabo de forma que se evite su contaminación y se reduzca al mínimo la posibilidad de aumentar su carga microbiana. Es importante contar con un sistema de controles para producir leche y productos lácteos inocuos e idóneos. (Pérez, 2011).

A continuación, se describen los principales pasos a los que es sometida la leche cruda al llegar a la planta procesadora:

Clarificación: es la remoción de las impurezas sólidas de la leche mediante centrifugación. Las partículas más densas que la fase continua de la leche se dirigen hacia el exterior o perímetro de la centrífuga. Entre estas partículas se encuentran células epiteliales, leucocitos, sedimento bacteriano y materia extraña. La cantidad de sólidos que se recoge es variable y debe retirarse de la centrífuga. Los procesos de separación y clarificación son continuos en las centrífugas más modernas que, además, cuentan con un sistema de autolimpieza.

Separación: es la separación de la grasa de la leche a partir de leche mediante el proceso de centrifugación. Bajo la influencia de la fuerza centrífuga, los glóbulos grasos (crema), que son menos densos que el resto de la leche (leche descremada), se dirigen hacia el centro de la centrífuga o eje de rotación a través

de los canales de separación de la centrífuga. La leche descremada, en cambio, se mueve hacia la parte más externa del juego de discos.

La clarificación y la separación pueden llevarse a cabo simultáneamente en la misma centrífuga.

La centrifugación es una operación usada muy a menudo en la industria lechera. Además de la clarificación y de la separación de la grasa, la centrifugación tiene otros usos tales como la bactofugación (separación de bacterias de la leche), la separación del suero a partir de la cuajada y la separación del aceite de mantequilla y del suero de mantequilla a partir de la grasa de leche, formando grasa butírica anhidra. (Pérez, 2011).

Estandarización: normalmente, el contenido de grasa de la leche varía entre especies animales o entre una vaca y otra y que puede deberse a la raza, a la dieta y al estado de lactancia de la vaca, entre otros factores. Con el fin de proveer al consumidor de un producto uniforme, la leche debe ser estandarizada, lo cual también es esencial para la elaboración de productos lácteos. Después de la separación, la grasa se adiciona nuevamente a la leche descremada para obtener un producto con el contenido de grasa deseado. Así puede obtenerse leche entera (30 g/L), parcialmente descremada (28 g/L), semidescremada (16 g/L) o leche descremada (0.5 g/L) (NOM-155-SCF1-2012).

Tratamientos térmicos de la leche: El principal objetivo de los tratamientos térmicos que se aplican a la leche es la destrucción de los microorganismos patógenos y/o de los microorganismos que pueden comprometer la conservación del producto. En función de la cantidad de tratamiento térmico y de la contaminación inicial de producto se destruirán todos los microorganismos o solamente una parte de ellos. (Del Castillo et al., 2004).

Los principales tratamientos aplicados a la leche son:

Termización: Es un tratamiento térmico de menor intensidad que la pasteurización baja, normalmente 20 segundos a 60-69°C. Su objetivo es destruir bacterias, en especial las psicrótrofas, ya que muchas especies producen lipasa y proteínas termoresistentes que pueden alterar los productos lácteos. Excepto la destrucción

de las formas vegetativas de muchos microorganismos, la termización no origina ningún cambio irreversible en la leche. (Walstra, 2001).

Pasteurización: Es necesario eliminar los microorganismos patógenos presentes para asegurar la inocuidad de la leche. Con este fin, la leche se somete al proceso de *pasteurización*. El término “pasteurización” se refiere al tratamiento térmico al que se somete la leche o cualquier alimento consistente en una relación de temperatura y tiempo que garantice la destrucción de organismos patógenos.

Básicamente, la pasteurización de la leche tiene dos objetivos: uno para conservar la salud, al obtenerse un producto inocuo para el consumo humano; y otro, para mejorar y mantener la calidad de la leche y de los productos lácteos, gracias a que, durante la pasteurización se destruyen algunas enzimas indeseables y muchos microorganismos que deterioran la leche. De este modo, se aumenta la vida de anaquel de la leche. (Pérez, 2011).

De acuerdo a su relación temperatura-tiempo, existen dos tipos de pasteurización: lenta y rápida, también llamadas “pasteurización por lotes” (*batch*) y “pasteurización continua”, respectivamente. La pasteurización rápida también se conoce como HTST (*high temperature short time*) por sus siglas en inglés, que significan “*alta temperatura tiempo corto*”:

- ★ La pasteurización *lenta o por lotes*, es un tratamiento térmico de intensidad suficiente para inactivar la fosfatasa alcalina de la leche. Las condiciones de calentamiento son 30 minutos a 63°C (NOM-091-SSA1-1994). Este tratamiento destruye los microorganismos patógenos que puede contener la leche, y específicamente *Mycobacterium tuberculosis*, que es un microorganismo relativamente termorresistente y hace algún tiempo, uno de los patógenos más peligrosos. Todos los mohos y levaduras y la mayoría de las formas vegetativas de las bacterias (aunque no todas), resultan destruidos. Sobreviven algunas especies de *Mycobacterium*, que pueden crecer lentamente en leche. Además se inactivan algunas enzimas (las menos termorresistentes). El sabor de la leche prácticamente no se modifica, las proteínas del suero casi no se desnaturalizan y la aglutinación por el frío y las propiedades bacteriostáticas

permanecen inalteradas. Sin embargo en la práctica suele aplicarse un tratamiento más severo, este calentamiento desnaturaliza las inmunoglobulinas (reduciendo la aglutinación por el frío y la actividad bacteriostática) algunas veces ocasiona un cambio perceptible en el sabor de la leche. (Pérez, 2011).

- ★ La pasteurización *rápida* o *continua* (HTST), es un tratamiento térmico en el que se inactiva la enzima lactoperoxidasa, para lo cual basta un calentamiento que puede ir de 72°C durante 15 segundos (NOM-091-SSA1-1994). No obstante, en muchas ocasiones se aplican temperaturas bastante altas, hasta de 100°C. Se destruyen todas las formas vegetativas de los microorganismos, pero no las esporas bacterianas. La mayor parte de las enzimas resultan inactivadas, pero la proteinasa de la leche (plasmina) y algunas proteasas y lipasas bacterianas resisten total o parcialmente el tratamiento, La mayor parte de las propiedades bacteriostáticas de la leche resultan destruidas. Se produce la desnaturalización de las proteínas del suero y se desarrolla un característico sabor a cocido. No hay cambios importantes en el valor nutrimental, excepto por la pérdida de la vitamina C. La estabilidad del producto frente la autooxidación de la materia grasa aumenta. Se producen muy pocas reacciones irreversibles. (Pérez, 2011).

Mientras que la pasteurización normal elimina eficazmente microorganismos potencialmente patógenos, no es suficiente para inactivar esporas termorresistentes en la leche. Esto se logra sometiendo a la leche a una temperatura superior a los 100°C y posteriormente colocándola en envases estériles al alto vacío. A este proceso se denomina ultrapasteurización (*UHT* o *ultra-high temperature*; “*ultra-alta temperatura*”).

De acuerdo a la Secretaría de Salud, la leche UHT debe calentarse a una temperatura de 135-149°C durante 2 a 8 segundos y envasarse de forma aséptica para garantizar su esterilidad comercial. (Walstra, 2001)

Esterilización: El objeto de este tratamiento térmico es la destrucción de todos los microorganismos incluyendo las esporas bacterianas. Con este fin los tratamientos que normalmente se aplican son 30 min a 110°C (esterilización en botella), 30 segundos a 130°C o 1 segundo a 145°C. Los dos últimos son tratamientos UHT. Además los efectos de todos estos tratamientos son diferentes. El calentamiento durante 30 minutos a 110°C, inactiva todas las enzimas de la leche, pero no todas las lipasas y proteasas bacterianas; origina extensas reacciones de Maillard, que dan lugar a pardeamientos, sabores característicos y pérdida de lisina disponible; reduce el contenido en algunas vitaminas; produce cambios considerables en las proteínas, incluyendo las caseínas; reduce el pH de la leche en 0,2 unidades. El calentamiento durante 1 segundo a 145°C no inactiva todas las enzimas; la plasmina casi no resulta afectada y algunas lipasas y proteinasas en absoluto, y por lo tanto, este tratamiento térmico no suele aplicarse en la práctica; casi no se producen reacciones químicas, la mayor parte de las proteínas del suero permanece inalteradas y sólo se desarrolla un ligero aroma a cocido. (Walstra, 2001)

Homogeneización: la grasa de la leche forma normalmente glóbulos, cuyo tamaño varía entre 0.20 y 2.0 μ ; la variabilidad en el tamaño de estos glóbulos hace que éstos floten hacia la superficie de la leche que se encuentra estática, formando entonces una capa de crema o nata.

El propósito de la homogeneización es reducir el tamaño de los glóbulos de grasa a menos de 1.0 μ , lo cual permite que permanezcan distribuidos de manera uniforme en la leche, evitando de esta manera que la grasa se separe y flote. Es por ello, que al hervir la leche entera que ha sido homogeneizada, “no hace nata” (Pérez, 2011).

El proceso se lleva a cabo sometiendo la leche a presiones elevadas que fuerzan el paso de la leche a través de pequeños orificios que rompen los glóbulos. Con esto se logra disminuir el diámetro de los glóbulos, aumentar el número de glóbulos e incrementar su superficie de contacto, de tal forma que no presenten coalescencia. El resultado neto es la reducción de la tendencia de los glóbulos a

flotar en la superficie de la leche, es decir, se obtiene un producto más homogéneo. (Ensminger, 1980).

Adición de vitaminas: se efectúa con el fin de restablecer las concentraciones normales de vitaminas A y D en las leches con menor contenido de grasa, o bien para que la leche aporte una mayor cantidad de éstas.

La leche entera normalmente contiene vitamina A y muy poca vitamina D que, por su naturaleza liposoluble, están contenidas en la grasa. Al descremar parcial o totalmente la leche, la fracción acuosa de la leche pierde gran parte de su contenido de estas vitaminas, mientras que la crema lo conserva.

Con el fin de mantener el contenido vitamínico normal de la leche, se adicionan vitaminas A y D en las leches parcial o totalmente descremadas. De esta manera, independientemente de las diferentes concentraciones de grasa de la leche disponible en el mercado, el aporte de vitaminas A y D siempre será el mismo que el de la leche entera.

Envasado: el tipo de leche fluida producida y la consecuente selección del tipo de envase y sistema de distribución constituye en muchos casos un complejo problema. El envase seleccionado debe satisfacer requerimientos sanitarios, económicos, de producción, eficiencia de distribución, necesidades del vendedor al menudeo, consideraciones del consumidor y aspectos ecológicos. (Pérez, 2011).

3.6.2 Proceso de industrialización de leche en polvo.

La leche entera en polvo secada por atomización normalmente se produce a partir de leche normalizada. Después de la normalización, la leche no necesita ser homogenizada dado que es continuamente agitada, sin inclusión de aire, antes de la evaporación y después de nuevo entre la evaporación y atomización.

La leche para elaboración de leche entera en polvo normalmente se pasteuriza a 80 a 85°C para inactivar la mayoría de las enzimas lipolíticas que, de otra manera, podrían degradar la grasa láctea durante el almacenamiento. (Tetra Pack, 1996)

En la producción de leche en polvo con la utilización de rodillos de secado, la leche tratada previamente se aplica sobre los rodillos, de forma que todo el proceso de secado se realiza en una sola etapa, hasta alcanzar el contenido en sólidos requerido.

En la producción de leche en polvo utilizando el secado por atomización, primero se efectúa una concentración de la leche por evaporación al vacío, hasta un contenido en materia seca de aproximadamente 45 a 55 %. En la segunda etapa, el concentrado se bombea hasta una torre de atomización para su secado final. La evaporación es una etapa de producción necesaria si se desea obtener un polvo de alta calidad.

Después del secado en rodillos o por atomización, el polvo obtenido se envasa en latas, bolsas de papel, bolsas laminadas o bolsas de plástico, dependiendo de la calidad del producto y de las exigencias del consumidor. (Tetra Pack, 1996)

3.7 Bacterias Ácido Lácticas (BAL).

Se trata de bacterias Gram-positivas que tienen una pared celular muy gruesa. Son inmóviles, no producen esporas, son anaerobias pero aerotolerantes. Son poco proteolíticas y poco lipolíticas. (Romero et al., 2004)

Forman colonias pequeñas, nunca pigmentadas, asociadas a la ausencia de citocromos. (Mendoza, 2009)

Producen gran cantidad de ácido láctico por fermentación utilizando azúcares como sustrato. Son microorganismos que requieren factores de crecimiento complejos como vitaminas del grupo B, purinas, pirimidinas y aminoácidos. Dado que carecen de porfirinas y citocromos, no realizan fosforilación por transporte de electrones, reciben energía por fosforilación a nivel sustrato. (Mendoza, 2009)

Dentro de las características fisiológicas de las bacterias lácticas se distingue su tolerancia a la acidez, pueden seguir creciendo aún a valores de pH menores a 5.0. La actividad de las bacterias ácido lácticas limita el crecimiento de otras bacterias, tanto por el efecto del bajo pH como ciertas sustancias inhibitoras

producidas por algunas especies (ácidos orgánicos y bacteriocinas). (Mendoza, 2009)

Las BAL pertenecen al phylum Firmicutes que comprende alrededor de 20 géneros: *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Vagococcus*, *Aerococcus*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus*, *Carnobacterium* y *Weissella* son los más importantes. Siendo *Lactobacillus* el más grande de todos los géneros. (Parra, 2010)

De todas ellas normalmente cuatro se encuentran en los cultivos lácticos iniciadores: *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Lactococcus* y *Leuconostoc*. Un quinto género, *Enterococcus*, se encuentra en algunos fermentos o cultivos iniciadores mixtos debido a su efecto beneficioso en el desarrollo del aroma, sabor y textura de los productos lácteos. (Mendoza, 2009)

3.7.1 Clasificación de las BAL.

La clasificación de las bacterias lácticas se basa en la morfología, la forma de fermentar glucosa, desarrollo a diferentes temperaturas, configuración del ácido láctico que producen, la habilidad de crecer a altas concentraciones de sal, y la tolerancia a la alcalinidad y acidez (Konings, et al., 2004).

Según su *morfología*, pueden clasificarse en coco (*Streptococcus*, *Lactococcus* y *Leuconostoc*) y bacilos (*Lactobacillus*) (Romero et al., 2004)

Según su *temperatura* óptima de crecimiento, se distingue entre bacterias lácticas *mesófilas*, cuya temperatura óptima de crecimiento está entre 20 y 30°C, y *termófilas*, cuya temperatura óptima de crecimiento está entre 35 a 45°C. (Romero et al, 2004)

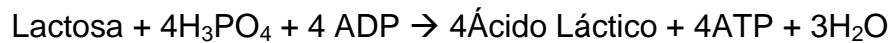
Según la *fermentación* de la lactosa las BAL se clasifican en homofermentativas (producen sólo ácido láctico) y heterofermentativas (producen ácido láctico y otras sustancias) (Parra, 2010).

El grupo *Homofermentativo* compuesto de *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Enterococcus* y *Streptococcus*, utilizan la ruta Embden-Meyerhoff-Parnas para la conversión de glucosa en ácido láctico. (Parra, 2010).

La actividad de las diferentes enzimas que intervienen en la vía metabólica y la formación de los metabolitos correspondientes regulan la captación de la lactosa por parte de la bacteria hasta que la acidez desarrollada frena la multiplicación de las bacterias lácticas. En el caso de los *Lactococcus* esto sucede cuando se ha producido entre un 0.6 y 0.9% de ácido láctico, y en el caso de los *Lactobacillus* homofermentativos, cuando los niveles son entre 1,8 y 2.5 % de ácido láctico. Si la acidez no frenara su crecimiento serían capaces de convertir entre el 90 y 95% de la lactosa en ácido láctico.

La separación entre la multiplicación y la producción de ácido láctico es debida a que la sensibilidad de las reacciones que intervienen en el crecimiento y las que intervienen en la glicólisis son distintas frente a las condiciones del medio. (Del Castillo et al., 2004).

El metabolismo *homofermentativo* se puede resumir en la siguiente reacción:



El grupo Heterofermentativo está compuesto de un gran número de géneros incluyendo: *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* y *Pediococcus*. (Parra, 2010)

Las bacterias heterofermentativas producen solamente 50% de ácido láctico. Estas fermentan 1 mol de glucosa para formar 1 mol de ácido láctico, 1 mol de etanol y 1 mol de CO₂. 1 mol de ATP es generada por mol de glucosa.

El metabolismo *heterofermentativo* se puede resumir en la siguiente reacción:



3.7.2 Fermentación de hidratos de carbono

El metabolismo de los hidratos de carbono es importante porque genera ácido láctico cuya acumulación produce una reducción del pH y consiguiente inhibición de microorganismos patógenos y de alteración. La acidificación también contribuye al sabor y a la consistencia, ya que favorece la coagulación de las proteínas. El metabolismo de los hidratos de carbono incluye varias etapas y depende de los mecanismos de transporte y de numerosas secuencias de reacciones enzimáticas. En primer lugar los hidratos de carbono penetran a través de la pared celular mediante sistemas de permeasas. Por ejemplo, la lactosa es transportada y, una vez en el interior de la célula, hidrolizada a glucosa y galactosa participan en diversas secuencias enzimáticas. En las bacterias homofermentativas, el azúcar es metabolizado por la vía glucolítica o de Embden-Meyerhof y la galactosa por la vía Tagatosa. Destacan tres enzimas: a) aldolasas, que transforman la hexosa difosfato en gliceraldehído 3-P; b) piruvato quinasa, responsable de la formación del piruvato, y c) lactato deshidrogenasa, enzima que transforma el piruvato en ácido láctico, que es el principal producto final, responsable de la acidificación. Hasta el 90 a 95% del azúcar inicial es convertido en ácido láctico. La proporción de isómeros del ácido láctico D (+) y L (-) depende de la distinta actividad, según bacterias, de la D y L lactato deshidrogenasa, respectivamente. Algunas bacterias forman la mezcla racémica porque también disponen de la lactato racemasa que transforma un isómero en otro. En el caso de las bacterias heterofermentativas, la carencia de aldolasas impide la fermentación por vía glucolítica. En este caso, se sigue la vía de la fosfoacetolasa que genera no sólo ácido láctico sino otros productos como CO₂, ácido acético y etanol. (Aranceta et al., 2002)

3.7.3 Proteólisis

Las bacterias lácticas disponen de un sistema proteolítico que les permite obtener aminoácidos a partir de las proteínas del medio. En general, este sistema consiste en las siguientes etapas: a) Endoproteasas o proteinasas extracelulares, que actúan hidrolizando las proteínas (caseínas en el caso de quesos y proteínas sarcoplásmicas y miofibrilares en el caso de embutidos); b) sistemas de transporte, localizados en la pared celular, que permiten la incorporación de los péptidos generados en el interior de la célula, y c) Exopeptidasas intracelulares que hidrolizan los péptidos que llegan al interior de la célula hasta aminoácidos libres. La concentración y composición de los pequeños péptidos y aminoácidos libres generados tienen gran importancia en el sabor característico de estos productos. Además estos aminoácidos pueden contribuir al aroma a través de diversas reacciones, como la formación de pequeñas cantidades de pirazinas por reacciones de Maillard o degradación de Strecker de valina, isoleucina y leucina que genera aldehídos ramificados con aromas característicos. También cabe resaltar, a nivel nutricional, que la intensa hidrólisis de las proteínas que se produce en ambos tipos de productos resulta en un aumento en la concentración de aminoácidos libres y en una mejora de su digestión y de su biodisponibilidad. (Aranceta et al., 2002)

3.7.4 Transformación de aminoácidos libres

Las bacterias lácticas pueden utilizar los aminoácidos libres generados por la cadena proteolítica como sustrato para diversas reacciones enzimáticas, que pueden actuar en mayor o menor medida según las cepas, y generar un amplio abanico de compuestos. Estas reacciones enzimáticas son básicamente las siguientes:

a) *Deshidrogenación*, consiste en diferentes reacciones cuyo resultado final es la generación de alcoholes y ácidos junto con ión amonio como subproducto que puede elevar ligeramente el pH.

b) *Transaminación*, que consiste en la transferencia del grupo α -amino del primer aminoácido al átomo α de carbono de un α -ceto-acido, generando así un nuevo aminoácido.

c) *Desaminación*, más habitual en levaduras y mohos, que cataliza la hidrólisis de ciertos aminoácidos como los ácidos aspártico y glutámico, así como la treonina, serina y arginina, eliminando el grupo amino y generando amoniaco que puede elevar el pH ligeramente.

d) *Degradación* por las liasas de ciertos aminoácidos como tirosina a fenol y triptófano a indol o por las demetilosas de la metionina a compuestos azufrados.

e) *Descarboxilación* de aminoácidos como tirosina, triptófano y fenilalanina para generar tiramina, triptamina y feniletilamina, respectivamente.

También se pueden generar cadaverina, histamina y putrescina a partir de lisina, histidina y ornitina, respectivamente. Las amina biógenicas constituyen un riesgo a la salud de los consumidores, por lo que se debe controlar las materias primas, el proceso y las cepas a utilizar para evitar riesgo de su formación. (Aranceta et al., 2002)

3.7.5 Lipólisis

La degradación de los lípidos por acción de las lipasas y esterasas constituye uno de los cambios bioquímicos con mayor repercusión en el desarrollo del aroma, tanto de quesos como de embutidos, Las bacterias lácticas como *L. lactis* y *Lb. platarum*, poseen lipasas y/o esterasas que pueden contribuir a estos procesos, aunque, en general, su participación se considera muy limitada en relación a la de otros microorganismos, especialmente levaduras y mohos, y a la de los enzimas endógenos. Las diversas lipasas y fosfolipasas actúan sobre triglicéridos y fosfolípidos, respectivamente. Los ácidos grasos insaturados resultantes son objeto de posteriores oxidaciones que generan directamente compuestos volátiles, muchos de ellos con aromas propios, o bien indirectamente por reacciones de los productos de oxidación secundaria con compuestos de origen proteínico,

conocidas como interacciones lípido-proteína, que también generan compuestos de intenso aroma. (Aranceta et al., 2002)

3.7.6 Beneficios de las BAL

Se ha clasificado a las bacterias ácido-lácticas (BAL) como agentes promotores de la salud, ya que se consideran microorganismos capaces de sobrevivir a través del tracto digestivo, con un efecto inmunomodulador y beneficioso sobre la función intestinal (cuadro 5). Sin embargo, aún son necesarios estudios bien diseñados con marcadores que puedan definir su efecto saludable. (Aranceta et al., 2002)

Todavía está por resolver cómo se lleva a cabo la interacción de las bacterias lácticas con las células linfoides del intestino para conseguir la activación del sistema inmunitario de la mucosa, así como el mecanismo por el cual estas bacterias beneficiosas pueden ejercer su efecto adyuvante. En distintos estudios se mencionan posibilidades diversas que involucran tanto la inmunidad específica como inespecífica para explicar la actuación de las BAL. En particular se ha propuesto la influencia del sistema inmunitario secretor (inmunoglobulinas) y un efecto trófico sobre la capa intestinal. (Aranceta et al., 2002)

Cuadro 5. Resumen de los efectos beneficiosos de las BAL

| | |
|--------------------|---|
| | Hipersensibilidad retardada |
| | Producción de anticuerpos |
| BAL (Vivas) | Activación de macrófagos |
| | Prevención de Infecciones entéricas |
| | Atenuación de las patologías intestinales inflamatorias |
| | Atenuación de enfermedades autoinmunes |

Fuente: Aranceta et al., 2002

★ Disminución de intolerancia a la lactosa

Uno de los efectos más consistentes y reproducibles es la disminución de los síntomas asociados con la mala absorción de lactosa. La intolerancia congénita a lactosa es causada por una deficiencia de la enzima β -galactosidasa a nivel intestinal, resultando así en la imposibilidad de digerir este disacárido. Los individuos que la padecen desarrollan diarrea, flatulencia, dolor abdominal e incluso fiebre luego del consumo de leche, aunque los síntomas varían con el grado de intolerancia. Estudios en humanos demostraron que la lactosa en los productos fermentados es asimilada más fácilmente que la misma cantidad presente en la leche. Estos resultados se deben a un aumento en la actividad β -galactosidasa luego de la ingesta de las leches fermentadas, cuyo origen es microbiano y no de mucosa. Este efecto comprende la disminución de la concentración de lactosa en el producto fermentado (debido al crecimiento y metabolismo microbiano) y al suministro de la enzima β -galactosidasa en el lumen intestinal. (Font de Valdez et al., 2005)

★ Inhibición de patógenos intestinales

Son varios los autores que observan un aumento en la capacidad fagocítica tras consumir distintas BAL. Este aumento podría contribuir a que el organismo desarrolle una mayor capacidad de lucha frente a infecciones microbianas, por ejemplo las causadas por patógenos del tracto gastrointestinal, y frente a infecciones secundarias provocadas por bacterias y hongos. (Aranceta et al., 2002)

El pH del yogur es muy bajo y la concentración de ácido láctico demasiado elevada para permitir el crecimiento de los microorganismos patógenos y parece que la muerte de las células se produce rápidamente. Por ejemplo, *Campylobacter*, desaparece de forma inmediata con la presencia de ácido láctico, mientras que *Salmonella* se destruye o inactiva cuando la concentración de ácido láctico está por encima de 1% y el pH es inferior a 4.55. (AASA, 2010)

★ Disminución del riesgo de enterocolitis necrotizante neonatal

La alimentación del recién nacido con leche materna constituye una protección eficiente contra diferentes tipos de infecciones. La protección está mediada por la presencia de anticuerpos y células inmunocompetentes, así como por factores bioactivos (oligosacáridos, enzimas, hormonas, factores de crecimiento y citoquinas) que participan en la maduración de diferentes estirpes celulares inmunocompetentes. De los anticuerpos presentes en el fluido materno, la IgA representa la mayor proporción. Esta inmunoglobulina secretora inhibe la traslocación de bacterias causantes de infecciones intestinales evitando la bacteriemia y la enterocolitis necrotizante. Esta última patología afecta principalmente al recién nacido prematuro y se caracteriza por una necrosis en la mucosa o las capas más profundas del colon y el intestino delgado proximal provocada por una superpoblación de bacterias gram negativas (*E. coli*, *Klebsiella* y *Enterobacter*) en el duodeno. (Hawkey, P., et al., 2000)

Estudios realizados en modelos experimentales en animales indican que dos posibles mecanismos estarían involucrados en el efecto protector: 1) la exclusión competitiva del patógeno debido a la colonización del intestino por las BAL; 2) la inhibición de los mediadores pro inflamatorios a nivel intestinal. (Font de Valdez et al., 2005)

★ Efectos inmunomoduladores

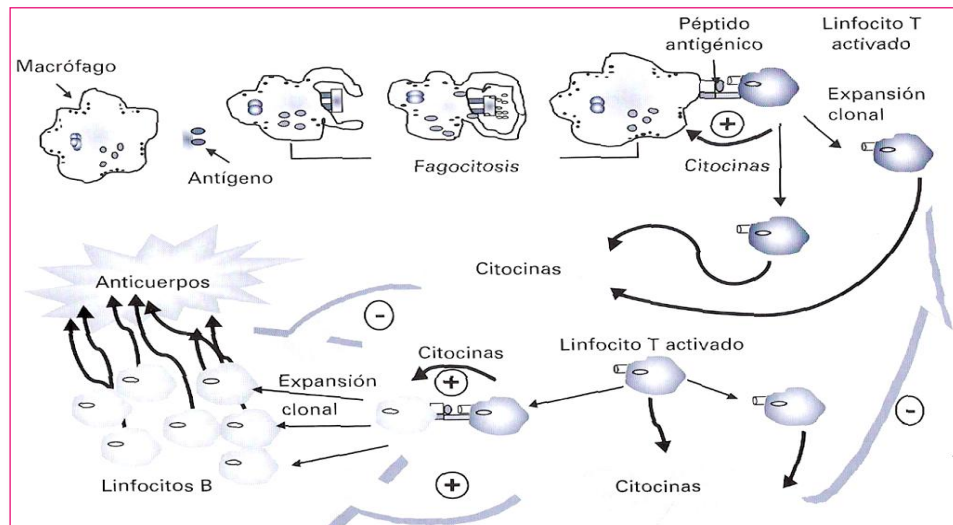
Los estudios llevados a cabo en animales y humanos se han centrado en los efectos de las leches fermentadas sobre tres funciones prioritarias del sistema inmunitario: reconociendo un antígeno, destrucción del mismo y regulación de la respuesta inmunitaria. Así se ha podido observar que los macrófagos, inmunoglobulinas específicas y algunas citoquinas se modifican tras la ingesta de leche fermentada. (Aranceta et al., 2002)

El sistema inmunitario se encarga de la defensa del organismo, poniendo en marcha una serie de mecanismos para hacer frente a la invasión masiva de sustancias extrañas (antígenos) al mismo. El tipo de respuesta inmunitaria depende de la naturaleza del antígeno (virus, bacterias, parásitos, hongos,

determinadas proteínas alimentarias), así como su vía de entrada al organismo (piel, sangre, mucosa respiratoria, epitelio del tracto gastrointestinal).

Se dan principalmente 3 fases en la respuesta inmunitaria: identificación de la partícula extraña, destrucción de la misma y regulación de la respuesta inmunitaria mediante diversos mecanismos de retroalimentación. En la figura 3 se resume como se produce la respuesta inmune ante un antígeno.

Hay que tener en cuenta la importancia de mantener un buen estado nutricional para conseguir un funcionamiento adecuado de la inmunocompetencia del individuo, ya que los alimentos aportan los nutrientes esenciales para la síntesis de los elementos (sustancias y células inmunocompetentes) que constituyen dicho sistema. Sin embargo, no hay que olvidar que, junto con los alimentos, ingerimos una gran cantidad de bacterias, la mayoría de las cuales mueren cuando atraviesan la pared gástrica, debido a su bajo pH. El interés se centra en aquellas bacterias que son capaces de sobrevivir una vez que han atravesado el tracto gastrointestinal. Teóricamente, estos microorganismos podrían interactuar con las bacterias de la microflora y/o células de la mucosa intestinal, induciendo o modulando distintas actividades biológicas que pudieran ser beneficiosas. (Aranceta et al., 2002)



Fuente: Aranceta et al., 2002

Figura 3. Esquema de la actuación de células inmunocompetentes ante la llegada de un antígeno.

Sin embargo, algo que hay que tener muy en cuenta es que está demostrado que no todas las cepas de bacterias ácido lácticas ejercen los mismos efectos y hay que esperar una gran variabilidad entre especies, y también entre cepas distintas de la misma especie, en su influencia sobre los diversos aspectos de la inmunidad. (Aranceta et al., 2002)

3.8 Características del género *Lactococcus*.

Son cocos no esporulados, inmóviles, crecen a 10°C pero no a 45°C, se encuentran en parejas o cadenas cortas, catalasa negativos, anaerobios facultativos, homofermentativos y con necesidades nutricionales complejas. La longitud de la cadena depende principalmente de la cepa y en ocasiones por el medio de crecimiento.

Antiguamente incluidos en el género *Streptococcus*, han sido elevados a la categoría de género, siendo admitidas las cuatro especies y tres subespecies siguientes:

- ★ *L. lactis ssp. lactis*
- ★ *L. lactis ssp. cremoris*
- ★ *L. lactis ssp. hordniae*
- ★ *L. garvieae*
- ★ *L. plantarum*
- ★ *L. raffinolactis*

Usualmente crecen en soluciones de NaCl al 4%, excepto *L. lactis ssp. cremoris* la cual únicamente tolera 2% p/v. Se aíslan de leche cruda y también en la flora del rumen. Siendo las especies *Lactococcus lactis ssp. lactis* y *cremoris* las más estudiadas por su capacidad de producir y excretar una familia de pequeños polipéptidos de 3500 Da. Frecuentemente en forma de dímeros o tetrámeros considerados antibióticos. Estos péptidos se denominan Nisina. Su modo de acción se restringe a bacterias Gram positivas, actúa también sobre células vegetativas impidiendo la germinación de las esporas como *Bacillus* y *Clostridium* (Mora et al., 2007).

3.9 *Lactococcus lactis ssp. lactis*

Lactococcus lactis ssp. lactis fue aislada por primera vez en 1873 por Joseph Lister en leche fermentada, denominándola *Bacterium lactis* y reconociéndola como agente primario en acidificación de la leche coagulada; es la BAL más frecuentemente utilizada como cultivo iniciador en la obtención de productos lácteos cultivados, en particular quesos y leches diversas (Mora et al., 2007).

Lactococcus lactis es un microorganismo clasificado como bacteria ácido láctica, ya que fermenta azúcar de la leche (lactosa) para producir ácido láctico. *Lactococcus* son típicamente células esféricas u ovoides, alrededor de 1.2 μm a 1.5 μm , que se presentan en pares y cadenas cortas. (Samaržija, 2001) Son Gram-positivos, no móviles, y no forman esporas. *Lactococcus* se encuentra asociada con el material vegetal, principalmente gramíneas, de la que son fácilmente inoculó en la leche. Por lo tanto, se encuentran normalmente en la leche y puede ser una causa natural de acidificación. *Lactococcus lactis* tiene dos subespecies, *lactis* y *cremoris*, ambos de los cuales son esenciales en la fabricación de muchas variedades de queso y otros productos lácteos fermentados. (Kenneth, 2010)

Lactococcus lactis está relacionado con otras bacterias de ácido láctico tales como *Lactobacillus acidophilus* en nuestro tracto intestinal y *Streptococcus salivarius* en la boca. Sin embargo, *Lactococcus lactis* normalmente no coloniza los tejidos humanos y difiere de muchas otras bacterias de ácido láctico en su pH, la sal y las tolerancias de temperatura para el crecimiento, que son características importantes de interés para su uso como un cultivo iniciador en la industria quesera. (Tannock, 2005)

Lactococcus lactis es vital para la fabricación de quesos como el Cheddar, Colby, queso cottage, queso crema, Camembert, Roquefort y Brie, así como otros productos lácteos como la mantequilla de cultivo, suero de mantequilla, crema agria y el kéfir. También puede ser utilizado para fermentaciones vegetales tales como encurtidos de pepino y col. La bacteria se puede utilizar en cultivos de cepas individuales de arranque, o en cultivos de la cepa mixtos con otras bacterias

de ácido láctico tales como *Lactobacillus* y especies de *Streptococcus*. (Kenneth, 2010)

Las bacteriocinas producidas por bacterias lácticas son un grupo heterogéneo de péptidos, de pequeño tamaño, con actividad antimicrobiana de utilidad en la conservación de alimentos. Por su potencia para inhibir a microorganismos patógenos y alterantes, en especial bacterias Gram-positivas, presentan interés para la industria alimentaria en general. (Gil, 2010)

La nisina ha sido la primer bacteriocina descrita, es un péptido bioactivo sintetizado por cepas de *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* durante la fase exponencial de crecimiento (García, 2011). Tiene una masa molar de 3.4 kDa y está compuesta de 34 residuos de aminoácido. Es comercialmente usada como agente natural de bioconservación de alimentos y considerada como segura por la FDA. Recibió la designación GRAS (Generalmente Reconocido como Seguro) en 1998, dado que no es tóxica y se degrada por enzimas digestivas, además no brinda sabor o color. La actividad de la nisina es medida en unidades internacionales (UI), y la actividad aproximada de 1µg de nisina pura es de 40 UI. (Piña, et al., 2011)

La nisina es un agente antimicrobiano natural con actividad contra una amplia variedad de bacterias Gram-positivas, incluyendo las transmitidas por los alimentos, patógenos como *Staphylococcus*, *Listeria* y *Clostridium*. El objetivo principal de la nisina se cree que es la membrana celular. A diferencia de algunos otros péptidos antimicrobianos, la nisina no necesita un receptor para su interacción con la membrana celular, sin embargo se requiere la presencia de un potencial de membrana. La nisina es un conservante natural presente en el queso elaborado con *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, pero también se utiliza como conservante en alimentos procesados térmicamente y alimentos bajos de pH. Dado que la nisina no puede ser sintetizada químicamente, las cepas de *Lactococcus lactis* productoras de nisina se utilizan para su síntesis industrial. (Mohammed et al., 2010)

La nisina se ha utilizado como un conservante en diversos productos lácteos pasteurizados y vegetales enlatados, horneados, alto contenido de humedad, y productos de harina de huevo líquido pasteurizado. (Kenneth, 2010)

La nisina es usada para el control de bacterias de descomposición del ácido láctico han sido identificados en la cerveza, el vino, la producción de alcohol y alimentos con alto contenido de ácidos tales como aderezos para ensaladas. La producción de preparaciones de nisina altamente purificada ha llevado al interés en la utilización de esta bacteriocina para la terapia de la úlcera humana y control de la mastitis en el ganado. (Kenneth, 2010)

El espectro antimicrobiano incluye microorganismos deterioradores y patógenos de alimentos principalmente bacterias Gram-positivas como *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus*. Se ha encontrado actividad contra bacterias Gram- negativas como *Escherichia coli* y *Salmonella* cuando ha sido comprometida la integridad de la membrana externa. Estudios recientes han mostrado el mecanismo de la nisina para inhibir la germinación de esporas de *Bacillus anthracis*, previniendo el establecimiento del metabolismo oxidativo y el potencial de membrana de las esporas germinativas. (Piña, et al., 2011)

3.10 Yogur.

El yogur es un producto lácteo fermentado que resulta del crecimiento de las bacterias lácticas *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* y *Streptococcus salivarius ssp. thermophilus*, en leche. De esta fermentación debe resultar un líquido suave y viscoso, o un gel suave y delicado, de textura firme, uniforme, con la mínima sinéresis y con sabor característico. Existen tres tipos de yogur; firme, batido y líquido, aunque se pueden mencionar algunos otros como congelado, deshidratado, etc. Cada uno de ellos en forma natural o adicionado con sabores o con fruta. El yogur líquido ha encontrado en México en los últimos años una gran aceptación. (García et al., 2004).

En el cuadro 6 se muestra la composición típica del yogur natural en México.

**Cuadro 6. Composición típica del yogur
(g/100g de producto) en México**

| Componente | Yogur Natural |
|--------------------|---------------|
| Agua | 78-84 |
| Azúcares totales | 2.0-5.7 |
| Proteína verdadera | 4.8-8.0 |
| Grasa | 0.4-4.0 |
| pH | 4.5 |
| %ácido láctico | 1.2-2.0 |

Fuente: García et al., 2004

La leche usada para yogur se debe estandarizar a un nivel menor de grasa y mayores contenidos de lactosa, proteínas, minerales y vitaminas; para eso se pueden añadir sólidos lácteos no grasos (leche deshidratada descremada, suero de leche, etc.) de tal forma que la gravedad específica aumenta de 1.03 g/mL a 1.4 g/mL y paralelamente los sólidos no grasos suben a 12%. También se añaden gomas, estabilizantes, saborizantes y edulcorantes. La pasteurización destruye la mayoría de la microflora innata de la leche, lo que permite un campo libre para los cultivos lácticos que se añaden posteriormente; la interacción de la κ -caseína y la β -lactoglobulina provocada por el tratamiento térmico controlado (85°C/25 min.) y favorecida por el pH y la presencia de calcio, crea una nueva estructura que tiene una mejor capacidad de absorción de agua que dará como resultado un gel más firme y terso, de mayor viscosidad que no presenta sinéresis. (Ares, 2013) La homogeneización, después de la pasteurización, estabiliza la grasa en pequeñas partículas que previenen el cremado durante la fermentación, y mejora la textura por la interacción entre las caseínas y los glóbulos de grasa.

En estas condiciones, la leche se inocula con diversos microorganismos, como por ejemplo, *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* y *Streptococcus salivarius ssp. thermophilus*, que actúan de una manera sinérgica a 40 a 45°C. El ácido láctico, producido a partir de la lactosa, baja el pH hasta 5, donde se inicia la formación del coágulo. El sabor y aroma se deben al ácido láctico, además del acetaldehído, la acetona, el diacetilo y a otros compuestos del grupo carbonilo.

Son muchas las variables que afectan las propiedades de estos derivados, tales como el calentamiento, el contenido proteínico, la homogeneización, la acidez alcanzada en la fermentación, el tipo de cultivo y la presencia de estabilizadores. (Badui, 2006).

Proceso general de elaboración

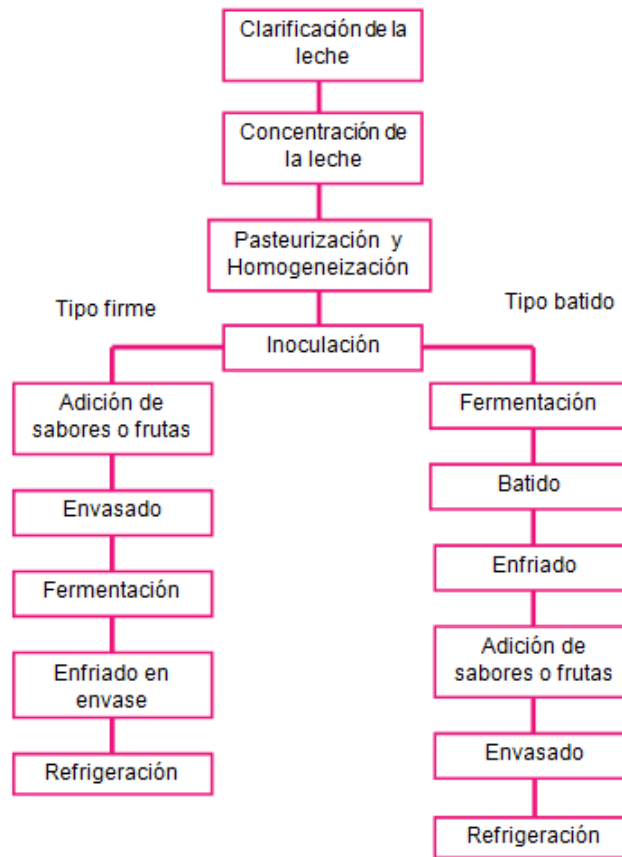
En la figura 4 se muestra un diagrama general de la elaboración de yogur. Partiendo de leche clarificada y concentrada, seguido de una pasteurización. Esta operación tiene como objetivo eliminar la flora asociada a la leche, dejando así un medio adecuado para el cultivo de las bacterias del yogur, libre de competidores y microorganismos indeseables. El tratamiento térmico reduce el potencial redox de la leche debido a la desorción del oxígeno disuelto y la producción de grupos sulfhidrilos libres por la desnaturalización de las proteínas, lo cual favorece el crecimiento de *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus*. También se pueden liberar unos péptidos que estimulan el crecimiento de los cultivos. Este tratamiento modifica además la estructura de las proteínas de la leche favoreciendo su agregación, provoca asociación de la κ -caseína con la β -lactoglobulina y la α -lactoalbúmina, y expone los dominios hidrofóbicos de las proteínas por desnaturalización, lo cual mejora la viscosidad del yogur y su capacidad de retención de agua. Existe una amplia gama en las condiciones de pasteurización; en procesos por lote se reportan condiciones que varían de 70 a 90°C, de 5 a 45 minutos, o en procesos continuos en intercambiadores de calor tubulares o de placas, se reportan temperaturas de 80°C a 95°C durante 10 a 40 minutos, e incluso en algunos casos temperaturas hasta de 105°C a 149°C por algunos segundos. Un calentamiento insuficiente puede resultar en un yogur con cuerpo débil, mientras que un sobrecalentamiento ocasiona un producto con fuerza de gel débil y tendencia a desuerar. Si la leche no se calienta el producto prácticamente no incrementa su viscosidad, ya que son esenciales las interacciones entre las micelas de caseína y las proteínas del suero, particularmente la α -lactoalbúmina, para lo cual es fundamental un tratamiento térmico considerable. Se ha reportado que el proceso térmico más conveniente en términos de la calidad de la consistencia del producto es el de alta temperatura por corto tiempo; por ejemplo a

98°C, 1.87 minutos; bajo estas condiciones se presenta la mínima sinéresis. En procesos lentos (85°C, 10 a 40 minutos) se obtiene la mayor firmeza y viscosidad, pero una pobre retención de agua y textura granular.

La homogeneización puede efectuarse antes o después de la pasteurización y generalmente se hace a temperaturas de alrededor de 60°C y presiones de 2.6 a 6.8 kPa.

Después de estas operaciones la leche se enfría hasta 40°C a 45°C y se inocula con 2% a 5% de un cultivo compuesto de una mezcla con relación uno a uno de *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* y *Streptococcus salivarius ssp. thermophilus*. La leche se incuba a esta temperatura de 3 a 6 horas, y el producto alcanza una acidez de entre 0.8 y 1.4 % de ácido láctico, con un pH entre 3.7 y 4.6; en yogures mexicanos se encontró una acidez de entre 1.12 y 2.06 % de ácido láctico, y valores de pH entre 3.95 y 4.7. La incubación se efectúa en el envase de distribución en el caso del yogur firme o semisólido, y en tanques para el yogur batido y líquido. Por último el producto se enfría a 5 a 7°C, temperatura a la cual la fermentación se detiene y el producto se acidifica ya muy poco. Los productos resultantes son: en el caso de la fermentación en el envase, un yogur de consistencia rígida, con la apariencia de un gel semisólido, que puede tener colorantes y saborizantes añadidos antes de la fermentación, e incluso, fruta, la cual se adiciona en el fondo del envase también previo a la formación del coágulo; en el caso de yogur batido, una vez roto y agitado el coágulo debe obtenerse un producto de consistencia cremosa y uniforme, al cual se pueden añadir saborizantes, colorantes y/o fruta. (García et al., 2004).

Figura 4. Diagrama de elaboración de Yogur.



Fuente: García et al., 2004

3.11 Leches fermentadas.

Las leches fermentadas son productos de consistencia semisólida en los que el fenómeno más importante es la transformación de la lactosa de la leche en ácido láctico u otros componentes, debido a la acción de los microorganismos específicos que se inoculan en la leche (Kurmann, 1992). Además de la transformación de la lactosa, se producen fenómenos de proteólisis y lipólisis por acciones microbiana y enzimática, que confieren a los derivados unas determinadas características nutricionales y que también determinan su aroma, sabor y consistencia; una de ellas son las leches fermentadas acidificadas en las que se produce ácido láctico a partir de lactosa; el ejemplo más claro es el yogur (elaborado con *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus*) y leches fermentadas ácido-alcohólicas en las que los

microorganismos inoculados a la leche conducen a la formación de, además de ácido láctico, alcohol etílico y CO₂. (Velázquez et al., 2000)

Existe una amplia variedad de leches fermentadas, probablemente algunos cientos. En algunos países el consumo de estos productos es superior al de la leche fresca, y se utilizan leches de diferentes especies; por ejemplo vaca, borrega, cabra, camella y yegua. En ocasiones es difícil definir algunos de estos productos debido a su gran número y a que se elaboran de diferentes formas y con distintos tipos de materia prima; éste puede ser el caso del *buttermilk* o en México el “jocoque”. Es también difícil intentar una clasificación de estos productos ya que sus características pueden variar de un fabricante a otro, e incluso, particularmente en el caso de las leches fermentadas tradicionales, los microorganismos que intervienen en su elaboración pueden ser variables de acuerdo con la región, el procedimiento de inoculación y aun de las variaciones climáticas. No obstante un buen intento de agrupar a las leches fermentadas es el de Marshall que aquí se reproduce en forma más amplia, para el cual se tomó como criterio el tipo de la principal flora dominante. Esto se observa en el cuadro 7. (García et al., 2004)

Cuadro 7. Clasificación de las leches fermentadas de acuerdo con el tipo de flora dominante

| Grupo | Tipo de Flora | Características | Productos |
|-------|--|------------------------|--|
| I | <i>Lactococcus</i> y en algunos <i>Leuconostoc</i> (bacterias mesofílicas) | Acidez baja o moderada | Jocoque Buttermilk Leches escandinavas |
| II | <i>Lactobacillus</i> | Acidez moderada o alta | Leche “búlgara” Leche acidófila Yakult |
| III | <i>Lactobacillus</i> <i>Streptococcus</i> (bacterias termofílicas) | Acidez moderada o alta | Yogur Dahí Labneh Bioghurt Prostokvasha Brano Gioddu |
| IV | Bacterias lácticas y Levaduras | Acidez y alcohol | Kéfir Koumiss “Búlgaros” |

Fuente: García et al; 2004

Las leches fermentadas no solo son un alimento nutrimental y de buen gusto, sino que también representan una unidad o sistema biológico vivo, con propiedades funcionales sobre la salud. (Parra, 2010)

3.11.1 Importancia de las leches fermentadas como alimentos funcionales.

En Europa, en 1999 se elaboró un primer documento de consenso sobre conceptos científicos en relación con alimentos funcionales. En este documento el International Life Science Institute (ILSI) estableció que un “alimento funcional es aquel que contiene un componente, nutriente o no nutriente, con efecto selectivo sobre una o varias funciones del organismo, con un efecto añadido por encima de su valor nutrimental y cuyos efectos positivos justifican que pueda reivindicarse su carácter funcional o incluso saludable”. (SENC, 2005)

Aún no existe una definición universal para los alimentos funcionales porque se trata más de un *concepto* que de un grupo de alimentos. A grandes rasgos pueden considerarse Alimentos Funcionales aquellos que proporcionan un efecto beneficioso para la salud, además de sus contenidos de nutrición básica.

Los alimentos funcionales como tal, tienen que tener unas características determinadas:

- ★ Tienen que ser alimentos que se manipulen para conseguir algún beneficio extra, por eliminación, reducción o adición de algún componente.
- ★ Los alimentos funcionales son básicamente alimentos “clásicos” pero llevan incorporado nuevos componentes alimentarios o no alimentarios, siempre que tengan un *claro efecto beneficioso*.
- ★ La *base de la alimentación*, es una alimentación completa y variada. Los alimentos funcionales, complementan la función nutrimental y la prevención de ciertas enfermedades. Hay que tener en cuenta que las cantidades deben ser las normalmente consumidas en la dieta.
- ★ La presentación de un alimento funcional, tiene que ser como la de un alimento, sin modificar sus características. Nunca deben presentarse en forma de cápsulas o comprimidos.

Entre los ejemplos de alimentos funcionales se pueden mencionar los que están enriquecidos con vitaminas y minerales, como los cereales o los lácteos. Alimentos a los que se les adicionan microorganismos vivos que generan beneficio a la salud del consumidor. Otros alimentos que tienen modificado alguno de sus componentes, como los ácidos grasos o la fibra, e incluso valores añadidos en base a su contenido en ácidos grasos ω_3 , ácido linoléico conjugado, luteína, isoflavonas, etc.

Ejemplos de alimentos funcionales importantes en este estudio son el yogur y las leches fermentadas con bacterias ácido lácticas.

Las bacterias ácido lácticas son microorganismos vivos que, ingeridos en cantidades suficientes, tienen efectos muy beneficiosos como contribuir al equilibrio de la flora intestinal y potenciar el sistema inmunológico. Entre los alimentos que las contienen están los yogures frescos y otras leches fermentadas.

El yogur se considera *alimento funcional* por contener bacterias vivas que permanecen activas en el intestino y ejercen importantes efectos fisiológicos.

El yogur mejora la digestión de la lactosa solo cuando se trata con calor, lo que indica que son las bacterias vivas del yogur las responsables del efecto. Las bacterias del yogur son capaces de sobrevivir a las condiciones ácidas por el efecto amortiguador que producen los componentes de la leche. Esta acción varía en función de las características de fabricación.

- ★ Puede ayudar a la rehidratación, problema importante en diarreas de niños y ancianos.
- ★ Suministran antibióticos naturales producidos por las bacterias lácticas, que parecen reducir la intensidad de la diarrea en niños y adultos.
- ★ Algunas hipótesis afirman que el yogur podría mejorar la respuesta del sistema inmunitario.

3.11.2 Valor nutrimental de las leches fermentadas.

El valor nutritivo de los productos lácteos depende principalmente de la leche de partida que se utilice en su elaboración, aunque también se verá influido por los efectos del procesado (tratamiento térmico, almacenado, desnatado, etc.) (Montero et al, 2006)

Desde el punto de vista nutrimental y de salud, las leches fermentadas aportan nutrimentos adicionales a los del producto fresco, como son vitaminas del complejo B y una mayor cantidad de proteínas en productos concentrados como el yogur y el labne. Además, las proteínas tienen mayor valor biológico debido a la prehidrólisis que sufren por las proteasas producidas por las bacterias lácticas. También la grasa y la lactosa resultan más digeribles en estos productos que en la leche, por acción de las enzimas microbianas. Las leches fermentadas son alimentos convenientes para las personas que sufren intolerancia a la lactosa, ya que este problema no se presenta cuando se consumen estos alimentos, la probable explicación es la presencia de lactasas microbianas en el tracto gastrointestinal. (García et al., 2004)

Aspectos Nutrimentales.

Aporte energético. El proceso de fermentación per se, no produce cambios importantes en el valor energético de la leche. La conversión de lactosa en ácido láctico sólo reduce este valor en un porcentaje mínimo que se considera despreciable. (Walstra, 2001). El aporte energético es similar al de la leche natural. Aunque tanto éste como la composición general de nutrientes dependerán de los ingredientes que se le añadan a la leche fermentada. (Montero et al., 2006).

La digestibilidad puede mejorar como consecuencia de la ligera predigestión de los componentes que llevan a cabo los equipos enzimáticos de las bacterias lácticas. Para las personas que padecen algún problema intestinal, esta predigestión resulta beneficiosa, pero los consumidores cuya función intestinal es normal digieren los componentes de la leche sin ningún problema. (Walstra, 2001).

Proteínas. El valor proteico de las leches fermentadas es similar al de la leche de partida. La diferencia entre ambos alimentos radica en la mejor digestibilidad de

las proteínas en las leches fermentadas debido a las enzimas proteolíticas de los microorganismos fermentadores que hidrolizan parcialmente las proteínas. Por esto, el valor nutrimental aumenta respecto a la leche líquida. (Aranceta et al., 2005).

La acción proteolítica de las bacterias producida durante la fermentación junto con la acidez y la coagulación de la caseína mejoran la asimilación y digestión de este macronutriente por lo que el valor biológico de la fracción nitrogenada del yogur es mayor que el de la leche de partida. (Montero et al., 2006).

Grasas. El contenido lipídico de las leches fermentadas dependerá principalmente del contenido graso de la leche de partida, es decir, si la leche empleada es entera, semidesnatada o desnatada. Las bacterias fermentadoras también actúan sobre el componente graso de la leche generando derivados más fácilmente digeribles debido a que hidrolizan una pequeña porción de la grasa, produciendo ácidos grasos libres, que aumentan respecto a la leche de partida, aunque el perfil graso total no varía mucho. La materia grasa variará en función de las especies bacterianas utilizadas. (Montero et al., 2006).

Hidratos de carbono. La transformación más importante que realizan los microorganismos durante la fermentación es el paso de lactosa a ácido láctico, con la consiguiente disminución de lactosa hasta casi el 50%. Actualmente, en el proceso de elaboración industrial, las leches fermentadas se enriquecen con leche en polvo por lo que el contenido final de lactosa es más o menos similar al de la leche líquida de partida. Aún así, este proceso mejora la asimilación y digestión de este hidrato de carbono respecto a la leche líquida.

Por otra parte, la presencia de ácido láctico también favorece la asimilación de calcio. (Montero et al., 2006).

Minerales. Estos productos, al igual que la leche líquida de la que proceden, son ricos en diversos minerales como magnesio, zinc, fósforo y principalmente calcio.

Aunque las cantidades de estos nutrimentos no varían significativamente respecto a la leche líquida, debido a la disminución del pH (por la presencia del ácido láctico) durante la fermentación, el calcio y el fósforo pasan a su forma soluble y

las caseínas libres del calcio precipitan facilitando así la acción de las enzimas proteolíticas, lo que favorece la digestibilidad de estos minerales. (Montero et al., 2006).

Vitaminas. El valor vitamínico de las leches fermentadas es difícil de establecer debido a que sobre él influyen diversos factores:

Por un lado los microorganismos asimilan unas vitaminas y sintetizan otras. Los cultivos iniciadores del yogur favorecen la síntesis de vitaminas del grupo B y utilizan otras para su propio desarrollo. Su acción suele disminuir el contenido vitamínico global, menos el de ácido fólico.

Por otra parte, el tratamiento tecnológico aplicado a la leche de partida (tratamiento térmico y almacenamiento) suele destruir parte de las vitaminas y determina, en gran medida, el contenido vitamínico total de las leches fermentadas.

Por último, la presencia de vitaminas liposolubles irá en función del contenido graso de la leche de partida. (Montero et al., 2006)

3.12 Inmovilización celular

La inmovilización celular es un proceso en el que se localiza a las células en una región definida del espacio, restringiendo, completa o parcialmente, los grados de libertad de movimiento de enzimas, organelos, células, etc. por su unión a un soporte. (Arroyo, 1998)

Como ventajas del empleo de células inmovilizadas destacan:

- ★ El aumento de estabilidad de las células.
- ★ Protección frente a las condiciones a las que son sometidas.
- ★ Uso de diferentes soportes de inmovilización, dependiendo el proceso.

Métodos de inmovilización celular

Los métodos de inmovilización celular pueden ser divididos en dos categorías:

- ★ Unión química.
- ★ Retención física

Unión química

Unión a soportes. Se debe procurar que la inmovilización disminuya la inhibición, amplíe el intervalo de pH óptimo y reduzca las posibilidades de contaminaciones microbianas. Dentro de esta categoría se encuentra:

- ★ *Adsorción:* los factores que influyen en la adsorción son el pH del medio, la fuerza iónica, el diámetro del poro y la presencia de iones.
- ★ *Unión covalente:* se basa en la activación de grupos químicos del soporte para que reaccionen con nucleófilos de proteínas

Los materiales empleados como soportes en la inmovilización difieren en tamaño, densidad, porosidad y forma, generalmente se encuentran en forma de cilindro, hojas, fibras y regularmente en forma de esferas. (Arroyo, 1998)

Los soportes pueden clasificarse en dos grupos:

- ★ Soportes inorgánicos: Dentro de este grupo tenemos una gran variedad de soportes, que pueden ser:
 - ∴ *Naturales* (arcillas como la bentonita, piedra pómez, sílice, etc.)
 - ∴ *Materiales manufacturados* (óxidos de metales y vidrio de tamaño poro controlado, vidrio no poroso, alúmina, cerámicas, gel de sílice, etc.)

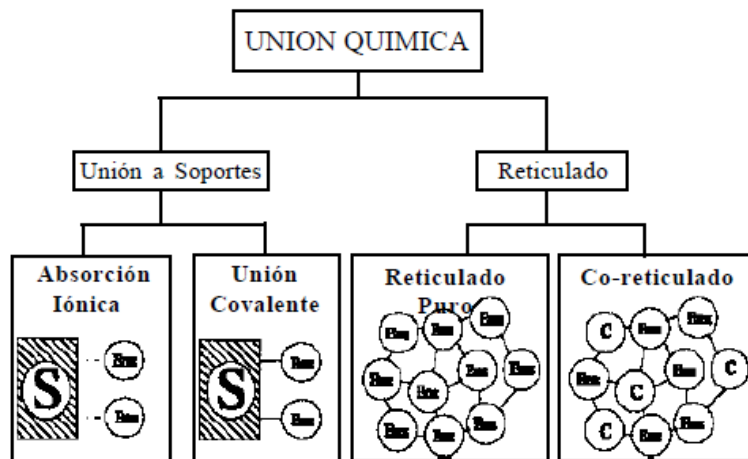
★ Soportes orgánicos: Se pueden clasificar en:

∴ *Polímeros naturales:*

- Polisacáridos (celulosa, almidón, dextranos, agar-agar, agarosa, alginatos, quitina, chitosan, etc.)
- Proteínas fibrosas (colágeno, queratina, etc.)

∴ *Polímeros sintéticos:*

- Poliolefinas (como el poliestireno)
- Polímeros acrílicos (poliacrilatos, poliacrilamidas, polimetacrilatos, etc.)
- Otros tipos (alcohol polivinílico, poliamidas, etc.)



Fuente: Arroyo, 1998

Figura 5. Unión Química

Retención física

Los métodos de retención física incluyen atrapamiento y microencapsulación celular.

Atrapamiento celular. Consiste en la retención física de las células en las cavidades interiores de una matriz sólida porosa constituida generalmente por prepolímeros fotoentrecruzables o polímeros del tipo poliacrilamida, colágeno, alginato, carraginato o resinas de poliuretano.

El proceso de inmovilización se lleva a cabo mediante la suspensión de la célula en una solución del monómero. Seguidamente se inicia la polimerización por un cambio de temperatura o mediante la adición de un reactivo químico. El atrapamiento puede ser en geles o en fibras, que suelen ser más resistentes que los geles. En el primer caso, la célula queda atrapada en el interior de un gel, mientras que en el segundo caso la célula se encuentra ocluida dentro de las microcavidades de una fibra sintética. El atrapamiento, de gran sencillez desde el punto de vista experimental, requiere poca cantidad de célula para obtener derivados activos. (Bruno-Bárcena, 2010)

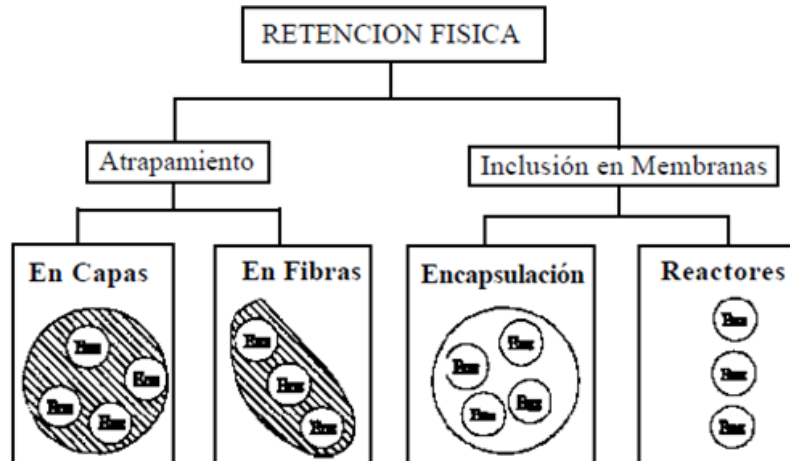
Como ventaja adicional, las células no sufren ninguna alteración en su estructura.

Inclusión en membranas. Dividida en dos tipos:

- ★ **Microencapsulación:** En esta técnica, las células están rodeadas de membranas semipermeables que permiten el paso de moléculas de sustrato y producto. Estas membranas semipermeables pueden ser permanentes (originadas por polimerización interfacial) o no permanentes (generadas por surfactantes, también llamadas “micelas reversas”). Las microcápsulas obtenidas son de forma esférica, con tamaños comprendidos entre 1 y 100 nm de diámetro. Mediante este método se pueden encapsular simultáneamente una gran variedad de enzimas, células o biomoléculas, permitiendo que se lleven a cabo determinadas reacciones que suceden en múltiples pasos.
- ★ **Reactores de membrana:** El desarrollo de reactores o sistemas que contengan células atrapadas ha despertado gran interés en la industria. Estos reactores emplean membranas permeables al producto final, permeables o no al sustrato inicial y obviamente impermeables a la enzima. Mediante una bomba se establece un flujo líquido de sustrato que atraviesa el reactor. (Arroyo, 1998)

En general, en esta metodología, se procede inicialmente a la adsorción de la enzima sobre la membrana que formará el reactor. Esta adsorción se puede realizar de dos formas:

1. Mediante el paso de una solución tamponada de enzima a través de la membrana
2. Por contacto continuo de una solución de enzima con la membrana. (Arroyo, 1998).



Fuente: Arroyo, 1998

Figura 6. Retención Física

3.13 Conservación de bacterias.

Para evitar la domesticación y mutación de bacterias (durante su resguardo), se ha intentado inactivar su metabolismo, mediante técnicas de resguardo conocidas como “métodos restringidos”. Estos métodos se basan en la paralización del crecimiento bacteriano mediante la eliminación del agua disponible de la célula; donde se permite la desecación de bacterias en un soporte inerte y estéril. En este caso las bacterias se pueden colocar en soportes como papel filtro, piedra pómez (pumita), turba, bolitas de alginato e incluso sal gorda. (Morales-García et al., 2010)

Desecación. Los métodos utilizados para la desecación requieren remover el agua o hacer que ésta sea menos disponible. Debe quedar en claro que aunque algunos microorganismos se destruyen durante el secado, este no es letal en sí mismo, muchos pueden sobrevivir y permanecer inactivos, pero cuando el producto desecado vuelve a hidratarse, estos organismos reinician su crecimiento. En la desecación, por la ausencia de agua, los microorganismos no pueden crecer ni reproducirse pero pueden permanecer viables durante años. Después cuando vuelven a disponer de agua, pueden recuperar su capacidad de crecimiento y división. La resistencia de las células vegetativas varía según la especie y el ambiente que rodea al microorganismo. (Tortora, et al., 2007)

La desecación consiste en remover el agua celular e impedir la rehidratación de las células de los microorganismos. Para llevarlo a cabo se inocula una muestra de cultivo en tierra húmeda estéril (material de soporte), se espera hasta que haya crecimiento (varios días) y, luego se seca con aire o al vacío. Después el cultivo se guarda en una atmósfera seca o en refrigeración. Otros materiales de soporte pueden ser sílica gel, discos de gelatina y tiras de papel. Las ventajas que éste método presenta es que no se necesita un equipo especial para ejecutarlo y, si no sufre daño durante la desecación, el cultivo puede continuar viable por muchos años. (Hernández, et al., 2003)

Desecación en celulosa (papel filtro). El empleo de un soporte de papel bastante absorbente (Whatmann No. 3) para el mantenimiento de células en condiciones de ausencia de agua es un procedimiento adecuado y sencillo, para conservar cepas. (Hunter-Cevera et al, 1996)

La técnica consiste en embeber tiras de papel filtro con una suspensión densa de microorganismos en suero, en glutamato de sodio o en otro agente. Las tiras de papel son posteriormente colocadas en tubos para su posterior secado al aire libre o en vacío. De esta forma se ha logrado conservar cepas de los géneros *Salmonella* y *Streptomyces* por periodos de hasta 2 años a temperatura ambiente. (WFCC, 2013)

4 MATERIALES Y MÉTODOS

*Soy de los que piensan que la ciencia tiene una gran belleza.
Un científico en su laboratorio no es sólo un técnico: es también un niño
colocado ante fenómenos naturales que le impresionan como un cuento de hadas.*

*Marie Curie
(1867-1934)*

4. MATERIALES Y METODOS

4.1 MATERIALES

4.1.1 Microorganismo empleado

La cepa empleada es *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* BM147, perteneciente a la colección de cultivos del Instituto de Investigaciones Biomédicas (UNAM-48) de la Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F.

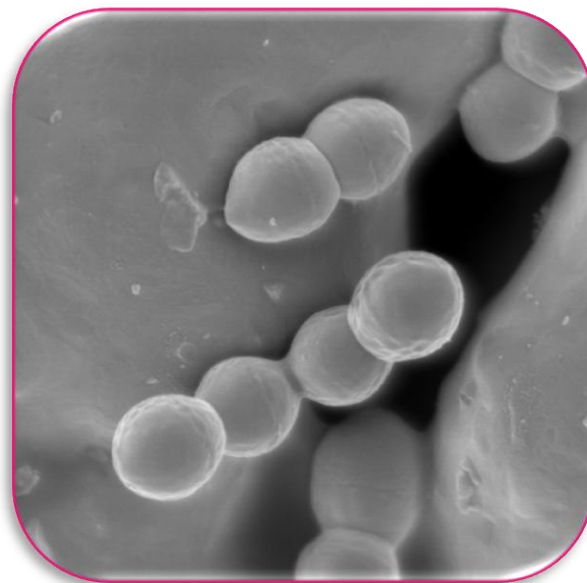


Figura 1. *Lactococcus lactis*
1µm 20000X.

Micrografía electrónica de Joseph A. Heintz.
Universidad de Wisconsin-Madison.

4.1.2 Medios de cultivo

Leche descremada al 11% de sólidos totales (S.T.)

Se disolvieron 11 gramos de leche descremada en polvo Svelty® Figura 0 %® de Nestlé en 100 mL de agua destilada, se agitó durante 5 minutos y finalmente se esterilizó en autoclave a 121°C por 15 minutos.

Medio industrial

Este medio de cultivo fue propuesto por Goldhaber (1982) elaborado con materias primas de grado industrial disueltas en agua destilada. En el cuadro 1 se enlistan sus componentes.

Cuadro 1. Composición del medio industrial

| Componente | g/L |
|--|-----|
| Leche Descremada en polvo ¹ | 60 |
| Glucosa ² | 25 |
| Extracto de Levadura ³ | 10 |
| Caseinato de Sodio ⁴ | 20 |
| pH 7.2 ± 0.1 | |

1. Svelty® Figura 0%® de Nestlé 2. J.T. Baker
3. BD DIFCO 4. Nutrical S.A. de C.V.

Los componentes del medio se disolvieron en agua destilada y posteriormente se esterilizó en autoclave a 121°C por 15 minutos.

Agar APT

Se empleo Agar APT (BD DIFCO) para cuenta en placa, su composición se muestra en el cuadro 2. Se preparó de acuerdo a las indicaciones del fabricante, disolviendo 61.2 g de agar APT por cada litro de agua destilada y se esterilizó en autoclave a 121°C por 15 minutos.

Cuadro 2. Composición del agar APT (BD DIFCO)

| Componente | g/L | Componente | g/L | Componente | g/L | Componente | g/L |
|----------------------|------|-------------------|-----|-----------------------------|-----|---------------------|------|
| Agar bacteriológico | 14 | D-(+) Glucosa | 10 | Fosfato de potasio dibásico | 5 | Cloruro de magnesio | 0.14 |
| Peptona de caseína | 12.5 | Cloruro de sodio | 5 | Tween 80 | 0.2 | Sulfato ferroso | 0.04 |
| Extracto de levadura | 7.5 | Tricitrato sódico | 5 | Sulfato de magnesio | 0.8 | pH 6.8 ± 0.1 | |

Medio de dilución

Como medio de dilución se utilizó solución salina al 0.85%. Esta se preparó disolviendo 0.85 gramos de NaCl en 100 mL de agua destilada, posteriormente se esterilizó en autoclave a 121°C por 15 minutos.

4.1.3 Soporte Sólido

Se utilizó papel filtro de poro abierto (KIMIA DISTRIBUIDOR).

El papel se cortó en tiras de 3 cm x 4 cm, las tiras se colocaron en un frasco de vidrio y se esterilizaron en autoclave a 121°C por 15 minutos.

4.1.4 Leches empleadas

Se emplearon leches de vaca con diferentes tratamientos térmicos y de diferentes marcas, dichas leches se muestran enlistadas a continuación.

1. Leche de Establo Pasteurizada
2. **Nido**[®] Leche entera en Polvo Nestlé (2,2 Kg.)
3. **Alpura**[®] Leche entera en Polvo (500g.)
4. **Lala**[®] Leche entera Pasteurizada (1 L)
5. **Alpura**[®] **Clásica** Leche entera Pasteurizada (1 L)
6. **Leche Fortificada Liconsa** Leche con grasa vegetal Pasteurizada (2 L)
7. **Lala**[®] Leche entera Ultrapasteurizada (1 L)
8. **Alpura**[®] **Selecta** Leche entera Ultrapasteurizada (1 L)
9. **Liconsa**[®] **plus** Leche entera ultrapasteurizada (1 L)

Las leches fueron adquiridas en tiendas de autoservicio, excepto la leche de establo pasteurizada y la leche Liconsa pasteurizada.

La leche de Establo Pasteurizada, es leche de vaca obtenida de la ordeña de la tarde de un establo ubicado en el pueblo de Tulyehualco, delegación Xochimilco, México, D.F. La cual fue pasteurizada 4 horas después de su ordeña a 65°C durante 20 minutos y se conservó a 4°C hasta su uso.

La leche Liconsa pasteurizada fue adquirida en una lechería ubicada en Blvd. Prados de Aragón Col. Las Armas, Municipio de Netzahualcóyotl, México, D.F. esta leche se mantuvo en refrigeración a 4 °C hasta su uso.

Las leches en polvo, Nido y Alpura, fueron preparadas al 10 % de sólidos totales. Se pesaron 20 gramos de leche en polvo y se disolvieron en 200 mL de agua potable. Se preparaban en el momento que iban a ser utilizadas.

Las demás leches, pasteurizadas y ultrapasteurizadas se mantuvieron a 4°C hasta su uso.

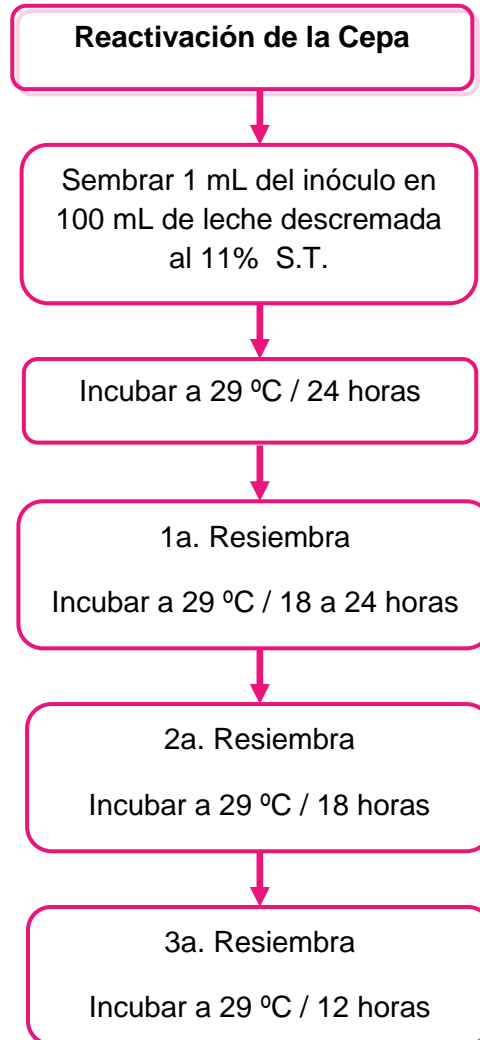


Figura 2. Leches empleadas

4.2 METODOLOGÍA

4.2.1 Propagación de la cepa *Lactococcus lactis ssp. lactis*

Los microorganismos congelados se reactivaron de acuerdo con la metodología propuesta por Goldhaber (1982).



4.2.2 Curva de crecimiento

Para la elaboración de la curva de crecimiento se emplearon cultivos de *Lactococcus lactis ssp. lactis* en su fase estacionaria (cultivos con periodo de incubación de 10 a 24 horas).

Se tomó 1 mL de la tercera resiembra y se inoculó en 100 mL de medio industrial estéril, se incubó a 29°C, se cuantificó el crecimiento microbiano, acidez y el cambio de pH durante 7 tiempos; 0, 2, 4, 6, 8, 10 y 24 horas. Para cuantificar el crecimiento microbiano, se tomó 1 mL de muestra del medio industrial inoculado en cada tiempo y se realizaron diluciones de 10^{-1} a 10^{-9} . Se sembró 1 mL en agar APT estéril de las diluciones 10^{-2} a 10^{-5} para los tiempos 0, 2 y 4, para el tiempo 6 y 8 de las diluciones 10^{-3} a 10^{-6} y para el tiempo 10 y 24 horas de las diluciones 10^{-5} a 10^{-8} , dichas siembras se realizaron por duplicado y se incubaron a 29°C hasta la aparición de colonias macroscópicas durante 48 horas.

Se realizó la cuenta de las colonias, y se obtuvo un promedio, el valor obtenido se multiplicó por el inverso de la dilución efectuada, obteniéndose así, la población microbiana viable, UFC/mL presente a los distintos tiempos de crecimiento.

En la figura 3 se muestra el ejemplo de cuantificación de crecimiento bacteriano a las 24 horas de incubación del cultivo.

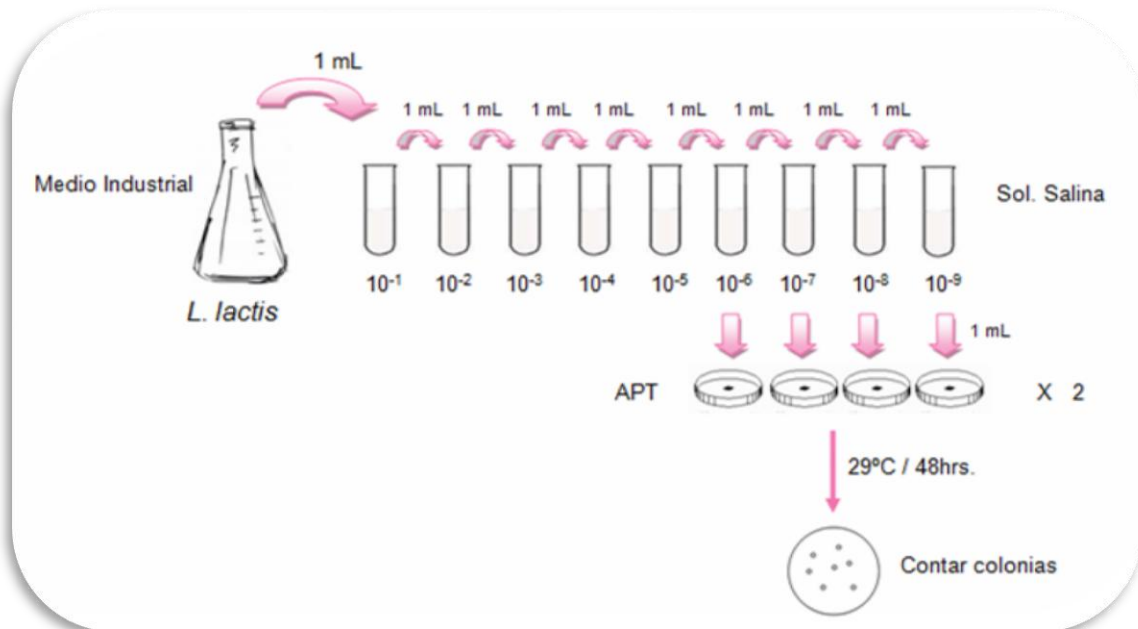


Figura 3. Ejemplo de cuantificación de crecimiento bacteriano a las 24 horas.

4.2.3 Inmovilización de *Lactococcus lactis ssp. lactis* en celulosa

Para la inmovilización se partió de un cultivo de *Lactococcus lactis ssp. lactis* crecido en medio industrial a 29°C durante 10 a 24 horas. Las tiras se sumergieron en el cultivo, se retiró el exceso de medio y fueron colocadas en un desecador al vacío entre 37 y 10 kPa durante cuarenta minutos. Para verificar su secado se pesaban hasta obtener peso constante. Se colocaron en cajas Petri de plástico y se conservaron en refrigeración a 4°C. En la figura 4 se muestra el proceso.

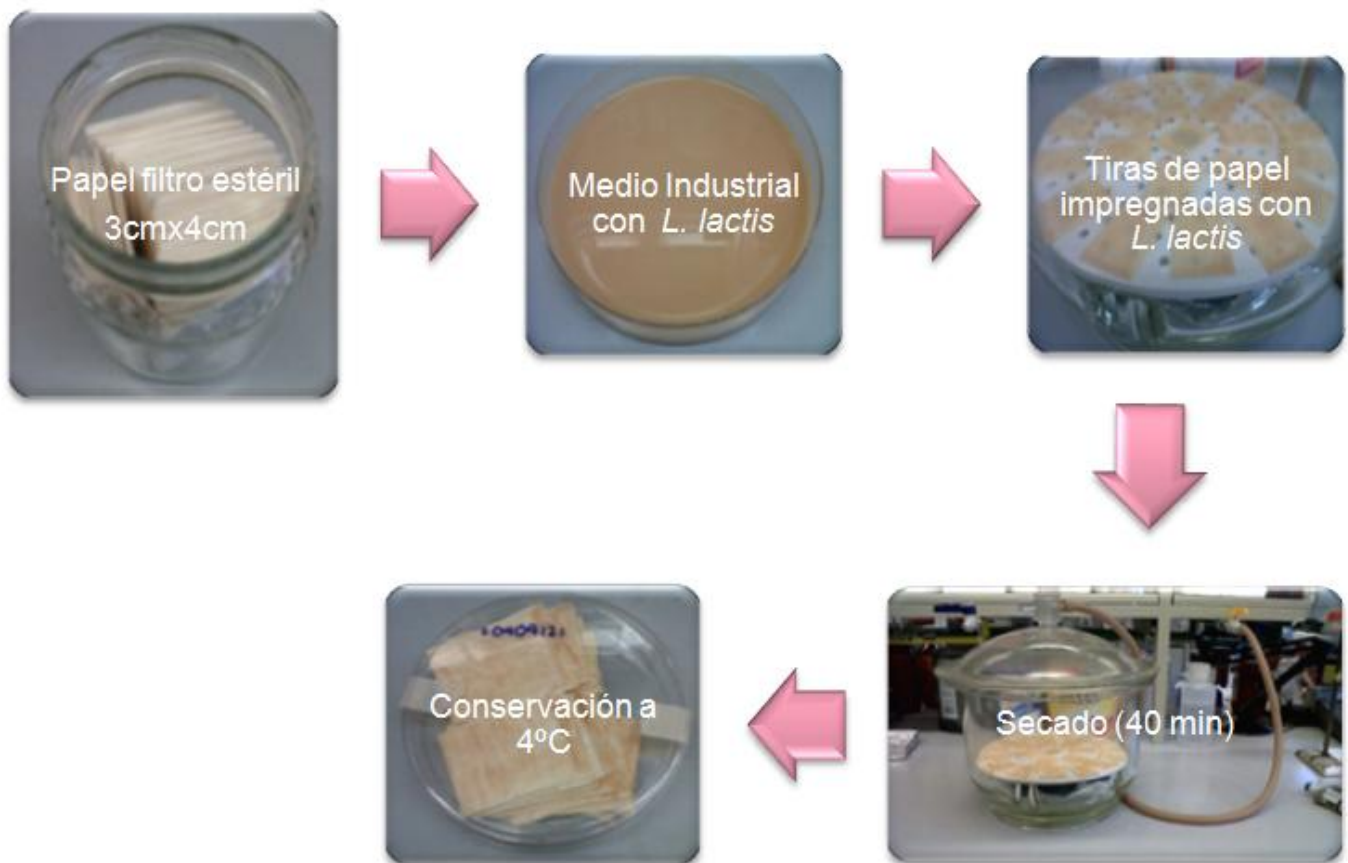


Figura 4. Inmovilización de *Lactococcus lactis ssp. lactis* en celulosa.

4.2.4 Cuantificación de *Lactococcus lactis ssp. lactis* antes y después de la inmovilización

Se sumergieron 2 tiras de papel filtro de 3 cm x 8 cm en un cultivo de *Lactococcus lactis ssp. lactis* (preparado de igual forma que para la inmovilización) posteriormente se cortó a la mitad, se tomó una mitad de cada una de las tiras y se inmovilizaron, como se describe en el apartado anterior, a las mitades restantes (sin inmovilización) se les realizó cuenta en placa, para lo cual las tiras se sumergieron en solución salina estéril agitando durante 30 segundos y se realizaron diluciones hasta 10^{-9} . Las últimas 4 diluciones se sembraron por duplicado en agar APT estéril, se incubaron a 29°C durante 48 horas, transcurrido este tiempo, se realizó la cuenta de las colonias, se obtuvo un promedio y el valor obtenido se multiplicó por el inverso de la dilución efectuada, obteniéndose así, la población microbiana, UFC/tira, presente en las tiras sin inmovilización.

Se realizó lo mismo para las tiras inmovilizadas y por último se comparo la población microbiana, UFC/tira, presente en las tiras inmovilizadas y en las tiras sin inmovilización.

4.2.5 Aplicación del dispositivo a diferentes tipos de leche incubadas a diferentes temperaturas

Se denomina dispositivo a las tiras de papel filtro con *Lactococcus. lactis ssp. lactis* inmovilizadas.

Como se pretende que dicho dispositivo sea comercialmente viable y empleado por cualquier persona se decidió realizar pruebas con marcas de leche comerciales para probar que dicho dispositivo funciona con cualquier leche en un rango de temperaturas de 23°C a 37 °C.

Para esta prueba se utilizaron las 9 leches descritas en el apartado de materiales.

Inicialmente para cada una de las leches se tomó una muestra de 50 mL y se le determino pH, acidez y tiempo de escurrimiento a temperatura ambiente (23°C) (Ver anexo A).

Posteriormente para cada una de las leches se tomaron 6 muestras de 200 mL, a 3 de ellas se les aplicó el dispositivo, una se incubó a 23°C, otra a 29°C y la última a 37°C durante 24 horas. Las 3 restantes se mantuvieron como control (sin dispositivo) aplicando el mismo tiempo y temperaturas de incubación. Transcurridas las 24 horas de incubación a todas las muestras se les determinó pH, acidez y tiempo de escurrimiento.

En la figura 5 se muestra el procedimiento de aplicación del dispositivo en la leche de establo pasteurizada. Esto se realizó con cada una de las leches que se utilizaron.

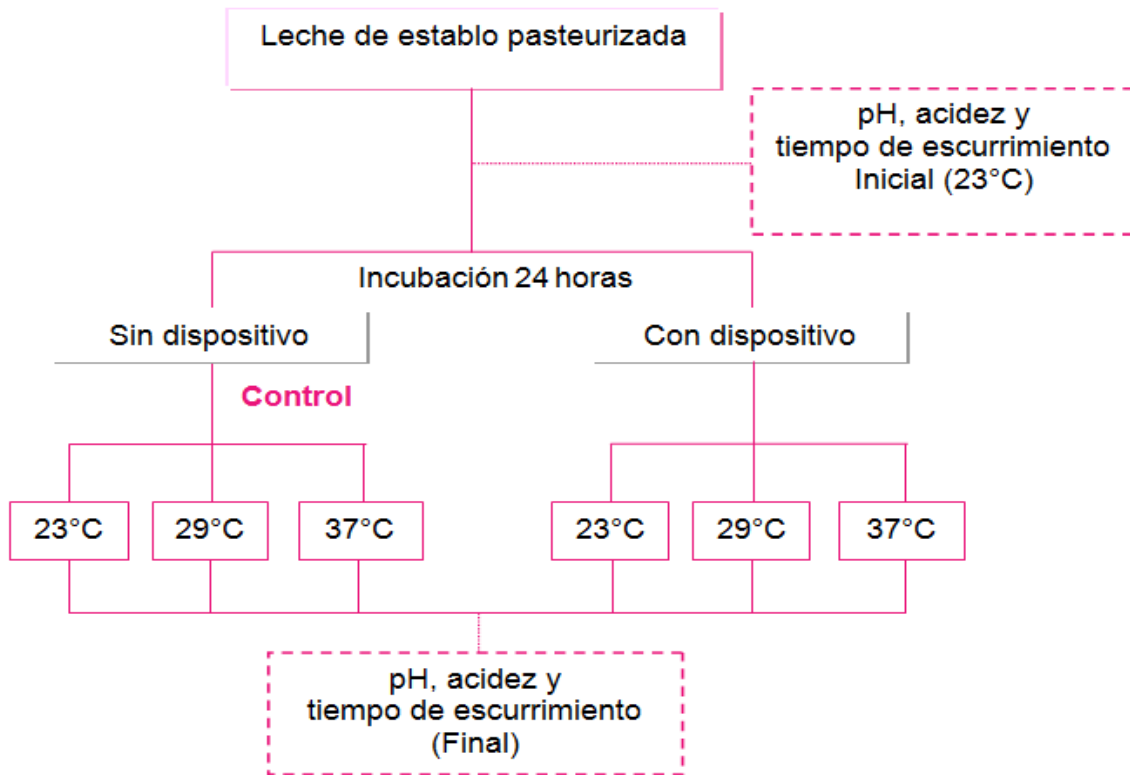


Figura 5. Proceso de aplicación del dispositivo en leche de establo pasteurizada.

4.2.6 Evolución de pH, acidez y viscosidad al aplicar el dispositivo en diferentes tipos de leche a temperatura ambiente

Inicialmente para cada una de las leches se tomó una muestra de 50 mL y se le determinó pH, acidez y viscosidad a temperatura ambiente (23°C)

Posteriormente para cada una de las leches se tomaron 13 muestras de 100 mL (numerándolas del 1 al 13) y se les aplicó el dispositivo, incubándolas a 23°C, a las 2 horas se tomó la muestra 1 y se le determinó pH, acidez y viscosidad, a las 4 horas se tomó la muestra 2 y se le determinó los mismos parámetros que a la muestra 1, a las 6 horas se tomó la muestra 3 y se le determinó los mismos parámetros que a las muestras anteriores y así sucesivamente hasta completar 24 horas utilizando la muestra 12, por último estas determinaciones se realizaron hasta las 30 horas utilizando la muestra 13.

4.2.7 Prueba de preferencia de la bebida tipo yogur

Se realizó una prueba de ordenamiento para determinar la preferencia entre las bebidas tipo yogur elaboradas con la aplicación del dispositivo en tres leches: en polvo (solución en agua al 10%), pasteurizada y ultrapasteurizada de la marca Alpura, esta fue realizada en la Facultad de Química con 100 consumidores (jueces no entrenados).

Las bebidas tipo yogur se prepararon de la siguiente manera:

Se tomaron 25 vasos con 200 mL formulados a partir de leche en polvo y a cada uno se le colocó un dispositivo (elaborado un día antes y conservado a 4°C). Lo anterior se realizó de igual forma para la leche pasteurizada y la ultrapasteurizada. Obteniendo un total de 75 vasos. Todos los vasos se dejaron fermentar durante 25 horas a temperatura ambiente (23°C).

Previo a la degustación, a todos los vasos de las tres bebidas tipo yogur se les determinó su pH y acidez titulable.

Una vez determinado el pH y acidez de las bebidas tipo yogur de cada leche se mezclaron los 25 vasos de las bebidas elaboradas para homogeneizar y obtener 5 L de bebida tipo yogur, se les adiciono un 10% de azúcar refinada, se sirvieron 50 mL en vasos de poliestireno para un total de 100 muestras. Cada vaso se identificó con una clave. A cada evaluador se le proporcionó en una charola una muestra de 50 mL de cada una las 3 bebidas tipo yogur elaboradas, sirviéndose a temperatura ambiente y se le entregó el cuestionario mostrado en la Figura 6.

EVALUACION SENSORIAL BEBIDA TIPO YOGUR

Nombre: _____ **Edad:** _____ **Fecha:** _____

Frente a usted tiene 3 muestras de bebida tipo yogur, pruebe cada una y ordene de acuerdo a su preferencia siendo 1 la de mayor preferencia y 3 la de menor preferencia. Enjuáguese entre cada muestra.

| PREFERENCIA | CLAVE |
|-------------|-------|
| 1 | _____ |
| 2 | _____ |
| 3 | _____ |

De la muestra que eligió como preferida evalúe marcando con una (X) su nivel de agrado.

| | Apariencia | Color | Sabor | Olor | Textura |
|------------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| Muy agradable | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| Agradable | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| Moderadamente agradable | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| Ni agradable ni desagradable | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| Moderadamente desagradable | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| Desagradable | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| Muy desagradable | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |

COMENTARIOS

!!! GRACIAS!!!

Figura 6. Cuestionario empleado para la prueba de preferencia

Para la Prueba de Ordenamiento se analizaron los datos mediante la diferencia de sumas utilizando las Tablas de Newell y McFarlane. (Pedrero et al., 1989)

4.2.8 Influencia del tiempo de almacenamiento en el dispositivo

Para evaluar la influencia del tiempo de almacenamiento de los dispositivos sobre la aceptabilidad de las bebidas tipo yogur por parte de los consumidores (jueces no entrenados) se realizó una prueba triangular. Se probaron dispositivos con 1 día y 6 meses de almacenamiento a 4°C.

Las bebidas tipo yogur se prepararon de la siguiente manera:

Se tomaron 40 vasos con 200 mL de leche entera Alpura Ultrapasteurizada y a cada uno se le colocó un dispositivo almacenado durante 1 día a 4°C. Lo anterior se realizó de igual forma con el dispositivo almacenado durante 6 meses a 4°C.

Todos los vasos se dejaron fermentar durante 25 horas a temperatura ambiente (23°C).

Previo a la degustación, se tomaron al azar 20 vasos de bebida tipo yogur elaboradas con el dispositivo almacenado durante 1 día a 4°C y 20 vasos de bebida tipo yogur elaboradas con el dispositivo almacenado durante 6 meses a 4°C y se les determinó su pH y acidez titulable.

Una vez determinado el pH y acidez de las bebidas tipo yogur, se mezclaron los 40 vasos de bebida elaborada con el dispositivo almacenado durante 1 día a 4°C y por otro lado los 40 vasos de bebida elaborada con el dispositivo almacenado durante 6 meses a 4°C, a cada mezcla se le adicionó un 10% de azúcar refinada, se sirvieron 50 mL en vasos de poliestireno con un total de 150 muestras elaboradas con el dispositivo almacenado durante 1 día a 4°C y 150 muestras elaboradas con el dispositivo almacenado durante 6 meses a 4°C. Para realizar la prueba triangular, cada vaso se identificó con una clave y para evitar sesgos en la evaluación se asignó aleatoriamente el orden de las muestras (AAB, ABA, BAA, ABB, BAB, BBA) en las charolas presentadas al evaluador (Watts et al., 1992), sirviéndose a temperatura ambiente, y se les entregó el cuestionario mostrado en la Figura 7.

EVALUACIÓN SENSORIAL BEBIDA TIPO YOGUR. PRUEBA TRIANGULAR

Nombre: _____ **Edad:** _____

INSTRUCCIONES

Frente a usted tiene 3 muestras de bebida tipo yogur identificadas con una clave, pruebe cada una, enjuagándose con agua entre cada muestra.

Existen 2 muestras iguales y 1 diferente, marque con una X la muestra **DIFERENTE**

| MUESTRAS | |
|----------|--|
| 362 | |
| 622 | |
| 542 | |

COMENTARIOS

!!! GRACIAS!!!

Figura 7. Cuestionario empleado para la prueba triangular

Para evaluar estadísticamente la prueba triangular se realizó una comparación direccionada (prueba binomial de una cola) en donde la probabilidad de acierto al azar es de 1/3 y para el análisis de datos se utilizó la Distribución Chi-cuadrada. Se aplicó la siguiente ecuación:

$$X^2 = \frac{(|X_1 - np| - 0.5)^2}{(np)(1 - p)}$$

Dónde:

- X_1 = Número de aciertos
- n = Número de replicas
- p = Probabilidad de éxito en un ensayo único = 1/3
- q = Probabilidad de falla en un ensayo único = (1-p)
- 0.5 = Factor de corrección por continuidad

* Factor de corrección se aplica sólo para un grado de libertad en el cual los resultados se consignan como "acierto" y "falla"

El resultado se contrastó con las tablas de distribución estadística X^2 a nivel de significancia de 1 % (Pedrero et al, 1989)

5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Nuestra recompensa se encuentra en el esfuerzo y no en el resultado.

Un esfuerzo total es una victoria completa

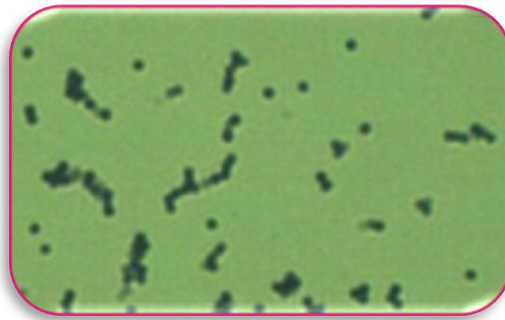
Mahatma Gandhi

(1869-1948)

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Curva de crecimiento

En la figura 1 se observan las características morfológicas de *Lactococcus lactis ssp. lactis* encontrando células ovoides, gram positivas, agrupadas en pares y cadenas cortas. Dichas características concuerdan con lo reportado por Del Castillo et al. (2004) para esta bacteria.



**Figura 1. Tinción Gram
*Lactococcus lactis ssp. lactis***

En la Figura 2 se presenta el crecimiento de *Lactococcus lactis ssp. lactis*, en la que se observa que se alcanzó la fase estacionaria a las 10 horas de incubación del cultivo, presentando una población de 10^8 UFC/mL. Goldhaber (1982) menciona que el máximo crecimiento bacteriano se obtiene alrededor de las 8 a 10 horas, lo cual concuerda con los datos presentados.

De acuerdo a lo reportado por Sigala et al. (2000) la sobrevivencia de las bacterias durante el almacenamiento en refrigeración es independiente de la fase de crecimiento de la que provengan, ya sea la fase exponencial o la estacionaria, sin embargo, el haber utilizado el medio de cultivo de *Lactococcus lactis ssp. lactis* en su fase estacionaria asegura que se ha alcanzado su máximo crecimiento y que no hay cambios significativos de la densidad celular con respecto al tiempo (Negroni, 2009). Esto facilitó obtener la concentración de bacterias necesaria después del secado y durante el almacenamiento.

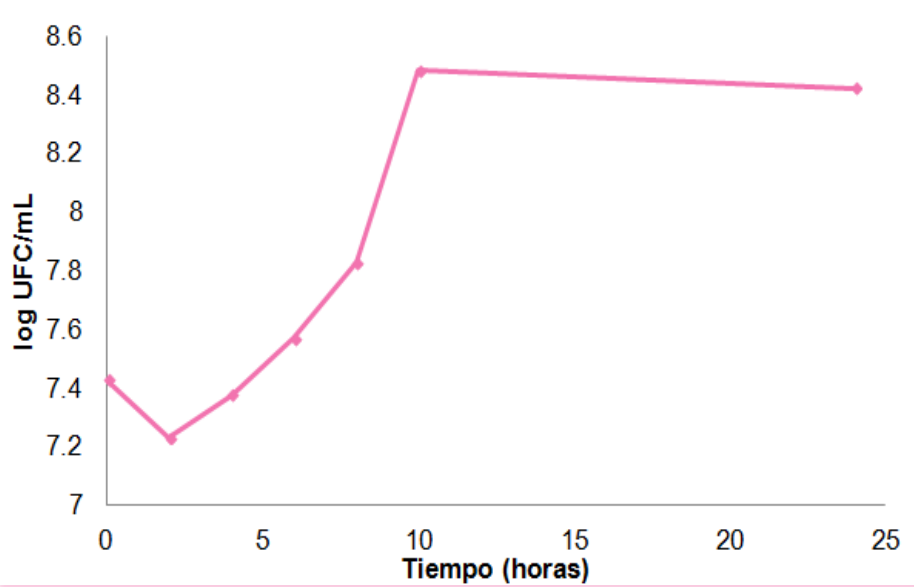


Figura 2. Curva de crecimiento *Lactococcus lactis ssp. lactis* en medio industrial a 29 °C

En la figura 3 se observa el descenso de pH a lo largo del periodo de incubación hasta alcanzar un pH de 4 a las 24 horas.

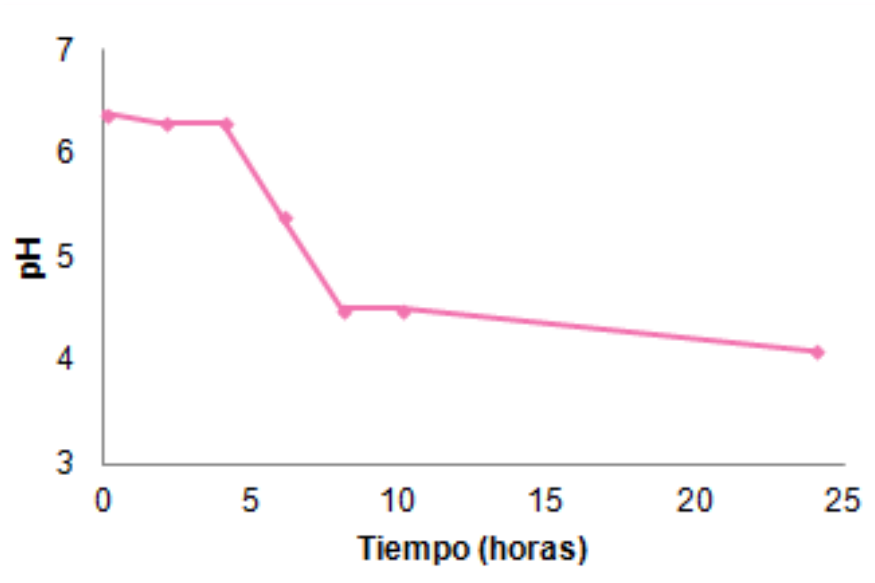


Figura 3. pH de *Lactococcus lactis ssp. lactis* en medio industrial a 29 °C

El pH del medio disminuye, conforme se va dando la producción del ácido láctico, la acidez desarrollada frena la multiplicación de las bacterias lácticas, con lo que

decrece el crecimiento del microorganismo y se detiene la producción de ácido láctico. (Orozco et al., 2003). En el caso de los *Lactococcus* esto sucede cuando se ha producido entre un 0.6 y 0.9% de ácido láctico. (Del Castillo et al., 2004). Es por ello que no es recomendable usar cultivos con más de 24 horas de incubación, ya que lo que buscamos es obtener la mayor concentración de *Lactococcus lactis ssp. lactis* para la elaboración del dispositivo.

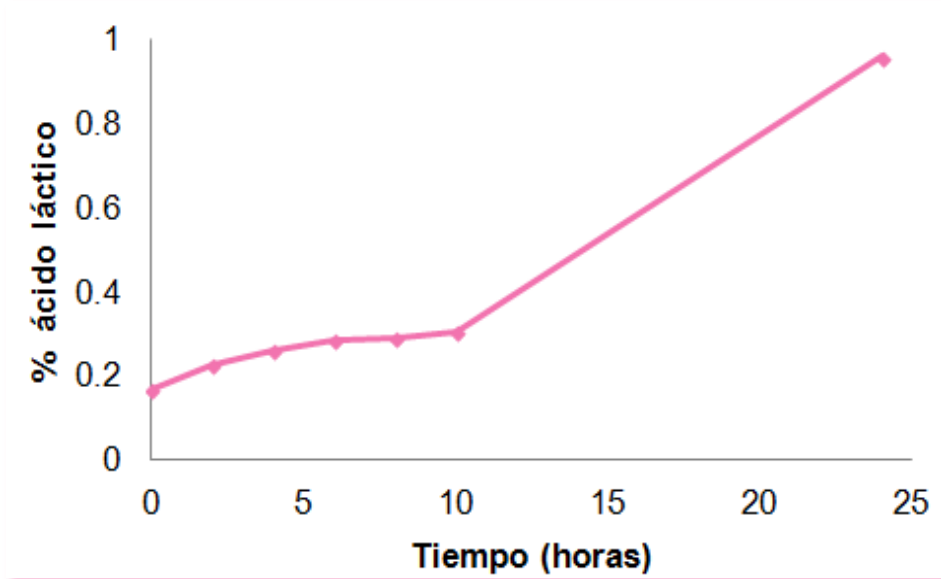


Figura 4. Acidez de *Lactococcus lactis ssp. lactis* en medio industrial a 29 °C

En la figura 4 se observa el cambio de acidez producido por *Lactococcus lactis ssp. lactis* en medio industrial, reportándose a las 24 horas un máximo de 0.957% de ácido láctico, lo cual es un porcentaje mayor al reportado por Parra (2010), quien dice que la acidez final, para las BAL mesófilas (*Lactococcus lactis ssp. cremoris*, *Lactococcus lactis ssp. lactis*, *Lactococcus lactis biovariedad diacetylactis*, *Leuconostoc mesenteroides ssp. cremoris*) con un tiempo de incubación de 18 a 20 horas, es de 0.8% de ácido láctico. Este resultado nos indica que la cepa empleada tiene una buena producción de ácido láctico, por lo tanto al fermentar leche con este dispositivo, se logra obtener la acidez esperada para una leche fermentada, que debe ser de 0.7 a 0.9% de ácido láctico. (García et al. 2004).

Estos resultados nos proporcionaron una referencia para comparar los valores de pH y acidez alcanzados por la bebida elaborada con el dispositivo que se muestran posteriormente.

5.2 Cuantificación de *Lactococcus lactis ssp. lactis* antes y después de la inmovilización

El secado de dichas bacterias, al ser inmovilizadas, podría representar un factor de pérdida de bacterias y de su viabilidad, sin embargo al hacer cuenta en placa del dispositivo después de su secado se encontró que tuvo una disminución de la población microbiana de 1 ciclo logarítmico, ya que el dispositivo sin secado, recién impregnado con las bacterias presentó una cuenta de 1.5×10^9 UFC/tira y el dispositivo seco presentó una cuenta de 7×10^8 UFC/tira se puede observar que a pesar de dicha disminución en la población microbiana el dispositivo aún cuenta con cantidades elevadas de bacterias lácticas. De acuerdo a lo reportado por Montero et al. (2006) la concentración sugerida de BAL está en el rango 10^6 - 10^7 UFC/g o mL en el alimento listo para consumirse, por lo tanto, el dispositivo desarrollado al contener 10^8 UFC/tira es una fuente importante de BAL viables que al desarrollarse en leche llegan a una cuenta de 10^9 UFC/mL en la bebida, lo que supera la concentración sugerida de BAL presente en los productos comerciales para que los consumidores sean beneficiados con las bondades de dichas bacterias.

5.3 Aplicación del dispositivo a diferentes tipos de leche y diferentes temperaturas.

Al utilizar leche de vaca de establo pasteurizada como referencia aseguramos el mínimo procesamiento y una menor modificación en su composición comparado con la leche de marcas comerciales, que son sometidas a diferentes procesos para su industrialización (clarificación, homogeneización, envasado, en algunos casos adición de inhibidores o restos de antibióticos, etc.) que pudieran interferir en la producción de la bebida tipo yogur.

La selección de las leches utilizadas se basó en la estadística de que por cada 10 vasos de leche que se beben diariamente en México, cinco son de Lala, tres de

Alpura y dos del resto de las marcas (Sánchez, 2011), Se eligió Liconsa, por ser la leche que se da en el Programa de Abasto Social de Leche en México a precio subsidiado y por último leche Nido, ya que es la marca de leche en polvo más reconocida y consumida.

De acuerdo a los valores iniciales de pH presentados, se puede afirmar que las leches que se utilizaron para la elaboración de la bebida tipo yogur aplicando el dispositivo eran leche entera fresca de buena calidad, ya que los reportados para leche fresca de buena calidad oscilan entre 6.6 y 6.8 (Romero, 2004)

En el cuadro 1, podemos ver que en las leches control (sin dispositivo) incubadas a 23°C no se observan cambios en cuanto al pH, sin embargo, tanto en el Control incubado a 29°C y el incubado a 37°C se observa un ligero descenso de pH para todas las leches y el menor en las leches ultrapasteurizadas (UHT). Si bien, los tratamientos que recibe la leche como el calentamiento o la pasteurización destruyen bacterias patógenas, no liberan por completo a la leche de los microorganismos causantes de la descomposición (FDA, 2012). En climas tropicales, después de uno o dos días a temperatura ambiente la leche no resulta óptima para el consumo humano, ya que la leche es un alimento muy susceptible de deterioro. Su composición resulta especialmente apta para el desarrollo de microorganismos por su alto contenido de humedad, su abundante suministro de nutrimentos combinados con un grado de acidez neutral presentando pH aproximado de 6.7 (Aguhob et al., 1998). En el mismo cuadro 1 se observa que el control de leche Liconsa pasteurizada incubado a 29°C presenta un pH de 4.73 y las leches control de Alpura y Liconsa pasteurizada incubadas a 37°C que presentan un pH de 4.28 y 4.67, respectivamente, presentan un gran descenso de pH, con lo que se comprueba que las leches pasteurizadas tienen una mayor carga microbiana inicial que las leches UHT y las en polvo, por lo que se favorece su desarrollo al estar incubadas a temperaturas elevadas.

En el cuadro 1 observamos que después de 24 horas de haber aplicado el dispositivo todas las marcas de leche disminuyeron su pH como se esperaba, debido a la actividad de *Lactococcus lactis ssp. lactis*. El pH esperado por la

actividad de bacterias lácticas oscila entre 4 y 4.5 (Romero et al., 2004). Se observa que a la temperatura de 29°C se obtuvo descenso de pH muy cercano a 4 en todas las leches, lo que concuerda con lo esperado, esto es debido a que esta es la temperatura óptima de crecimiento de *Lactococcus lactis ssp. lactis*, sin embargo las incubadas a la temperatura ambiente (23 °C) y a 37 °C presentaron valores de pH en un rango de 4.24 a 4.78 estos valores también son cercanos a los obtenidos a la temperatura óptima de crecimiento de dichas bacterias, por lo tanto se observa que dichas bacterias se encuentran metabólicamente activas.

Cuadro 1. pH de las bebidas tipo yogur a diferentes temperaturas

| Leche | | Establo | En polvo | | Pasteurizadas | | | Ultra pasteurizadas | | |
|---------------------|--------------|---------|----------|--------|---------------|--------|---------|---------------------|--------|---------|
| | | P. | Nido | Alpura | Lala | Alpura | Liconsa | Lala | Alpura | Liconsa |
| Inicial (23°C) | | 6.74 | 6.76 | 6.81 | 6.83 | 6.78 | 6.72 | 6.64 | 6.68 | 6.67 |
| Final (24 horas) | Control 23°C | 6.74 | 6.76 | 6.81 | 6.83 | 6.78 | 6.72 | 6.64 | 6.68 | 6.67 |
| | Disp. 23°C | 4.78 | 4.46 | 4.50 | 4.59 | 4.65 | 4.69 | 4.41 | 4.77 | 4.63 |
| | Control 29°C | 5.85 | 6.47 | 6.56 | 6.80 | 6.34 | 4.73 | 6.57 | 6.64 | 5.94 |
| | Disp. 29°C | 4.29 | 4.28 | 4.24 | 4.28 | 4.28 | 4.27 | 4.29 | 4.28 | 4.32 |
| | Control 37°C | 5.48 | 6.32 | 6.43 | 6.78 | 4.28 | 4.67 | 6.42 | 6.51 | 5.70 |
| | Disp. 37°C | 4.24 | 4.38 | 4.34 | 4.25 | 4.39 | 4.50 | 4.24 | 4.36 | 4.38 |

El periodo de acidificación en la leche es la etapa en la que el crecimiento bacteriano llega a su más alta concentración, siendo los productos de ácido láctico los que predominan. La producción de ácido láctico se efectúa a partir de la lactosa y llega a formar hasta cerca o más de un 1% de acidez titulable; a esta concentración el ácido inhibe el crecimiento de sus productores, entre otros cambios de menor importancia (Revilla, 1982).

En el cuadro 2 podemos observar que los valores iniciales de acidez de todas las marcas concuerdan con los valores reportados cuando la leche es titulada con NaOH 0.1 N usando fenolftaleína como indicador que da una acidez equivalente a 0.10 a 0.26 % de ácido láctico cuyo promedio se encuentra entre 0.14 y 0.18 % de acidez titulable expresada como ácido láctico. (Revilla, 1982). Sin embargo Alpura pasteurizada, Liconsa pasteurizada y las UTH (Lala, Alpura y Liconsa) presentan los valores más elevados de acidez inicial que se salen del promedio, pero se

encuentran dentro del límite de aceptación, que va de 0.18 a 0.22 % de ácido láctico (Revilla, 1982).

La leche fresca no contiene ácido láctico, sin embargo da una reacción debida al ácido carbónico que se forma a partir del anhídrido carbónico (0.01 a 0.03 % acidez), los fosfatos (0.01 a 0.02% acidez), citratos (0.05 a 0.08% acidez) y proteínas 0.07 a 0.10 % acidez), conocida como acidez natural. (Revilla, 1982).

En los controles incubados a temperatura ambiente no se muestra acidificación y en los incubados a las temperaturas de 29 °C y 37 °C se observa una mínima acidificación debida a la flora natural de la leche. Nos encontramos con comportamientos muy diferentes en la leche Alpura y Liconsa Pasteurizada a 37°C, ya que estas mostraron un porcentaje de acidez bastante elevado de 0.813 y 0.697 % ácido láctico, respectivamente, lo que nos indica que posiblemente estas leches tenían una carga elevada de bacterias, ya que además se observa que su acidez inicial fue ligeramente elevada. Esto también se presenta en la leche Liconsa pasteurizada incubada a 29 °C, lo que nos muestra que estas leches en particular podrían tener la carga inicial más elevada de bacterias.

Se observa que hay más variación de la acidez en las diferentes marcas de leche que en los valores obtenidos de pH, la cantidad de ácido láctico producido por las bacterias es muy variable dependiendo de la marca de leche y el tratamiento térmico que presentan, sin embargo los nutrientes del medio que fueron desecados junto con *Lactococcus lactis ssp. lactis* al momento de la inmovilización le sirven a las bacterias lácticas para que una vez hidratados sean empleados como sustrato principal para que puedan desarrollarse y posteriormente fermentar la leche.

La acidez presentada en todas las leches a las que se les aplicó el dispositivo y que se incubaron a 23, 29 y 37 °C se encuentra en un rango de 0.5 a 0.9% de ácido láctico, sin embargo, las que se incubaron a 23 °C presentan una producción de 0.51 a 0.86 % de ácido láctico, las que se incubaron a 29 °C de 0.66 a 0.88% de ácido láctico y las que se incubaron a 37°C de 0.62 a 0.97% de ácido láctico.

Esto es debido a que la temperatura es un factor determinante, para que se desarrollen de manera óptima las bacterias, en este caso, *Lactococcus lactis ssp. lactis*, al ser una BAL mesófila, tiene una temperatura óptima de 29 °C y para el caso de las que se incubaron a 37 °C se debe a que al estar a una temperatura más elevada, alcanzan más rápido la fase de acidificación, produciendo una mayor cantidad de ácido láctico.

En general las leches en polvo, tanto Nido como Alpura presentaron el menor porcentaje de acidez (0.5 % ácido láctico) incubadas a 23 °C.

Cuadro 2. Acidez (% ácido láctico) de las bebidas tipo yogur a diferentes temperaturas

| Leche | | Establo P. | En polvo | | Pasteurizadas | | | Ultra pasteurizadas | | |
|--------------------|--------------|---------------|----------|--------|---------------|--------|---------|---------------------|--------|---------|
| | | | Nido | Alpura | Lala | Alpura | Liconsa | Lala | Alpura | Liconsa |
| Inicial (23°C) | | 0.154 | 0.174 | 0.125 | 0.183 | 0.210 | 0.203 | 0.214 | 0.222 | 0.213 |
| Final (24horas) | Control 23°C | 0.154 | 0.174 | 0.125 | 0.183 | 0.210 | 0.203 | 0.214 | 0.222 | 0.213 |
| | Disp. 23°C | 0.735 | 0.555 | 0.505 | 0.698 | 0.681 | 0.748 | 0.734 | 0.705 | 0.858 |
| | Control 29°C | 0.319 | 0.213 | 0.280 | 0.213 | 0.309 | 0.726 | 0.222 | 0.203 | 0.222 |
| | Disp. 29°C | 0.784 | 0.656 | 0.673 | 0.875 | 0.883 | 0.866 | 0.796 | 0.841 | 0.858 |
| | Control 37°C | 0.464 | 0.232 | 0.251 | 0.203 | 0.813 | 0.697 | 0.232 | 0.222 | 0.251 |
| | Disp. 37°C | 0.823 | 0.644 | 0.617 | 0.967 | 0.859 | 0.904 | 0.779 | 0.752 | 0.761 |

Después de la aplicación del dispositivo, todas las leches presentaron valores característicos de pH y producción de acidez generados por las BAL. El pH más que la cantidad de ácido láctico, determina los cambios en la conformación de las proteínas y la capacidad de supervivencia de los microorganismos que pueden crecer en la leche, así como la actividad de las enzimas. La relación entre el pH, acidez y crecimiento de bacterias lácticas no es directa a pesar de que son factores estrechamente ligados. Esto es porque en el pH de la leche el ácido no está totalmente disociado, su pKa es de 3.9. La acidez mide todo el ácido, pero el pH sólo la cantidad que está disociada. También es porque la leche posee un efecto buffer debido a las proteínas y a las sales, esto se traduce en que un aumento de ácido no corresponde con un descenso paralelo de pH. La velocidad

de acidificación es proporcional al número real de microorganismos. (Romero et al., 2004).

En el cuadro 3 se observa el tiempo de escurrimiento en segundos de las bebidas elaboradas con las distintas leches. La formación del coágulo durante la elaboración del yogur, obedece al hecho de que a un pH cercano a 4.6 las micelas de caseína de la leche coalescen en forma de cadenas o conglomerados para formar una estructura tridimensional en la que queda atrapado el suero. A pH altos (>5.4) las micelas de caseína mantienen su estado nativo (100-250 nm), pero cuando el pH alcanza valores de 5.1, las partículas sufren disociaciones parciales formando subpartículas de 30 a 40 nm, y cuando alcanza un pH del orden de 4.8 a 4.3 las partículas de caseína forman grandes conglomerados que atrapan la grasa y el suero y son responsables de una alta viscosidad (Ramírez-Sucre et al, 2013). Se ha reportado que las propiedades físicas del coágulo dependen en gran medida de la proporción de caseína a proteínas del suero; las relaciones óptimas encontradas por algunos autores son del orden de 2.89 a 3.4 partes de caseína por 1 parte de otras proteínas. (García et al., 2004)

En el cuadro 3, vemos que en las leches control incubadas a 23 °C durante 24 horas no hubo cambio en el tiempo de escurrimiento. En los controles incubados a 29°C y 37°C se presentó un ligero aumento en el tiempo de escurrimiento y separación del suero (sinéresis) debido a la acidificación producida por la descomposición de la leche que se presenta al someter la leche a altas temperaturas.

Las 3 marcas de leche UHT a las que se les aplicó el dispositivo y se incubaron a 23°C, 29°C y 37°C presentaron la formación de un coágulo con apariencia de flan, que al ser homogeneizado presentaba una textura espesa, esto se puede observar con los valores de tiempo de escurrimiento mostrados en el cuadro 3, en el que se observa que los tiempos de escurrimiento para las leches UHT son los más elevados, debido al tratamiento térmico al que son sometidas, ya que la bacteria se desarrolla sin ningún tipo de competencia, por otro lado se puede deber a que el grado de desnaturalización de las proteínas del suero puede

utilizarse como índice de la intensidad del calentamiento aplicado, ya que una buena estabilidad frente a la coagulación térmica y la obtención de una gran viscosidad requiere que la leche sea sometida a un tratamiento térmico intenso. (Walstra, 2001).

Las leches pasteurizadas a las que se les aplicó el dispositivo y se incubaron a 23°C, 29°C y 37°C de igual forma que las UHT presentan un tiempo de escurrimiento elevado, sin embargo presentan una consistencia menos espesa que las UHT esto puede deberse a que las leches UHT al ser sometidas a un tratamiento térmico mayor se ven aún más favorecidas. Si la leche no se calienta el producto prácticamente no incrementa su viscosidad, ya que son esenciales las interacciones entre las micelas de caseína y las proteínas del suero, particularmente la α -lactoalbúmina, para lo cual es fundamental un tratamiento térmico considerable. (García et al., 2004).

Las leches en polvo a las que se les aplicó el dispositivo y se incubaron a 23°C, 29°C y 37°C presentaron el menor tiempo de escurrimiento comparadas con las demás leches, esto puede deberse a un calentamiento insuficiente durante la elaboración de la leche en polvo, que resulta en un yogur con cuerpo débil. (García et al., 2004). Esto puede deberse a que en el tratamiento térmico de la leche en polvo, la concentración, y/o el secado de las gotitas de leche se podría producir la desnaturalización de las proteínas del suero, sin embargo las condiciones de desecación no suelen causar una extensa desnaturalización térmica. El grado de desnaturalización proteínica es un importante aspecto de la calidad, muy relacionado con el uso al que se destina la leche en polvo. Cuando el producto reconstituido va a emplearse para la elaboración de queso, la leche en polvo debe haber sufrido la mínima desnaturalización, de forma que mantenga su aptitud para la coagulación; por el contrario en las leches infantiles, lo que interesa es que la leche presente baja coagulabilidad. (Walstra, 2001).

Se ha reportado que el proceso térmico más conveniente en términos de la calidad de la consistencia yogur es el de alta temperatura por corto tiempo; por ejemplo a 98°C, 1.87 minutos; bajo estas condiciones se presenta la mínima sinéresis. En

procesos lentos (85°C, 10 a 40 minutos) se obtiene la mayor firmeza y viscosidad, pero una pobre retención de agua y textura granular. (García et al., 2004).

Cuadro 3. Tiempo de escurrimiento (segundos) de las bebidas tipo yogur a diferentes temperaturas

| Leche | | Establo | En polvo | | Pasteurizadas | | | Ultra pasteurizadas | | |
|--------------------|--------------|---------|----------|--------|---------------|--------|---------|---------------------|--------|---------|
| | | P. | Nido | Alpura | Lala | Alpura | Liconsa | Lala | Alpura | Liconsa |
| Inicial (23°C) | | 5.7 | 5.2 | 5.3 | 5.2 | 5.7 | 5.8 | 5.3 | 5.9 | 5.9 |
| Final (24 hrs.) | Control 23°C | 5.7 | 5.2 | 5.3 | 5.2 | 5.7 | 5.8 | 5.3 | 5.9 | 5.9 |
| | Disp. 23°C | 7.9 | 7.7 | 7.6 | 9.5 | 7.9 | 9.7 | 8.8 | 9.8 | 8.1 |
| | Control 29°C | 5.7 | 5.2 | 5.4 | 5.4 | 5.9 | 7.3 | 5.8 | 6.1 | 6.3 |
| | Disp. 29°C | 9.7 | 9.2 | 9.8 | 10.3 | 8.9 | 9.1 | 10.5 | 17.9 | 15.4 |
| | Control 37°C | 6.3 | 6.1 | 6.5 | 5.4 | 6.2 | 5.9 | 5.8 | 6.3 | 6.4 |
| | Disp. 37°C | 7.1 | 11.1 | 10.9 | 6.8 | 6.9 | 6.9 | 11.5 | 18.4 | 18.9 |

Se observa que a la temperatura óptima de *Lactococcus lactis ssp. lactis* (29°C), todas las leches después de aplicarles el dispositivo, muestran las mejores características, en pH, acidez y tiempo de escurrimiento, esto se debe a que las bacterias estando en sus condiciones óptimas son capaces de fermentar la leche transformando la lactosa en ácido láctico produciendo una disminución del pH, una coagulación de la leche y un sabor ácido junto con componentes secundarios del metabolismo que aportan el aroma (Montero et al., 2006)

Con los resultados obtenidos es claro que el dispositivo funciona adecuadamente tanto a 23°C como a 37°C, esto es debido a que *Lactococcus lactis ssp. lactis* es un BAL mesófila, por lo tanto puede desarrollarse en un rango de temperatura de 10 a 40°C con una temperatura óptima cercana a 30°C (Morais, 2004) Sin embargo mientras mayor sea la diferencia con la temperatura óptima y menor sea la cantidad de inóculo agregado mayor será el tiempo de fermentación (Gonzales, 2006).

5.4 Evolución de pH, acidez y viscosidad al aplicar el dispositivo en diferentes tipos de leche a temperatura ambiente

Evolución de pH

En general todas las leches presentaron el mismo comportamiento en cuanto al descenso de pH debido a la aplicación del dispositivo a temperatura ambiente (23°C). En la figura 5 se muestra el descenso de pH en todas las leches a las que se les aplicó el dispositivo.

Corrieut, et al. (2002) indica que en la preparación de las leches fermentadas, el tiempo de la fermentación para alcanzar un pH de 4.5 es de aproximadamente 20 horas, que es similar al tiempo que tomaron las leches en alcanzar este valor de pH, bajo las condiciones de este estudio.

Se observa que la leche de establo pasteurizada, fue la que tardó más en bajar el pH, esto se puede deber a que ésta leche no es sometida a los tratamientos que se les dan a las leches de las marcas comerciales para su industrialización, como es el caso particular de la homogeneización, ya que este proceso al reducir el tamaño de los glóbulos de grasa, evita la separación de la nata durante el almacenamiento o la elaboración de leches fermentadas y mejora la estabilidad de los productos fermentados (Cruz, 2008)

Las leches pasteurizadas (Lala, Alpura y Liconsa), UHT (Lala, Alpura y Liconsa) y las en polvo (Nido y Alpura) alrededor de las 18 horas de incubación muestran un pH menor de 5 y a las 24 horas presentan pH de 4.5 manteniéndose constante. Esto resultados coinciden con lo reportado por Morais (2004) en su tesis de doctorado "*Estudio de Adecuación de Cepas Lácticas Autóctonas aisladas de leche cruda de oveja guirra para la elaboración de queso*" en la que las 35 cepas de *Lactococcus lactis ssp. lactis* que aisló, disminuyeron el pH hasta valores inferiores de 5 después de 24 horas de incubación a 30 °C.

Evolución de la acidez

En la Figura 6 se observa el incremento en la acidez de todas las leches después de adicionar el dispositivo; el promedio de acidez alcanzada a las 24 horas es de 0.95 % para leches UHT, 0.9% para pasteurizadas, 0.7% para la leche de establo pasteurizada y por último 0.68% para las leches en polvo. Estos resultados concuerdan con los valores de acidez alcanzados por una bebida fermentada, que son de 0.7-0.9 % de ácido láctico (García et al., 2004).

Evolución de la viscosidad

Debido al descenso del pH después de adicionar el dispositivo a las leches se van dando cambios en la textura, dichos cambios se deben a la formación de un coágulo delicado y firme que se genera al llegar a un pH de entre 4.8 y 4.3 ya que las partículas de caseína de la leche forman grandes conglomerados que atrapan la grasa y el suero, estos son responsables de las altas viscosidades (García et al., 2004)

La coagulación se realiza por la acidificación de la leche, el ácido actúa sobre las micelas (partículas que se hallan en suspensión coloidal y formadas por las caseínas en forma de fosfocaseinatos de calcio). Esto se efectúa por la desmineralización que provoca el ácido sobre la micela, el comienzo de la coagulación ocurre a pH de 5.2 a 21°C, la caseína lo hace a 4.5. Si la acidificación es lenta y homogénea se favorece la formación del gel láctico y de esta forma no se experimenta sinéresis. (Paniagua, 2008)

Al inicio del presente trabajo este fenómeno se determinaba midiendo el tiempo de escurrimiento de la bebida tipo yogur, pero esta determinación implicaba una posterior validación y mayor tiempo ya que no es una medida convencional, por lo tanto se decidió continuar el trabajo experimental determinando la viscosidad utilizando el viscosímetro de Brookfield, ya que es de manejo rápido y está indicado cuando se desea mayor precisión. (Alais, 2003)

Transcurridas 24 horas después de aplicar el dispositivo en las leches se obtuvo para la leche Nido, Alpura en polvo y establo pasteurizada un líquido suave y

viscoso, para las leches pasteurizadas (Lala, Alpura y Liconsa) y ultrapasteurizadas (Lala, Alpura y Liconsa), se obtuvo un gel delicado, de textura firme y uniforme.

En la figura 7 se puede ver el aumento de la viscosidad en todas las leches a las que se les aplicó el dispositivo, se observa que las leches ultrapasteurizadas (Lala, Alpura y Liconsa) son las que presentan la mayor viscosidad, seguidas por las pasteurizadas (Lala, Alpura y Liconsa), Alpura en polvo, Nido y finalmente leche de establo pasteurizada. Esto se debe a que en la leche tratada térmicamente, las micelas de caseína aumentan de tamaño y forman una matriz reticular que determina una distribución continua de la proteína en toda la bebida, quedando la fracción acuosa retenida en la red formada. La consecuencia es la formación de un coágulo firme, menos susceptible a la sinéresis. (Del Castillo et al., 2004)

El tratamiento térmico es un punto clave en la obtención de un coágulo firme. Las caseínas son termoestables, pero las proteínas del lactosuero se desnaturalizan a 65°C, a temperaturas mayores a 80°C se produce la unión entre β -lactoglobulina y κ -caseína, presente en la micela de caseína. Estos hechos determinan el aumento de las propiedades hidrofílicas de las proteínas de la leche y la formación de la matriz reticular. (Del Castillo et al., 2004)

Un calentamiento insuficiente puede resultar en una bebida con cuerpo débil (García et al., 2004) como se observa en el caso de la leche de establo pasteurizada, que es la bebida que presenta menos cuerpo y viscosidad, ya que este sufrió una pasteurización lenta (65°C durante 20 minutos).

En el caso de las leches en polvo, Nido y Alpura, que presentaron baja viscosidad, se puede deber a que al ser leches infantiles lo que interesa es que la leche presente baja coagulabilidad, por lo que las condiciones de desecación no suelen causar una extensa desnaturalización térmica ya que el grado de desnaturalización proteínica es un importante aspecto de la calidad, muy relacionado con el uso al que se destina la leche en polvo. (Walstra, 2001).

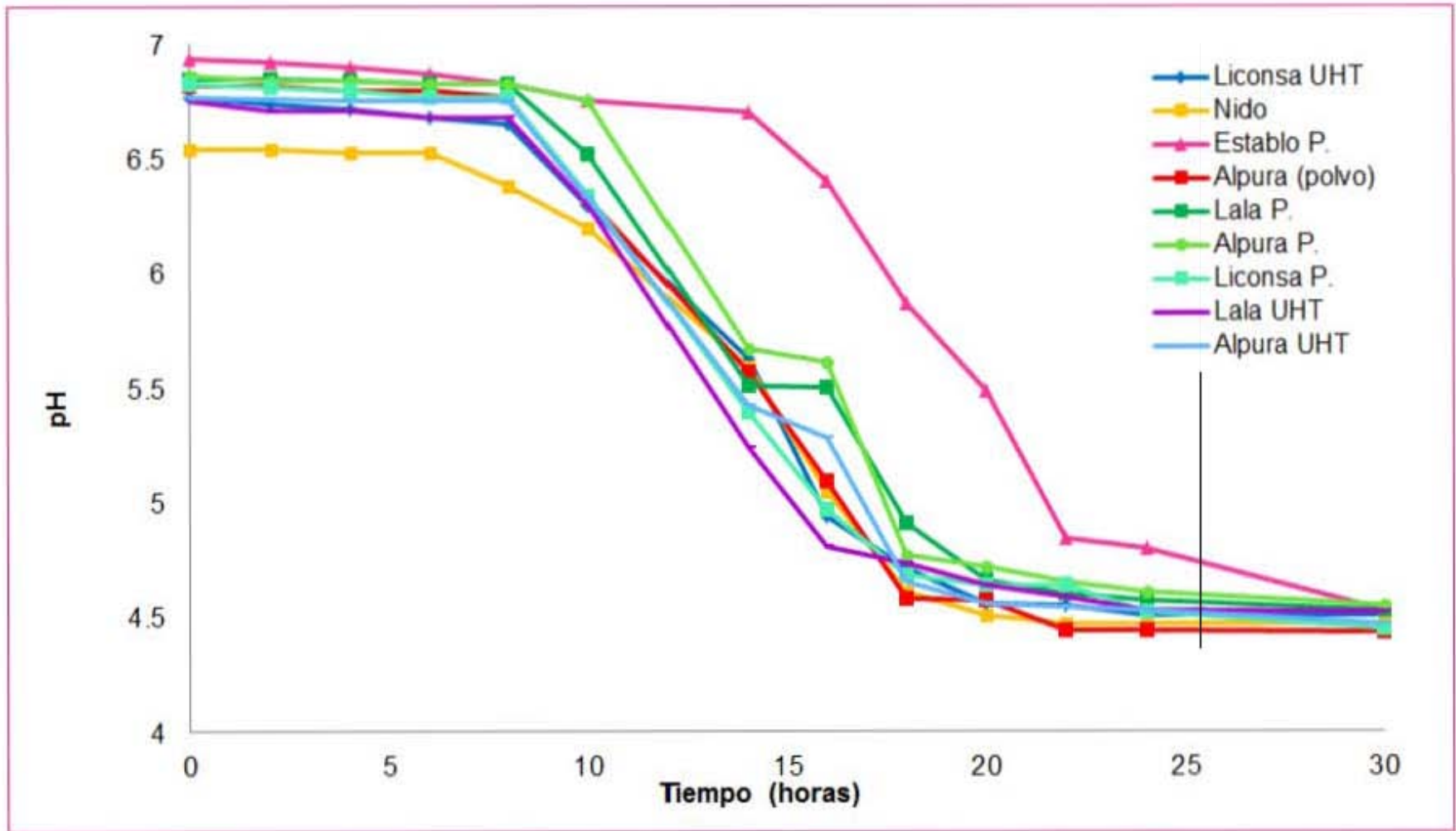


Figura 5. Evolución del pH en Diferentes tipos de Leche con dispositivo

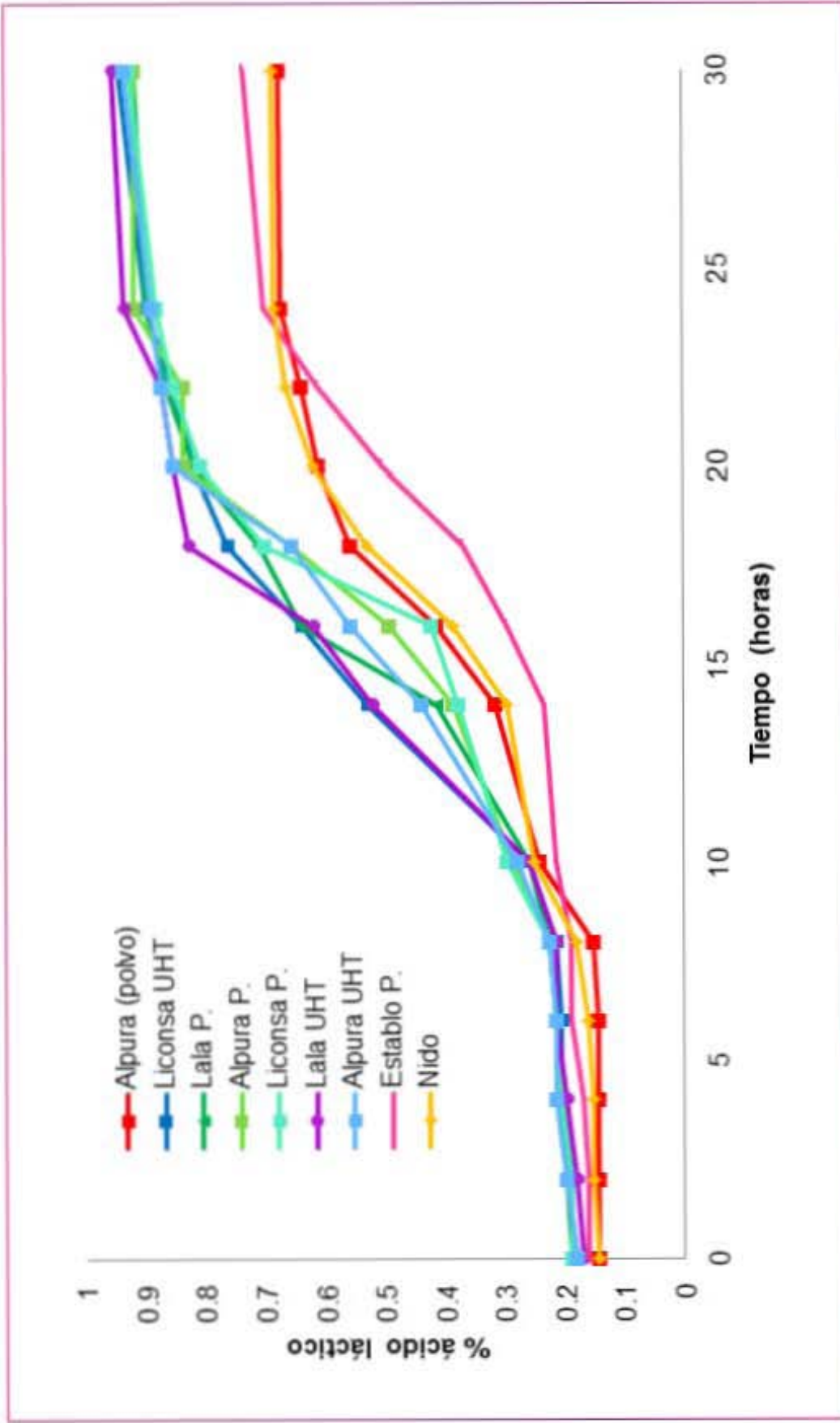


Figura 6. Evolución de la Acidez en Diferentes tipos de Leche con dispositivo

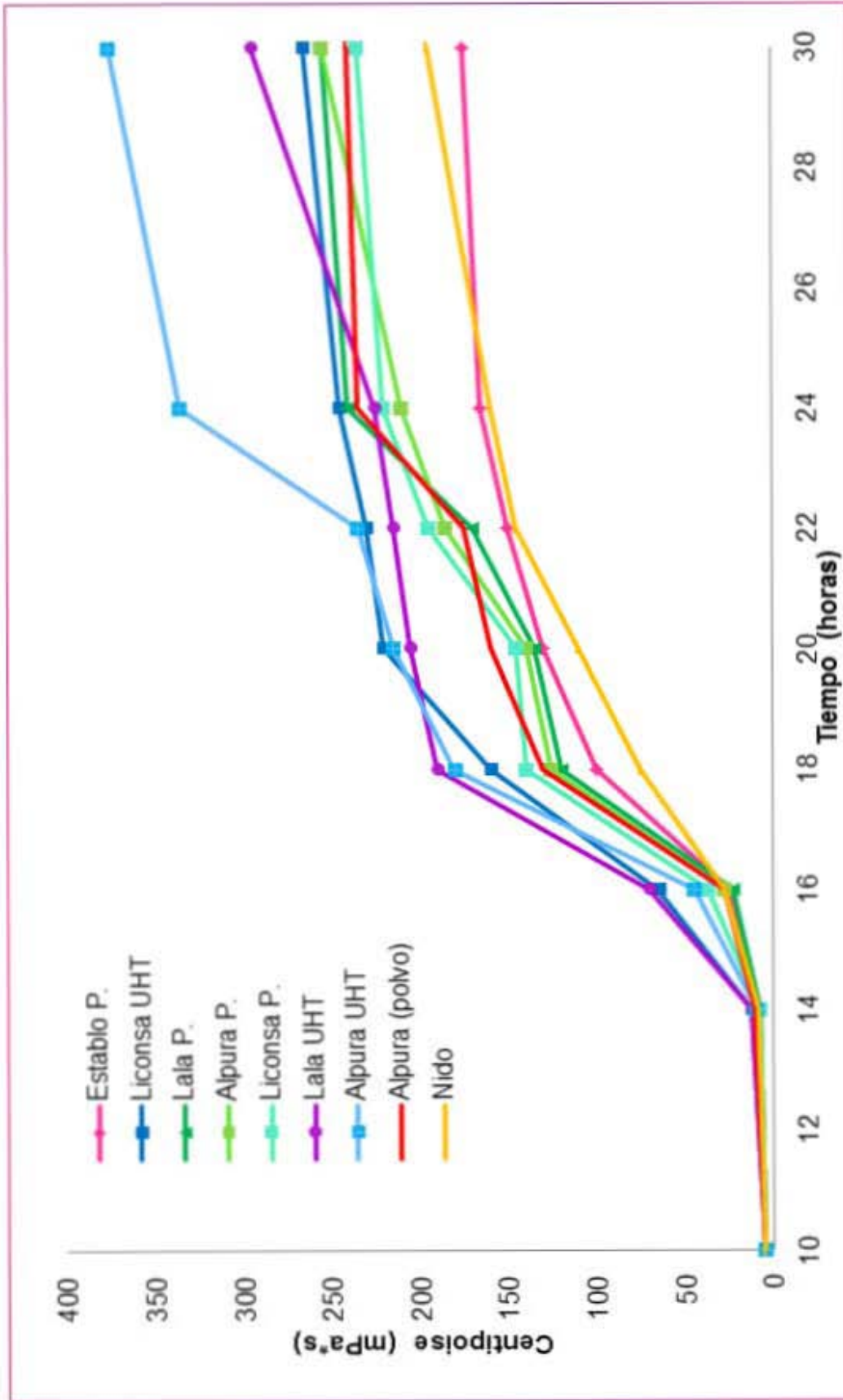


Figura 7. Evolución de la Viscosidad en Diferentes tipos de Leche con dispositivo

5.5 Prueba de preferencia de la bebida tipo yogur.

En el cuadro 4 se registraron el pH y acidez obtenidos a las 25 horas de incubación de las bebidas fermentadas elaboradas con la aplicación del dispositivo en 3 tipos de leche; UHT, pasteurizada y en polvo de la marca Alpura. En general, se observó que las leches con el mismo tratamiento térmico muestran el mismo comportamiento, y al elegir leches con diferente tratamiento de la misma marca, se descarta la interferencia de otra variable en la prueba.

Se observa que las bebidas fermentadas de leche UHT y pasteurizada llegan a un pH promedio menor a 4.5 y la de leche en polvo llega a un pH de 4.67, estos valores de pH son aceptables para las bebidas fermentadas.

En cuanto a la acidez promedio producida, para las leches UHT y pasteurizadas (0.76 y 0.71% ácido láctico, respectivamente) es mayor que para la leche en polvo (0.54 % ácido láctico). Desde aquí observamos que hay diferencia entre las muestras, pero con la prueba de ordenamiento, para determinar la preferencia, lo que se pretende es verificar si los consumidores encuentran esta diferencia y saber cuál de las 3 es la preferida.

Cuadro 4. pH y acidez de las leches fermentadas con el dispositivo (25 horas) a temperatura ambiente para realizar la prueba de preferencia

| Muestra | UHT | | Pasteurizada | | Polvo | |
|-----------------|-------------|--------------|--------------|---------------|-------------|----------------|
| | pH | Acidez | pH | Acidez | pH | Acidez |
| 1 | 4.47 | 0.705 | 4.61 | 0.712 | 4.69 | 0.522 |
| 2 | 4.48 | 0.688 | 4.59 | 0.605 | 4.69 | 0.512 |
| 3 | 4.42 | 0.783 | 4.48 | 0.721 | 4.69 | 0.503 |
| 4 | 4.41 | 0.736 | 4.45 | 0.74 | 4.65 | 0.579 |
| 5 | 4.44 | 0.755 | 4.49 | 0.693 | 4.69 | 0.484 |
| 6 | 4.41 | 0.717 | 4.49 | 0.712 | 4.65 | 0.569 |
| 7 | 4.48 | 0.788 | 4.48 | 0.693 | 4.67 | 0.588 |
| 8 | 4.48 | 0.798 | 4.48 | 0.721 | 4.65 | 0.569 |
| 9 | 4.4 | 0.717 | 4.47 | 0.693 | 4.69 | 0.503 |
| 10 | 4.44 | 0.755 | 4.49 | 0.712 | 4.68 | 0.531 |
| 11 | 4.43 | 0.783 | 4.48 | 0.721 | 4.65 | 0.579 |
| 12 | 4.45 | 0.755 | 4.46 | 0.74 | 4.69 | 0.503 |
| 13 | 4.44 | 0.783 | 4.49 | 0.702 | 4.69 | 0.512 |
| 14 | 4.46 | 0.755 | 4.48 | 0.693 | 4.67 | 0.588 |
| 15 | 4.47 | 0.764 | 4.47 | 0.721 | 4.68 | 0.56 |
| 16 | 4.41 | 0.717 | 4.48 | 0.702 | 4.68 | 0.541 |
| 17 | 4.42 | 0.773 | 4.46 | 0.74 | 4.69 | 0.512 |
| 18 | 4.42 | 0.736 | 4.49 | 0.712 | 4.68 | 0.569 |
| 19 | 4.43 | 0.783 | 4.49 | 0.702 | 4.68 | 0.56 |
| 20 | 4.44 | 0.755 | 4.49 | 0.693 | 4.69 | 0.522 |
| 21 | 4.41 | 0.788 | 4.47 | 0.721 | 4.67 | 0.569 |
| 22 | 4.43 | 0.764 | 4.51 | 0.712 | 4.67 | 0.588 |
| 23 | 4.44 | 0.755 | 4.48 | 0.702 | 4.69 | 0.512 |
| 24 | 4.43 | 0.783 | 4.45 | 0.74 | 4.69 | 0.56 |
| 25 | 4.43 | 0.764 | 4.48 | 0.702 | 4.68 | 0.531 |
| Suma | 110.94 | 18.9 | 112.21 | 17.705 | 116.95 | 13.566 |
| Promedio | 4.43 | 0.756 | 4.48 | 0.7082 | 4.67 | 0.54264 |
| DS | 0.02402776 | 0.02924893 | 0.0363639 | 0.02656282 | 0.01443376 | 0.03261758 |

En cuanto a la preferencia, en la figura 8 se observa que la bebida fermentada elaborada con leche UHT es la que se coloca en primer lugar, seleccionada como preferida por 54 jueces no entrenados, seguida por la elaborada con leche pasteurizada, seleccionada por 33 jueces no entrenados, y por último la elaborada con leche en polvo seleccionada por 13 jueces no entrenados.

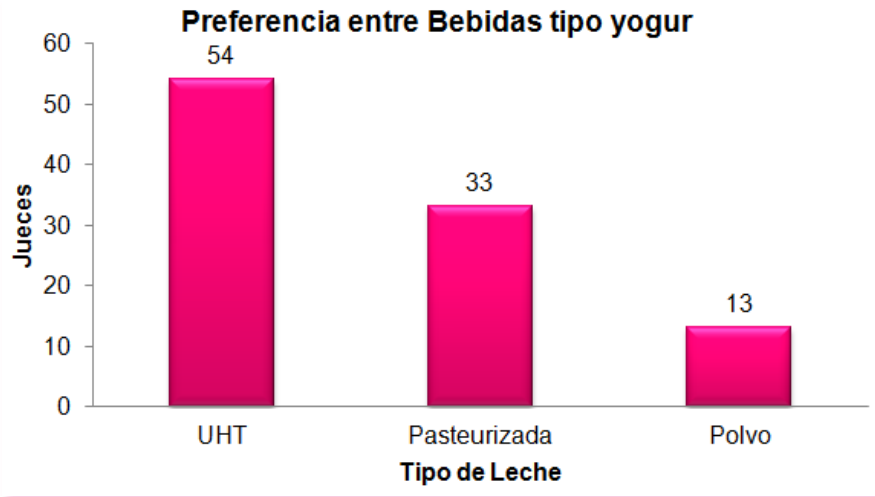


Figura 8. Preferencia entre bebidas tipo yogur

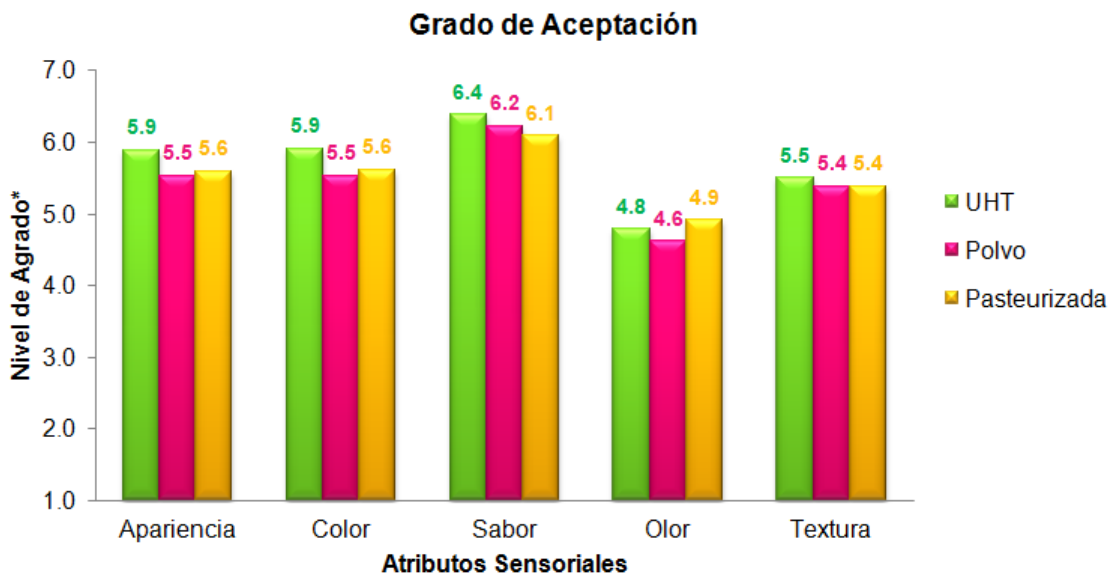
Para determinar si existe diferencia entre las 3 bebidas tipo yogur, los resultados obtenidos en la prueba de ordenamiento se analizaron con las tablas de Newell y MacFarlane, encontrando que entre la bebida elaborada con leche UHT y la elaborada con leche pasteurizada no hay diferencia significativa, sin embargo se encontró diferencia significativa entre las bebidas elaboradas con leche en polvo y leche UHT y de igual forma se encontró diferencia para las elaboradas con leche en polvo y leche pasteurizada. Por lo tanto los consumidores son capaces de distinguir las diferencias entre las 3 bebidas elaboradas con las diferentes leches.

Cuadro 5. Diferencia de Σ con tablas de Newell y MacFarlane

| Diferencia de Σ | Valor tabla α 1% | Comparación | Conclusión |
|--|-------------------------|-------------|--------------------|
| $ \Sigma_{UHT} - \Sigma_{Pas} = 161 - 190 = 29$ | 42 | $29 < 42$ | No hay diferencia. |
| $ \Sigma_{UHT} - \Sigma_{Polvo} = 161 - 249 = 88$ | | $88 > 42$ | Si hay diferencia. |
| $ \Sigma_{Pas} - \Sigma_{Polvo} = 190 - 249 = 59$ | | $59 > 42$ | Si hay diferencia. |

En la figura 9 se observa el nivel de agrado de cada atributo para cada una de las bebidas elaboradas con las 3 diferentes leches, se ve claramente que en general las 3 bebidas fueron del agrado de los jueces, encontrándose en el rango de moderadamente agradable y agradable, siendo el atributo de olor el que obtuvo la calificación más baja, considerándose como ni agradable-ni desagradable. Por lo tanto es claro que a pesar de que la bebida elaborada con la leche UHT fue la preferida, las otras 2 bebidas también fueron aceptadas.

Esta prueba comúnmente no es recomendada para paneles menores de 30 jueces, ya que reduce el poder estadístico de la prueba, pues se hace necesaria una mayor diferencia en las preferencias, para poder obtener significancia estadística. (Anzaldúa-Morales, 1994) por lo tanto podemos decir que los resultados obtenidos presentan mayor confiabilidad ya que fue realizada con 100 jueces.



Nivel de Agrado* = Para la evaluación del Grado de Aceptación de las 3 bebidas, se asignó un valor al nivel de preferencia de 7 a 1; siendo 7 = muy agradable, 6 = agradable, 5 = moderadamente agradable, 4 = ni agradable, ni desagradable, 3 = moderadamente desagradable, 2 = desagradable y 1 = muy desagradable. Posteriormente se multiplicaron por la frecuencia con la que fueron seleccionadas y finalmente la suma de los valores obtenidos se dividió entre el número de jueces que eligió cada bebida como preferida, obteniendo el promedio del nivel de agrado* para cada atributo de cada una de las 3 bebidas tipo yogur

Figura 9. Grado de aceptación

5.6 Influencia del tiempo de almacenamiento en el dispositivo.

En el cuadro 6 podemos observar que las bebidas fermentadas con el dispositivo almacenado durante 6 meses a 4°C y las muestras fermentadas con el dispositivo almacenado durante 1 día a 4°C se comportan de manera similar. A las 25 horas de fermentación las dos bebidas presentaron un pH promedio de 4.5 y la acidez generada fue de 0.819 ± 0.023 % de ácido láctico para el dispositivo almacenado durante 6 meses a 4°C y 0.815 ± 0.028 % de ácido láctico para el dispositivo almacenado durante 1 día a 4°C.

Con los resultados obtenidos es claro que el almacenamiento del dispositivo al menos durante 6 meses a 4°C no afecta en absoluto el pH y la acidez del producto final, por lo tanto se puede afirmar que el dispositivo tiene una vida de anaquel de al menos 6 meses, siempre y cuando se mantenga en condiciones de refrigeración (a 4°C).

Cuadro 6. Acidez y pH de las bebidas fermentadas (25horas) a temperatura ambiente con el dispositivo almacenado a diferente tiempo.

| Bebidas fermentadas con el dispositivo almacenado durante 6 meses a 4°C | | | Bebidas fermentadas con el dispositivo almacenado durante 1 día a 4°C | | |
|---|-------------|---------------|---|-------------|---------------|
| Muestra | pH | Acidez | Muestra | pH | Acidez |
| 1 | 4.55 | 0.815 | 1 | 4.62 | 0.756 |
| 2 | 4.6 | 0.756 | 2 | 4.65 | 0.745 |
| 3 | 4.56 | 0.791 | 3 | 4.55 | 0.815 |
| 4 | 4.51 | 0.85 | 4 | 4.55 | 0.815 |
| 5 | 4.55 | 0.803 | 5 | 4.51 | 0.873 |
| 6 | 4.51 | 0.85 | 6 | 4.55 | 0.803 |
| 7 | 4.54 | 0.826 | 7 | 4.54 | 0.826 |
| 8 | 4.55 | 0.815 | 8 | 4.54 | 0.826 |
| 9 | 4.54 | 0.826 | 9 | 4.54 | 0.826 |
| 10 | 4.54 | 0.826 | 10 | 4.51 | 0.85 |
| 11 | 4.55 | 0.815 | 11 | 4.55 | 0.803 |
| 12 | 4.54 | 0.826 | 12 | 4.54 | 0.826 |
| 13 | 4.57 | 0.791 | 13 | 4.55 | 0.815 |
| 14 | 4.54 | 0.826 | 14 | 4.54 | 0.826 |
| 15 | 4.54 | 0.826 | 15 | 4.55 | 0.803 |
| 16 | 4.55 | 0.815 | 16 | 4.54 | 0.826 |
| 17 | 4.51 | 0.85 | 17 | 4.54 | 0.826 |
| 18 | 4.51 | 0.85 | 18 | 4.54 | 0.826 |
| 19 | 4.54 | 0.826 | 19 | 4.55 | 0.815 |
| 20 | 4.55 | 0.815 | 20 | 4.55 | 0.803 |
| Suma | 90.85 | 16.398 | Suma | 91.01 | 16.304 |
| Promedio | 4.54 | 0.8199 | Promedio | 4.55 | 0.8152 |
| DS | 0.02173404 | 0.02299176 | DS | 0.03153528 | 0.02763788 |

En cuadro 7 se muestran los resultados obtenidos en la prueba triangular. Donde se observa que 59 jueces encontraron diferencias en los dispositivos.

Cuadro 7. Resultados prueba triangular

| Aciertos | Errores |
|----------|---------|
| 59 | 41 |

Para evaluar estadísticamente la prueba triangular llevada a cabo, se aplicó la siguiente ecuación:

$$X^2 = \frac{(|X_1 - np| - 0.5)^2}{(np)(1 - p)}$$

$$X^2 = \frac{(|59 - (100 * 0.33)| - 0.5)^2}{(100 * 0.33)(0.66)}$$

Valor $X^2_{exp} = 29.86$

Donde:

- | | |
|---|--|
| <p>X_1 = Número de aciertos</p> <p>n = Número de replicas</p> <p>p = Probabilidad de éxito en un ensayo único = 1/3</p> <p>q = Probabilidad de falla en un ensayo único = (1-p)</p> <p>0.5 = Factor de corrección por continuidad</p> | <p>X_1 = 59</p> <p>n = 100</p> <p>p = 0.33</p> <p>q = 0.66</p> |
|---|--|

* Factor de corrección se aplica sólo para un grado de libertad en el cual los resultados se consignan como “acierto” y “falla”

Valor $X^2_{teórica} \alpha 1\% = 2.71$

El valor obtenido se contrastó con el valor de tablas para la distribución estadística X^2 a nivel de significancia de 1% (Valor $X^2_{teórica} \alpha 1\% = 2.71$), encontrando que: $X^2_{exp} = 29.86 > X^2_{teórica} = 2.71$, por lo tanto si se encontró diferencia significativa entre ambas bebidas elaboradas con los 2 dispositivos.

El que los jueces hayan encontrado diferencia entre los dispositivos no se debe a la actividad metabólica de *Lactococcus lactis ssp. lactis*, ya que en el cuadro 6 se observa que no hay diferencia entre los dispositivos, ya que ambos dispositivos se

comportan de forma similar al llegar a descender el pH hasta 4.5 y producción de acidez de 0.8%.

La diferencia encontrada, de acuerdo a los comentarios que hicieron los jueces radica en la consistencia de las bebidas, esto se debe a la agitación a la que fueron sometidas las bebidas al momento de homogeneizar el 10% de azúcar adicionado, ya que la homogeneización fue realizada por dos personas.

La bebida tipo yogur elaborada, presenta propiedades similares a las del yogur. El yogur es un fluido tixotrópico por lo cual la agitación excesiva o altas fuerzas de corte de la misma, o durante el manejo y proceso, pueden producir una caída sustancial de la viscosidad del producto. (García et al., 2004).

Al servir las muestras y notar que la bebida elaborada con el dispositivo almacenado durante 6 meses tenía una consistencia más líquida, se pidió a los jueces que escribieran en el cuestionario cual era la muestra que preferían, obteniendo los resultados mostrados en la figura 10, donde vemos que la mayoría de los jueces mostraron preferencia por ambas bebidas.

Los jueces encontraron diferencia significativa entre las bebidas elaboradas con los dispositivos almacenados a 4°C, durante 6 meses y 1 día. Sin embargo esta diferencia no afecta la aceptabilidad, lo que se observa en la figura 10.

Por otro lado, en la patente *“Dispositivo de bacterias lácticas inmovilizadas en un soporte sólido para la producción de una bebida tipo yogur”* (Pérez-Gavilan et al., 2012) encontramos que no existe diferencia entre un dispositivo recién fabricado y uno que tuvo un almacenamiento de 120 días en refrigeración a 4°C ya que la acidez y el pH generados en la leche son iguales y se reporta que el dispositivo mantenido en refrigeración a 4°C tiene una vida de anaquel de al menos 120 días. De acuerdo a lo reportado en la patente y en los resultados de pH y acidez de las bebidas elaboradas con ambos dispositivos, que se muestran en el cuadro 6, se puede decir que el dispositivo mantenido en refrigeración a 4°C tiene una vida de anaquel de al menos 6 meses.

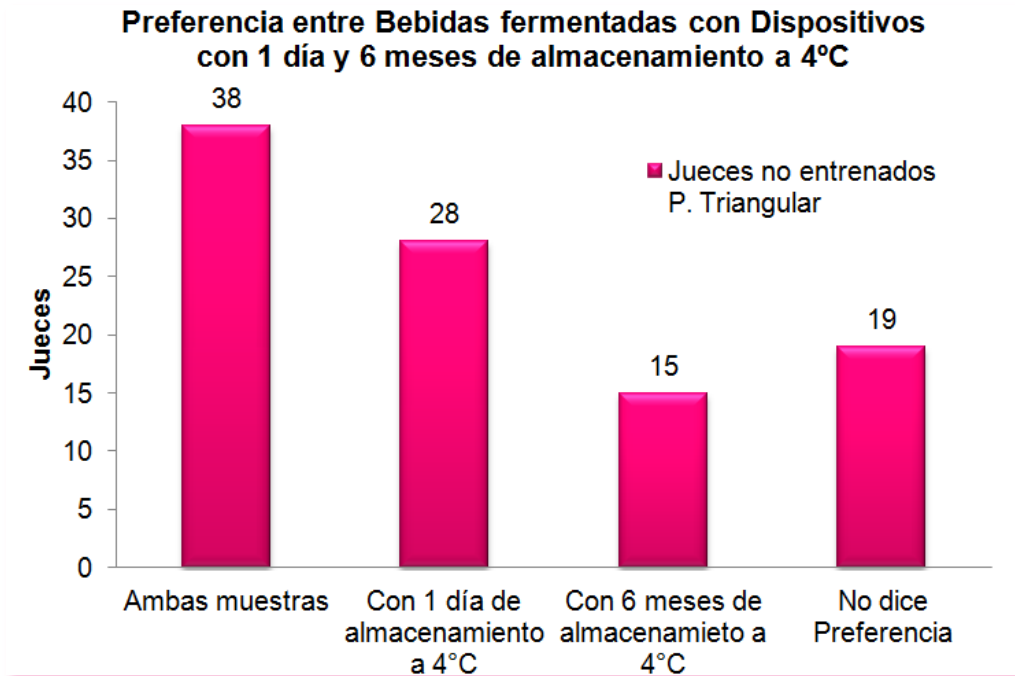


Figura 10. Preferencia entre bebidas

El que el dispositivo tenga una vida de anaquel de al menos 6 meses se debe a que en la desecación los microorganismos no pueden crecer ni reproducirse, ya que las células dejan de multiplicarse por el nivel insuficiente de agua disponible en el medio (Morales-García et al., 2010) pero se mantienen viables durante años. Cuando estas bacterias vuelven a disponer de agua, recuperan su capacidad de crecimiento y división (Tortora et al., 2007) Debido a que en el dispositivo además de inmovilizar a las bacterias también se desecan los componentes del medio óptimo para su desarrollo. Al sumergirlo en leche y disponer nuevamente de agua junto con los nutrientes necesarios para su desarrollo, *Lactococcus lactis ssp. lactis* se desarrolla de manera óptima, descendiendo el pH de la leche hasta valores inferiores de 4.5 y produciendo una acidez de hasta 0.9% de ácido láctico. Si la leche está libre de inhibidores, la actividad de microorganismos está determinada principalmente por la temperatura de incubación y la cantidad de inóculo agregado. (Gonzales, 2006).

CONCLUSIONES

*Que la inspiración llegue no depende de mí, lo único que yo puedo hacer
es ocuparme de que me encuentre trabajando.*

*Pablo Ruiz Picasso
(1881-1973)*

6. CONCLUSIONES

- ☆ Se logró inmovilizar a *Lactococcus lactis ssp. lactis* junto con otros nutrimentos en un soporte sólido de celulosa.
- ☆ El tiempo de secado empleado para la inmovilización es de 40 minutos y se encontró que las bacterias después del secado se presentan en una concentración de 10^8 UFC/tira
- ☆ El dispositivo funcionó adecuadamente con todas las leches empleadas, la leche procesada mínimamente (leche de establo pasteurizada) y con las industrializadas de marcas: Lala, Alpura y Liconsa sometidas a diferentes tratamientos; en polvo, pasteurizada y UHT.
- ☆ Se encontró que los consumidores aceptan la bebida tipo yogur elaborada con el dispositivo, mostrando preferencia por las elaboradas con las leches sometidas a ultrapasteurización y pasteurización.
- ☆ El almacenamiento del dispositivo durante 6 meses a 4°C no afecta el pH, ni la acidez del producto final, por lo que se puede decir que el dispositivo mantenido en refrigeración a 4°C tiene una vida de anaquel de al menos 6 meses.
- ☆ El dispositivo elaborado con *Lactococcus lactis ssp. lactis* inmovilizadas en un soporte sólido de celulosa resulta práctico de utilizar y es una alternativa económica para la elaboración de leches fermentadas, dicho dispositivo contiene 10^8 UFC/tira de *Lactococcus lactis ssp. lactis* y al aplicarlo en leche entera de buena calidad se obtiene una bebida tipo yogur que proporciona los beneficios a la salud del individuo que las consume, llegando a concentraciones de 10^9 UFC/mL en la bebida tipo yogur lista para consumir.

7 BIBLIOGRAFÍA

*Sorprendernos por algo es el primer paso
de la mente hacia el descubrimiento.*

*Louis Pasteur
(1822-1895)*

7. BIBLIOGRAFIA

1. AASA (Agencia Aragonesa de Salud Alimentaria), 2010. Leches fermentadas: aspectos nutritivos, tecnológicos y probióticos más relevantes. [En línea]
Disponible en:
http://www.aragon.es/estaticos/ImportFiles/12/docs/Areas/Seguridad_Agroalimentaria/Agencia_Aragonesa_Seguridad_Alimentaria/Dictámenes_informes/AASA/LECHES_FERMENTADAS.pdf [Último acceso el 03 de abril de 2013]
2. Aguhob, S. y Axtell, B. 1998. *Dairy processing*, 2ª Edición, Lima, ITDG-Perú – UNIFEM
3. Alais, C., 2003. *Ciencia de la Leche: Principios de la Técnica Lechera*, 4ª edición, Reverté, S.A., España, p. 258, 259.
4. Alatorre, G., Cañizo M., Conca, A., García, V., Hernández, V., León, A., Mina, A., Nieto, F., Ortiz, J., Paz E., Rey, A. 2012, *Protocolos Experimentales para la Asignatura de Laboratorio de Tecnología de Alimentos*, Departamento de Alimentos y Biotecnología, Facultad de Química, UNAM
5. Anzaldúa-Morales, A., 1994. *La Evaluación Sensorial de los Alimentos en la teoría y la práctica*, Editorial ACRIBIA, S.A. Zaragoza España.
6. Aranceta, J. y Serra, Ll., 2005. *Leche, lácteos y salud.*, Editorial Médica Panamericana Medica, Capítulo 1, España.
7. Aranceta, J., Bixquert, M., Burnat, A., et al., 2002. *Alimentos funcionales. Probióticos*. Madrid, Editorial Médica panamericana, S.A. p.48-69, 101-107, 112
8. Ares, G., Bruzzone, F., Giménez, A. 2013. Temporal aspects of yoghurt texture perception. *International Dairy Journal*, Volume 29, Issue 2, Pages 124–134
9. Arroyo, M., 1998. Immobilized enzymes: Theory, methods of study and applications. *Ars Pharmaceutica* 39(2) Pages. 23-39.
10. Badui, S., 2006. Leche. En: Badui, S., *Química de los alimentos*, 4ª edición, Editorial. Pearson Educación, S.A. de C.V., Capítulo 12, México, D.F. p. 603-629
11. Bourges H., 1995. Los alimentos y la dieta En: Casanueva E, Kaufer-Horwitz M, Pérez-Lizaur AB, Arroyo P. eds. *Nutriología Médica*. 1ª ed., Editorial Médica Panamericana. México, D.F.
12. Bruno-Bárcena, J., Dagher, S., Ragout, A., Siñeriz F. 2010. Cell Immobilization for Production of Lactic Acid: Biofilms Do It Naturally. *Advances in Applied Microbiology*, Volume 71, Pages. 113–148
13. Cruz, N., 2008. *Efecto de la Ultra Alta Presión de Homogenización en licuado de soja y su comportamiento en el desarrollo de un producto fermentado*. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona, Bellaterra (Cerdanyola del Vallès), España.

14. Del Castillo, R. y Mestres, J., 2004. *Productos lácteos. Tecnología*, Ediciones UPC, Cataluña, España.
15. Ensminger, M. 1980. *Dairy Cattle Science*. 2nd Ed. The Interstate Print & Publishers, Inc., Danville, Illinois.
16. FDA (Food and Drugs Administration), 2012. *Los peligros de la leche cruda: La Leche sin Pasteurizar Puede Representar un Riesgo Grave Para la Salud*. [En línea] (Actualizado al 01 de marzo de 2013).
Disponible en:
<http://www.fda.gov/Food/ResourcesForYou/Consumers/ucm210577.htm> [Último acceso el 22 de marzo de 2013]
17. Font de Valdez, G., Médici, M., Taranto, M. 2005. Alimentos Funcionales Probióticos. *Química Viva*, Vol.4, No. 001, Buenos Aires, Argentina, p. 26-34
18. García, M., Gómez, L., González, L., Guerrero, A., Jiménez, J., Rodríguez, G. 2011. Liberación de péptidos bioactivos por bacterias lácticas en leches fermentadas comerciales. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, Vol. 10, No. 2 p. 179-188
19. García, M., Quintero, R., López, M., 2004. *Biotechnología Alimentaria*. Productos Lácteos, Editorial Limusa, S.A. de C.V. Grupo Noriega Editores, México, D.F.
20. Gil, A. 2010. *Tratado de Nutrición: Composición y Calidad Nutritiva de los Alimentos*, Tomo II, Editorial Médica Panamericana, S.A. de C.V., Madrid, España.
21. Goldhaber, S., 1982. "*Tecnología para la producción y conservación de algunos microorganismos de interés lactológico*", Tesis maestría, Universidad Iberoamericana. México, D.F.
22. Gonzales, A., 2006. *Curva de acidificación del yogur zamorano*, Trabajo de graduación presentado como requisito para optar al título de Ingeniera en Agroindustria en el Grado Académico de Licenciatura.
23. Hawkey, P., Hoy, C., Puntis, W., Wood, C. 2000. Duodenal microflora in very-low-birth-weight neonates and relation to necrotizing enterocolitis. *Journal of Clinical Microbiology* 38 Pages 4539-4547
24. Hernández, A., et al., 2003. Los Productos Lácteos. En: Hernández, A. Alfaro, I., Arrieta, R. eds. *Microbiología Industrial*, Editorial: EUNED, Capítulo 4, Costa Rica
25. Hunter-Cevera, J.C. and Belt, A., 1996 "*Maintaining cultures for biotechnology and industry*". Academic Press. London.

26. Kenneth Todar, 2010. *Lactococcus lactis* as the Wisconsin State Microbe. University of Wisconsin-Madison Department of Bacteriology [En línea]
Disponible en:
<http://bioinfo.bact.wisc.edu/themicrobialworld/Lactococcus.html>
[Último acceso el 19 de septiembre de 2012]
27. Konings W., Kuipers O. y Huis in't Veld J. 2004. *Lactic acid bacteria: Genetics, metabolism, and applications*. Netherlands. Kluwer Academic Publisher.
28. Kurmann, J., Rasic, J. 1992. *Encyclopedia of fermented fresh milk products*, USA: Van Nostrand Reinhold
29. Maza, M. y Legorreta, P. 2011. Generalidades de la leche y los productos lácteos. En: *El libro Blanco de la Leche y los Productos Lácteos*, CANILEC, Capítulo 2, México, D.F.
30. Mendoza, A., 2009. "Determinación de la viabilidad de *bifidobacterium bifidum* Inmovilizado, tratado bajo condiciones gastrointestinales humanas simuladas in vitro", Tesis de Maestría, Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología, I.P.N.
31. Mohammed, B., Cormac, G., Gahan, M. 2010. *Lactococcus lactis*: From the Dairy Industry to Antigen and Therapeutic Protein Delivery, Department of Microbiology, University College Cork. Discovery Medicine.
32. Montero, A., Limia, A., Pérez, P., et al., 2006. *Leches fermentadas en la comunidad de Madrid*, Documentos técnicos de salud pública nº 106, Editores Dirección General de Salud Pública y Alimentación, Madrid, España.
33. Mora, N. y García, A., 2007. *Susceptibilidad de Bacterias Acido lácticas (BAL) frente a diversos antibióticos*. Tesis de Licenciatura, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería. Centro de Investigaciones Químicas.
34. Moraes, J., 2004. "Estudio de Adecuación de Cepas Lácticas Autóctonas aisladas de leche cruda de oveja guirra para la elaboración de queso", Tesis de Doctorado, Universidad Autónoma de Barcelona, España
35. Morales-García, Y., Duque, E., Rodríguez, O., De la Torre, J., et al., 2010. Bacterias Preservadas, una Fuente Importante de Recursos Biotecnológicos. *BioTecnología*, 2010, Vol. 14 No. 2
36. Negroni, M., 2009. *Microbiología Estomatológica. Fundamentos y Guía Práctica*, 2ª Edición, Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires, Argentina.
37. NOM-091-SSA1-1994. Bienes y servicios. Leche pasteurizada de vaca. Disposiciones y especificaciones sanitarias.
38. NOM-155-SCFI-2003: Leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado. Denominaciones, especificaciones fisicoquímicas, información comercial y métodos de prueba.

39. Orozco, M. y Solarte, J., 2003. *Búsqueda del mejor medio de cultivo y modelamiento cinético para la obtención del ácido láctico a partir de glucosa por vía fermentativa*. Tesis de Licenciatura, Universidad Nacional de Colombia.
40. Paniagua, H., 2008. *Manual de elaboración de los productos lácteos en la empresa chelmar S.A. de C. V. en Saltillo, Coahuila*, Servicio profesional, para obtener el título de médico veterinario zootecnista. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Morelia, Michoacán.
41. Parra, R. 2010. *Bacterias Acido Lácticas: Papel funcional en los Alimentos*, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Colombia, Vol. 8 No. 1
42. Pedrero, D. y Pangborn, M., 1989. *Evaluación Sensorial de los Alimentos. Métodos Analíticos*, Alhambra Mexicana
43. Pérez, M., 2011. Proceso de Industrialización de la leche fluida. En: *El libro Blanco de la Leche y los Productos Lácteos*, CANILEC, Capítulo 3, México, D.F.
44. Pérez-Gavilán, J. y Pérez-Gavilán, J., 1984. *Bioquímica y Microbiología de la leche*. Editorial Limusa S.A, México, D.F.
45. Pérez-Gavilán, J., Macedo, L. Ortiz, B., 2012. "Dispositivo de bacterias lácticas inmovilizadas en un soporte sólido para la producción de una bebida tipo yogur" solicitud de patente expediente MX/a/2012/005948, folio MX/E/2012/ 039023, ante el instituto Mexicano de la propiedad industrial el 23 de mayo de 2012.
46. Piña, M., Uribe, C., Regalado, C., Amaya, S., et al., 2011. *Nisin production by Lactococcus lactis using supplemented milk whey and evaluation of its activity after spray drying*. PROPAC, Facultad de Química, Universidad Autónoma de Querétaro. Pages. 47-55
47. Ramírez-Sucre, M. y Vélez-Ruiz, F. 2013. Physicochemical, rheological and stability characterization of a caramel flavored yogurt. *LWT – Food Science and Technology*, Pages. 233-441.
48. Revilla, A., 1982. *Tecnología de la leche: Procesamiento, manufactura y análisis*, Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura, 2ª edición. San José: LEVANTEX S.A.
49. Romero, R. y Mestres, J., 2004, *Productos Lácteos. Tecnología*, Barcelona, Ediciones UPC, S. L.
50. Samaržija, D., Neven A., Lukač, J. 2001. Taxonomy, physiology and growth of *Lactococcus lactis*: a review. *Mljekarstvo*. Vol. 51, Pages 35-48
51. Sánchez, E. 2011. *Leche, negocio que pocos saborean*, El Economista [En línea] (Actualizado al 07 de junio de 2011).
Disponible en:
<http://eleconomista.com.mx/industrias/2011/06/08/leche-negocio-que-pocos-saborean>
[Último acceso el 05 de marzo de 2012].

52. SENC (*Sociedad Española de Nutrición Comunitaria*), 2005. *Alimentos funcionales. Para una alimentación más saludable*. [En línea]
Disponible en:
http://www.yakult.mx/uploads_yakult/pdf/Alimentos%20funcionales_32.pdf
[Último acceso el 03 de abril de 2013]
53. Sigala, J., Tafolla, M., Pérez, J., 2007, Estudio de la Actividad Ácido Láctica de *Lactococcus lactis ssp. lactis* y su Relación con el Perfil de Plásmidos Durante el Almacenamiento en Refrigeración, *Rev. BioTecnología*, Vol. 11 No. 2, pp.18-27.
54. Tannock, G., 2005. *Probiotics & Prebiotics: Scientific Aspects*, Great Britain: Caiste Academic Press.
55. Tórtora, G., Funke, R., Case, C. 2007. *Introducción a la microbiología*, 9ª edición. Buenos Aires, Editorial Panamericana
56. Velázquez, J., Pérez, A., Rodríguez, L., Corzo, A. 2000. Estudio de la producción de leches fermentadas con células de *Lactococcus lactis subsp. Lactis* inmovilizadas en alginato de calcio, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, Tabasco, México
57. Walstra, P., Geurts, T., Noomen, A., et al., 2001. *Ciencia de la Leche y Tecnología de los Productos Lácteos*, España, Editorial ACRIBIA, S.A. ZARAGOZA.
58. Watts, B., Ylimaki, G., et al, 1992. Métodos sensoriales básicos para la evaluación de alimentos. *International Development Research*, Ottawa, Canadá.
59. WFCC, Métodos restringidos de conservación de cepas de interés industrial. Publicado por el Comité de Educación de la UNESCO [En línea]
Disponible en:
<http://www.itescam.edu.mx/principal/sylabus/fpdb/recursos/r43898.PDF>
[Último acceso el 21 de enero de 2013]



ANEXO

*Vencer en una batalla puede exigir
lucharla varias veces
Margaret Thatcher
(1925-2013)*

8. ANEXO

ANEXO A. DETERMINACIONES

Determinación de pH

El pH se mide con un potenciómetro CORNING Pinnacle 530 pHmeter.

Se tomo una muestra de 5 mL y se coloco en un vaso de precipitados posteriormente se sumergió el electrodo y segundos después se obtuvo la lectura de pH, finalmente el electrodo se enjuaga con aguas destilada.

Determinación del tiempo de escurrimiento

Con un cronómetro se tomó el tiempo (en segundos) que tarda en desplazarse 25 mL de muestra en una bureta de 50 mL con salida modificada a un diámetro de 0.7mm, el tiempo se comenzó a medir a partir de que se abrió la llave de la bureta.

Determinación de viscosidad

La viscosidad se mide utilizando un viscosímetro de Brookfield modelo LVT empleando el huso #2 del LV a 60 rpm.

Determinación de acidez

Se tomo 10 mL de muestra y se colocaron en un vaso de precipitados, se utilizo una bureta de 50 mL con NaOH 0.1N, se titulo la muestra empleando fenolftaleína al 1% como indicador.

La acidez se reporta como % de ácido láctico.

Ejemplo de cálculo de acidez para leche de establo pasteurizada

| Volumen de NaOH gastado | Volumen de muestra | NaOH normalizada | P. M. ácido láctico |
|-------------------------|--------------------|------------------|---------------------|
| 1.9 mL | 10 mL | 0.1055 N | 90g /mol |

$$\left(\frac{1.9 \text{ mL NaOH}}{10 \text{ mL}}\right) \left(\frac{0.1055 \text{ mol NaOH}}{1000 \text{ mL NaOH}}\right) \left(\frac{1 \text{ mol ác. láctico}}{1 \text{ mol de NaOH}}\right) \left(\frac{9 \times 10^4 \text{ mg ác. láctico}}{1 \text{ mol ác. láctico}}\right)$$

$$= \frac{1.80 \text{ mg ác. láctico}}{\text{mL}}$$

$$\left(\frac{1.80 \text{ mg ác. láctico}}{\text{mL}}\right) \left(\frac{1 \text{ g}}{1000 \text{ mg}}\right) \times 100 = 0.18 \% \text{ ácido láctico}$$

ANEXO B. Viscosímetro Brookfield

1. Descripción del equipo.

Consta básicamente de tres secciones:

- ★ Sección de mando.
- ★ Sección de registro y lectura de datos.
- ★ Sección de pruebas.

Cada una de estas secciones consta de diversas partes. A continuación se describen las más importantes de cada sección.

★ Sección de mando.

Está ubicada en la parte superior del viscosímetro. Consta de un motor sincrométrico de velocidad variable y un sistema de engranes de transmisión acoplado directamente a la carátula del aparato. Ambos están localizados en el interior de una carcasa metálica. En ella, por la parte externa, están el botón selector de velocidades, la palanca del clutch, el indicador de nivel tipo brújula, el switch de encendido y el mango de sostén del viscosímetro.

Otras partes importantes de esta sección son el resorte calibrador, el pivote (no visibles), el indicador y la carátula.

El resorte calibrador es una aleación de Cobre-Berilio. Uno de sus extremos está unido al indicador, mientras que otro está unido a la carátula. Esta a su vez se mueve por medio de los engranes de transmisión acopados al motor.

El pivote está acoplado al resorte calibrado y uno de sus extremos sobresale del cuerpo del viscosímetro por la parte inferior. Este extremo termina en un pequeño cople con rosca interna al cual se atornillan los husos o "spindles".

Estas partes son extremadamente sensibles y deben manejarse con cuidado para evitar daños mecánicos, en especial al atornillar los husos.

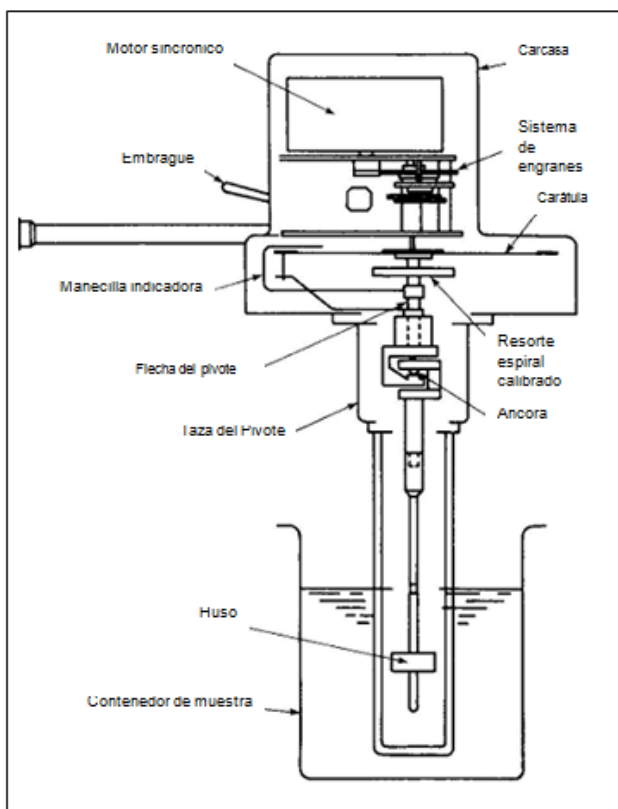


Figura 1

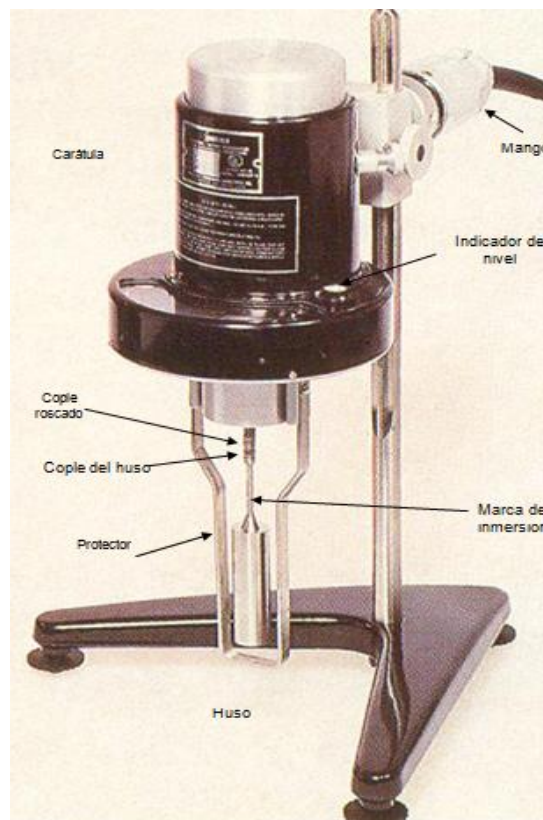


Figura 2

★ Sección de registro y lectura de datos.

En esta sección se localiza el indicador (aguja roja) y la carátula. Cuando está en operación la carátula gira en la dirección de avance de las manecillas del reloj y el indicador se desliza libremente hasta detenerse en cualquier número sobre la carátula. En este momento se oprime la palanca del clutch, la cual está colocada atrás de la carcasa, para hacer la lectura. El procedimiento detallado se describe en la sección 3.8.

★ Sección de pruebas.

La sección de prueba está integrada por el cople roscado, el protector de husos. El modelo LV tiene cuatro husos, la forma se muestran en la siguiente figura y las dimensión en la tabla 1. Cada huso tiene grabado un número con el cual se identifica. El número está en el acoplamiento roscado del huso. Sobre la varilla que conecta el acoplamiento roscado con el cuerpo del huso hay una pequeña ranura, ésta señala el nivel de inmersión del huso en el fluido y es necesario que dicho nivel se mantenga justamente en la marca, de otra forma las mediciones no son correctas.

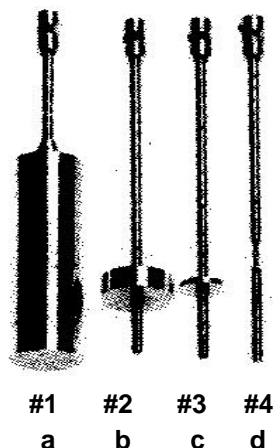
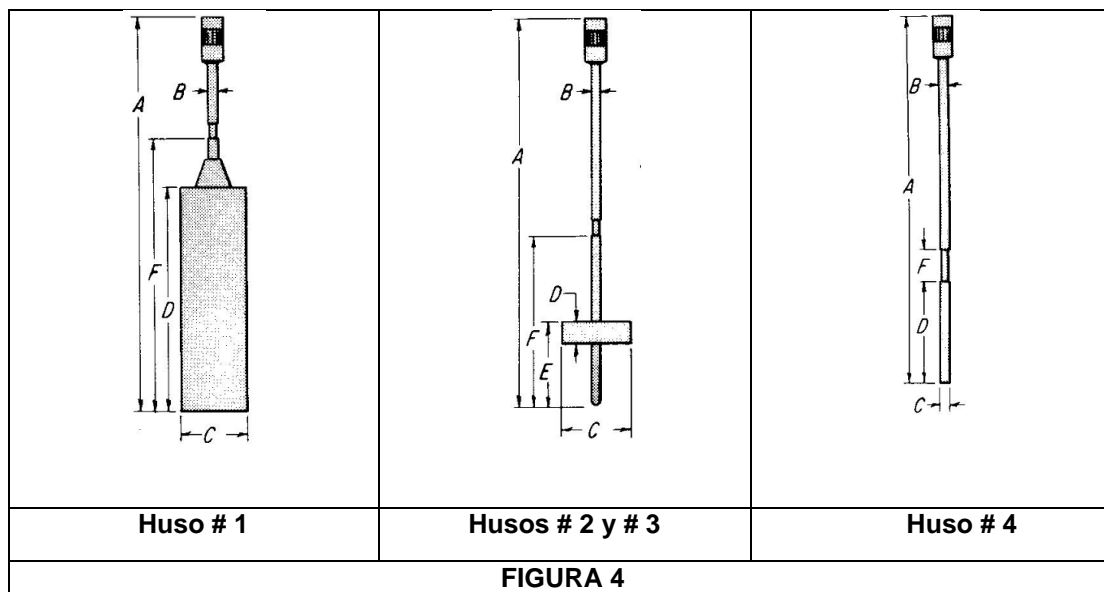


FIGURA 3

Tabla 1. Dimensiones de los husos en mm.

| Huso | Figura | A | B | C | D | E | F |
|------|--------|-----|-----|-------|-------|------|-------|
| # 1 | 3 a | 115 | 3.2 | 18.84 | 65.1 | - | 80.97 |
| # 2 | 3 b | 115 | 3.2 | 18.72 | 6.86 | 25.5 | 50 |
| # 3 | 3 c | 115 | 3.2 | 12.7 | 1.65 | 25.5 | 50 |
| # 4 | 3 d | 115 | 3.2 | 3.2 | 31.01 | - | 9.53 |



Los husos deben mantenerse con extremo cuidado, teniendo especial atención de no forzarlos al limpiarlos y al unirlos con el cople roscado ya que pueden doblarse o deformarse con lo cual no es posible seguir usándolos.

Para atornillarlos debe seguirse la dirección de avance de las manecillas del reloj y no deben apretarse excesivamente. Los husos deben manejarse tomándolos por la parte Terminal de la varilla y nunca atornillarlos sosteniéndolos por el cuerpo.

Aplicación del instrumento.

Se aplica a la determinación de la viscosidad en fluidos newtonianos y la determinación del comportamiento reológico en fluidos no newtonianos simples. Aunque en este último caso la determinación es más difícil, es posible a través de ciertos métodos.

Existen diferentes modelos de viscosímetro Brookfield los cuales son:

- ★ LVF y LVT
- ★ RVF y RVT
- ★ HAT y HBT

Los modelos LV se aplican para viscosidades bajas, los RV para viscosidades medias y los H para viscosidades altas. La tabla 2 muestra las características principales del LVT.

Tabla 2. Características del Viscosímetro Brookfield modelo LVT.

| | |
|---|--------------------------------|
| Constante de torsión del resorte (dina.cm escala total) | 673.7 |
| Número de velocidades | 8 |
| Velocidades (rpm) | 60, 30, 12, 6,3,1.5, 0.6 y 0.3 |
| Número de husos | 4 |
| Número de rangos | 32 |
| Viscosidad mínima (centipoise) | 15 |
| Viscosidad máxima (cp) | 2×10^6 |

Aunque el fabricante afirma que la precisión del viscosímetro es de $\pm 1\%$, es recomendable que las lecturas sean lo más cercanas al 100 sobre la escala, ya que conforme éstas se aproximan a 0 la precisión y reproducibilidad disminuye. Por ejemplo, para un huso y una velocidad tales que se obtengan lecturas en toda la escala, el viscosímetro medirá cualquier viscosidad en ésta región con una precisión de 1 cp (ver tabla 3).

Tabla 3. Errores posibles en la medición.

| % de la escala | Viscosidad del material | Error posible | % de error posible | Reproducibilidad de la medición |
|----------------|-------------------------|---------------|--------------------|---------------------------------|
| 100 | 100 cp | 1 cp | 1 % | 0.2 cp |
| 50 | 50 cp | 1 cp | 2 % | 0.2 cp |
| 10 | 10 cp | 1 cp | 10% | 0.2 cp |
| 1 | 1 cp | 1 cp | 100% | 0.2 cp |

Como regla general la precisión de la medición aumentará conforme las lecturas se aproximen al 100 de la escala.

2. Operación.

Sección I: Principio de operación.

El viscosímetro Brookfield es un viscosímetro rotacional. Opera haciendo girar, a una velocidad angular constante, un elemento, llamado huso, sumergido en un fluido. El modelo LVT tiene ocho velocidades angulares. Los husos de número uno y cuatro tienen forma cilíndrica mientras que los números dos y tres tienen forma de discos.

Al hacer girar el huso en el fluido la resistencia viscosa que éste opone al movimiento del huso se detecta por medio de la deflexión de un resorte calibrado de cobre-berilio. La deflexión se registra a través del indicador que se desliza sobre la carátula hasta mantenerse fijo sobre un determinado número en la escala (0 – 100). El grado de torsión del resorte es, según el fabricante, proporcional a la velocidad del fluido independiente del huso y la velocidad angular.

Sección II: Operación.

★ Selección de la velocidad angular.

Cuando se tiene alguna información sobre la viscosidad aproximada del fluido se selecciona el huso y la velocidad para la cual se obtiene una lectura mayor a 10. Cuando se efectúa una prueba original, el mejor método para seleccionar husos y velocidades es prueba y error.

El objetivo es obtener lecturas entre 10 y 90. Si la lectura es mayor a 90, se selecciona una velocidad menor y/o un huso más pequeño. Inversamente, si la lectura es menor a 10, se selecciona una velocidad mayor y/o un huso más grande.

Si se conoce la viscosidad aproximada de la muestra es más fácil y rápido referirse a la tabla de factores (Tabla 4) para encontrar la combinación adecuada huso/velocidad. El objetivo es seleccionar una combinación adecuada cuyo rango esté entre los valores mostrados en la tabla.

Para cualquier combinación huso-velocidad, el máximo rango disponible es igual al factor del huso multiplicado por 100. El rango mínimo recomendado es igual al factor multiplicado por 10.

Por ejemplo: el huso # 2 del LV a 12 rpm tiene un factor de 25. El rango máximo de esta combinación es 25 veces 100 o 2500 cp.

Cuando se efectúan pruebas múltiples, debe usarse la misma combinación huso – velocidad para todas las pruebas. Cuando una prueba se efectúa a diferentes velocidades, se selecciona un huso que produzca lecturas sobre la escala para todas las velocidades seleccionadas. Esto puede provocar el tener lecturas

menores a 10, lo cual es aceptable mientras se reconozca la reducción de precisión de tales lecturas.

Para obtener la viscosidad en cp (mPa.s) multiplicar la lectura en la carátula por el factor correspondiente. Ejemplo: huso # 1 a 1.5 rpm. Lectura = 50; Factor = 40. Viscosidad = $50 \times 40 = 2000$ cp (mPa.s).

Para obtener el rango de viscosidad para cualquier velocidad y huso, multiplicar el factor por 100.

★ Tamaño del recipiente.

Las mediciones con el viscosímetro requieren de un recipiente cuyo diámetro interno sea 83 mm o mayor. El recipiente usual es un vaso de griffin de 600 ml. Este último puede reemplazarse por un vaso de precipitados común de 600 ml con un diámetro interno de aproximadamente 83 mm. El uso de un recipiente más pequeño da por resultado un aumento en las lecturas.

Cuando se usa un recipiente más pequeño, la aproximación más simple es reportar las dimensiones del recipiente e ignorar los efectos de calibración. Mientras se use el mismo tamaño de recipiente para pruebas subsecuentes no habrá problema de corrección. Otra alternativa es calibrar por el efecto del tamaño del recipiente.

★ Muestra.

La muestra no deberá tener burbujas de aire y su temperatura deberá ser registrada y mantenerse constante a lo largo de la determinación. Si se trata de suspensiones, éstas deberán estar lo más homogéneas posible.

★ Inmersión del huso.

El huso deberá sumergirse hasta la mitad de la ranura que está en la varilla que conecta al cuerpo con el viscosímetro. Este procedimiento es riguroso.

★ Procedimiento de prueba.

El procedimiento para la prueba de cualquier fluido se hace considerando los siguientes pasos:

- 1) Unir el huso al cople roscado. Para ello es recomendable levantar ligeramente la flecha que tiene el cople, sosteniéndola firmemente con una mano mientras se atornilla el huso con la otra. Debe tenerse cuidado de no torcer o mover hacia atrás, adelante o hacia los lados el cople para evitar daño mecánico y desalineamiento.
- 2) Insertar o sumergir el huso en el material de prueba hasta que el nivel del fluido enrase con la marca del huso sobre la flecha del mismo. Es necesario algunas veces golpear ligeramente el instrumento mientras se sumerge el huso para evitar el atrapar aire sobre sus superficies. Resulta generalmente

más conveniente sumergir el huso en la muestra antes de unirlo al viscosímetro, ya que esto puede alterar la alineación.

- 3) Nivelar el viscosímetro con los tornillos que están en la base. El indicador de burbuja se usa para saber si el viscosímetro está o no nivelado. La burbuja debe estar colocada lo más concéntrica posible al círculo impreso sobre la mica del nivelador.
- 4) Seleccionar la velocidad angular con el botón selector. Oprimir la palanca de clutch y encender el motor del viscosímetro; el tener el clutch oprimido previene un desgaste innecesario del motor y los engranes de transmisión. Soltar la palanca del clutch y dejar que la carátula gire hasta que el indicador se estabilice en una posición fija sobre la carátula. El tiempo necesario para la estabilización depende de la velocidad a la que gire el huso; para velocidades mayores de 4 rpm esto generalmente toma entre 20 y 30 s, mientras que a velocidades menores puede tomar una revolución de la carátula. Es posible observar la posición del indicador y su estabilidad a bajas velocidades mientras la carátula gira. Sin embargo, a altas velocidades es necesario oprimir la palanca del clutch y apagar el motor con el indicador a la vista.
- 5) Si se quiere verificar las lecturas, arrancar el viscosímetro con el clutch oprimido, manteniendo la lectura original y soltarlo. Esto hará más rápidas las lecturas por oscilación del indicador. Si el indicador no se estabiliza, el material puede ser tixotrópico o su temperatura puede ser no constante.
- 6) La viscosidad del fluido se obtiene fácilmente consultando la tabla 4. Esta tabla es una reproducción de la tabla de factores proporcionada por el fabricante.
- 7) El manejo de los datos se hace de acuerdo al tipo de información que se desee obtener.

3. Método Brookfield.

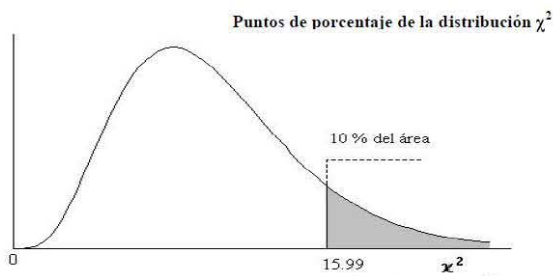
Las lecturas obtenidas en el viscosímetro se multiplican por un factor que se lee en la regleta de factores que acompaña el viscosímetro. En la Tabla 4 se reproducen dichos factores para el viscosímetro Brookfield LV. El resultado de la multiplicación es la viscosidad expresada en centipoises (cP). En el sistema internacional de unidades, la viscosidad (μ) se expresa en Pa.s. Para ello, 1 cP= 1 mPa.s. El factor se localiza con el modelo del viscosímetro (LV en este caso), el número de huso y la velocidad de rotación, N (rpm). En general, el método es sólo aplicable a fluidos de comportamiento newtoniano.

Tabla 4. Factores de viscosidad para el viscosímetro Brookfield LV.

| Vel (rpm) | Huso 1 | Huso 2 | Huso 3 | Huso 4 |
|-----------|--------|--------|--------|--------|
| 0.3 | 200 | 1000 | 4000 | 20000 |
| 0.6 | 100 | 500 | 2000 | 10000 |
| 1.5 | 40 | 200 | 800 | 4000 |
| 3 | 20 | 100 | 400 | 2000 |
| 6 | 10 | 50 | 200 | 1000 |
| 12 | 5 | 25 | 100 | 500 |
| 30 | 2 | 10 | 40 | 200 |
| 60 | 1 | 5 | 20 | 100 |

ANEXO C. TABLAS ESTADÍSTICAS UTILIZADAS

DISTRIBUCIÓN χ^2



Ejemplo:
Para $\phi = 10$ grados de libertad

$$P[\chi^2 > 15.99] = 0.10$$

| π ϕ | 0.995 | 0.99 | 0.975 | 0.95 | 0.9 | 0.75 | 0.5 | 0.25 | 0.1 | 0.05 | 0.025 | 0.01 | 0.005 | π ϕ |
|-----------------|----------|----------|----------|----------|----------|--------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-----------------|
| 1 | 3.93E-05 | 1.57E-04 | 9.82E-04 | 3.93E-03 | 1.58E-02 | 0.102 | 0.455 | 1.323 | 2.71 | 3.84 | 5.02 | 6.63 | 7.88 | 1 |
| 2 | 1.00E-02 | 2.01E-02 | 5.06E-02 | 0.103 | 0.211 | 0.575 | 1.386 | 2.77 | 4.61 | 5.99 | 7.38 | 9.21 | 10.60 | 2 |
| 3 | 7.17E-02 | 0.115 | 0.216 | 0.352 | 0.584 | 1.213 | 2.37 | 4.11 | 6.25 | 7.81 | 9.35 | 11.34 | 12.84 | 3 |
| 4 | 0.207 | 0.297 | 0.484 | 0.711 | 1.064 | 1.923 | 3.36 | 5.39 | 7.78 | 9.49 | 11.14 | 13.28 | 14.86 | 4 |
| 5 | 0.412 | 0.554 | 0.831 | 1.145 | 1.610 | 2.67 | 4.35 | 6.63 | 9.24 | 11.07 | 12.83 | 15.09 | 16.75 | 5 |
| 6 | 0.676 | 0.872 | 1.237 | 1.635 | 2.20 | 3.45 | 5.35 | 7.84 | 10.64 | 12.59 | 14.45 | 16.81 | 18.55 | 6 |
| 7 | 0.989 | 1.239 | 1.690 | 2.17 | 2.83 | 4.25 | 6.35 | 9.04 | 12.02 | 14.07 | 16.01 | 18.48 | 20.3 | 7 |
| 8 | 1.344 | 1.647 | 2.18 | 2.73 | 3.49 | 5.07 | 7.34 | 10.22 | 13.36 | 15.51 | 17.53 | 20.1 | 22.0 | 8 |
| 9 | 1.735 | 2.09 | 2.70 | 3.33 | 4.17 | 5.90 | 8.34 | 11.39 | 14.68 | 16.92 | 19.02 | 21.7 | 23.6 | 9 |
| 10 | 2.16 | 2.56 | 3.25 | 3.94 | 4.87 | 6.74 | 9.34 | 12.55 | 15.99 | 18.31 | 20.5 | 23.2 | 25.2 | 10 |
| 11 | 2.60 | 3.05 | 3.82 | 4.57 | 5.58 | 7.58 | 10.34 | 13.70 | 17.28 | 19.68 | 21.9 | 24.7 | 26.8 | 11 |
| 12 | 3.07 | 3.57 | 4.40 | 5.23 | 6.30 | 8.44 | 11.34 | 14.85 | 18.55 | 21.0 | 23.3 | 26.2 | 28.3 | 12 |
| 13 | 3.57 | 4.11 | 5.01 | 5.89 | 7.04 | 9.30 | 12.34 | 15.98 | 19.81 | 22.4 | 24.7 | 27.7 | 29.8 | 13 |
| 14 | 4.07 | 4.66 | 5.63 | 6.57 | 7.79 | 10.17 | 13.34 | 17.12 | 21.1 | 23.7 | 26.1 | 29.1 | 31.3 | 14 |
| 15 | 4.60 | 5.23 | 6.26 | 7.26 | 8.55 | 11.04 | 14.34 | 18.25 | 22.3 | 25.0 | 27.5 | 30.6 | 32.8 | 15 |
| 16 | 5.14 | 5.81 | 6.91 | 7.96 | 9.31 | 11.91 | 15.34 | 19.37 | 23.5 | 26.3 | 28.8 | 32.0 | 34.3 | 16 |
| 17 | 5.70 | 6.41 | 7.56 | 8.67 | 10.09 | 12.79 | 16.34 | 20.5 | 24.8 | 27.6 | 30.2 | 33.4 | 35.7 | 17 |
| 18 | 6.26 | 7.01 | 8.23 | 9.39 | 10.86 | 13.68 | 17.34 | 21.6 | 26.0 | 28.9 | 31.5 | 34.8 | 37.2 | 18 |
| 19 | 6.84 | 7.63 | 8.91 | 10.12 | 11.65 | 14.56 | 18.34 | 22.7 | 27.2 | 30.1 | 32.9 | 36.2 | 38.6 | 19 |
| 20 | 7.43 | 8.26 | 9.59 | 10.85 | 12.44 | 15.45 | 19.34 | 23.8 | 28.4 | 31.4 | 34.2 | 37.6 | 40.0 | 20 |
| 21 | 8.03 | 8.90 | 10.28 | 11.59 | 13.24 | 16.34 | 20.3 | 24.9 | 29.6 | 32.7 | 35.5 | 38.9 | 41.4 | 21 |
| 22 | 8.64 | 9.54 | 10.98 | 12.34 | 14.04 | 17.24 | 21.3 | 26.0 | 30.8 | 33.9 | 36.8 | 40.3 | 42.8 | 22 |
| 23 | 9.26 | 10.20 | 11.69 | 13.09 | 14.85 | 18.14 | 22.3 | 27.1 | 32.0 | 35.2 | 38.1 | 41.6 | 44.2 | 23 |
| 24 | 9.89 | 10.86 | 12.40 | 13.85 | 15.66 | 19.04 | 23.3 | 28.2 | 33.2 | 36.4 | 39.4 | 43.0 | 45.6 | 24 |
| 25 | 10.52 | 11.52 | 13.12 | 14.61 | 16.47 | 19.94 | 24.3 | 29.3 | 34.4 | 37.7 | 40.6 | 44.3 | 46.9 | 25 |
| 26 | 11.16 | 12.20 | 13.84 | 15.38 | 17.29 | 20.8 | 25.3 | 30.4 | 35.6 | 38.9 | 41.9 | 45.6 | 48.3 | 26 |
| 27 | 11.81 | 12.88 | 14.57 | 16.15 | 18.11 | 21.7 | 26.3 | 31.5 | 36.7 | 40.1 | 43.2 | 47.0 | 49.6 | 27 |
| 28 | 12.46 | 13.56 | 15.31 | 16.93 | 18.94 | 22.7 | 27.3 | 32.6 | 37.9 | 41.3 | 44.5 | 48.3 | 51.0 | 28 |
| 29 | 13.12 | 14.26 | 16.05 | 17.71 | 19.77 | 23.6 | 28.3 | 33.7 | 39.1 | 42.6 | 45.7 | 49.6 | 52.3 | 29 |
| 30 | 13.79 | 14.95 | 16.79 | 18.49 | 20.6 | 24.5 | 29.3 | 34.8 | 40.3 | 43.8 | 47.0 | 50.9 | 53.7 | 30 |
| 40 | 20.7 | 22.2 | 24.4 | 26.5 | 29.1 | 33.7 | 39.3 | 45.6 | 51.8 | 55.8 | 59.3 | 63.7 | 66.8 | 40 |
| 50 | 28.0 | 29.7 | 32.4 | 34.8 | 37.7 | 42.9 | 49.3 | 56.3 | 63.2 | 67.5 | 71.4 | 76.2 | 79.5 | 50 |
| 60 | 35.5 | 37.5 | 40.5 | 43.2 | 46.5 | 52.3 | 59.3 | 67.0 | 74.4 | 79.1 | 83.3 | 88.4 | 92.0 | 60 |
| 70 | 43.3 | 45.4 | 48.8 | 51.7 | 55.3 | 61.7 | 69.3 | 77.6 | 85.5 | 90.5 | 95.0 | 100.4 | 104.2 | 70 |
| 80 | 51.2 | 53.5 | 57.2 | 60.4 | 64.3 | 71.1 | 79.3 | 88.1 | 96.6 | 101.9 | 106.6 | 112.3 | 116.3 | 80 |
| 90 | 59.2 | 61.8 | 65.6 | 69.1 | 73.3 | 80.6 | 89.3 | 98.6 | 107.6 | 113.1 | 118.1 | 124.1 | 128.3 | 90 |
| 100 | 67.3 | 70.1 | 74.2 | 77.9 | 82.4 | 90.1 | 99.3 | 109.1 | 118.5 | 124.3 | 129.6 | 135.8 | 140.2 | 100 |
| Z_{α} | -2.58 | -2.33 | -1.96 | -1.64 | -1.28 | -0.674 | 0.000 | 0.674 | 1.282 | 1.645 | 1.96 | 2.33 | 2.58 | Z_{α} |

Para $\phi > 100$ tócese $\chi^2 = \frac{1}{2} (Z_{\alpha} + \sqrt{2\phi - 1})^2$. Z_{α} es la desviación normal estandarizada correspondiente al nivel de significancia y se muestra en la parte superior de la tabla.

TABLAS EMPLEADAS PARA LA PRUEBA DE ORDENAMIENTO

TABLA G.2. Diferencia de sumatoria ordinal absoluta critica de “todos los tratamientos”. Comparaciones al nivel de significancia del 1%

| Jueces | Número de muestras | | | | | | | | | |
|--------|--------------------|----|----|----|----|----|----|-----|-----|-----|
| | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
| 3 | — | 9 | 12 | 14 | 17 | 19 | 22 | 24 | 27 | 30 |
| 4 | 8 | 11 | 14 | 17 | 20 | 23 | 26 | 29 | 32 | 36 |
| 5 | 9 | 13 | 16 | 19 | 23 | 26 | 30 | 33 | 37 | 41 |
| 6 | 10 | 14 | 18 | 21 | 25 | 29 | 33 | 37 | 41 | 45 |
| 7 | 11 | 15 | 19 | 23 | 28 | 32 | 36 | 40 | 45 | 49 |
| 8 | 12 | 16 | 21 | 25 | 30 | 34 | 39 | 43 | 48 | 53 |
| 9 | 13 | 17 | 22 | 27 | 32 | 36 | 41 | 46 | 51 | 56 |
| 10 | 13 | 18 | 23 | 28 | 33 | 38 | 44 | 49 | 54 | 59 |
| 11 | 14 | 19 | 24 | 30 | 35 | 40 | 46 | 51 | 57 | 63 |
| 12 | 15 | 20 | 26 | 31 | 37 | 42 | 48 | 54 | 60 | 66 |
| 13 | 15 | 21 | 27 | 32 | 38 | 44 | 50 | 56 | 62 | 68 |
| 14 | 16 | 22 | 28 | 34 | 40 | 46 | 52 | 58 | 65 | 71 |
| 15 | 16 | 22 | 28 | 35 | 41 | 48 | 54 | 60 | 67 | 74 |
| 16 | 17 | 23 | 30 | 36 | 43 | 49 | 56 | 63 | 70 | 77 |
| 17 | 17 | 24 | 31 | 37 | 44 | 51 | 58 | 65 | 72 | 79 |
| 18 | 18 | 25 | 31 | 38 | 45 | 52 | 60 | 67 | 74 | 81 |
| 19 | 18 | 25 | 32 | 39 | 46 | 54 | 61 | 69 | 76 | 84 |
| 20 | 19 | 26 | 33 | 40 | 48 | 55 | 63 | 70 | 78 | 86 |
| 21 | 19 | 27 | 34 | 41 | 49 | 56 | 64 | 72 | 80 | 88 |
| 22 | 20 | 27 | 35 | 42 | 50 | 58 | 66 | 74 | 82 | 90 |
| 23 | 20 | 28 | 35 | 43 | 51 | 59 | 67 | 75 | 84 | 92 |
| 24 | 21 | 28 | 36 | 44 | 52 | 60 | 69 | 77 | 85 | 94 |
| 25 | 21 | 29 | 37 | 45 | 53 | 62 | 70 | 79 | 87 | 96 |
| 26 | 22 | 29 | 38 | 46 | 54 | 63 | 71 | 80 | 89 | 98 |
| 27 | 22 | 30 | 38 | 47 | 55 | 64 | 73 | 82 | 91 | 100 |
| 28 | 22 | 31 | 39 | 48 | 56 | 65 | 74 | 83 | 92 | 101 |
| 29 | 23 | 31 | 40 | 48 | 57 | 66 | 75 | 85 | 94 | 103 |
| 30 | 23 | 32 | 40 | 49 | 58 | 67 | 77 | 86 | 95 | 105 |
| 31 | 23 | 32 | 41 | 50 | 59 | 69 | 78 | 87 | 97 | 107 |
| 32 | 24 | 33 | 42 | 51 | 60 | 70 | 79 | 89 | 99 | 108 |
| 33 | 24 | 33 | 42 | 52 | 61 | 71 | 80 | 90 | 100 | 110 |
| 34 | 25 | 34 | 43 | 52 | 62 | 72 | 82 | 92 | 102 | 112 |
| 35 | 25 | 34 | 44 | 53 | 63 | 73 | 83 | 93 | 103 | 113 |
| 36 | 25 | 35 | 44 | 54 | 64 | 74 | 84 | 94 | 105 | 115 |
| 37 | 26 | 35 | 45 | 55 | 65 | 75 | 85 | 95 | 106 | 117 |
| 38 | 26 | 36 | 45 | 55 | 66 | 76 | 86 | 97 | 107 | 118 |
| 39 | 26 | 36 | 46 | 56 | 66 | 77 | 87 | 98 | 109 | 120 |
| 40 | 27 | 36 | 47 | 57 | 67 | 78 | 88 | 99 | 110 | 121 |
| 41 | 27 | 37 | 47 | 57 | 68 | 79 | 90 | 100 | 112 | 123 |
| 42 | 27 | 37 | 48 | 58 | 69 | 80 | 91 | 102 | 113 | 124 |
| 43 | 28 | 38 | 48 | 59 | 70 | 81 | 92 | 103 | 114 | 126 |
| 44 | 28 | 38 | 49 | 60 | 70 | 82 | 93 | 104 | 115 | 127 |
| 45 | 28 | 39 | 49 | 60 | 71 | 82 | 94 | 105 | 117 | 128 |

Continua

TABLA G.2. Continuación

| <i>Jueces</i> | <i>Número de muestras</i> | | | | | | | | | |
|---------------|---------------------------|----|----|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
| 46 | 28 | 39 | 50 | 61 | 72 | 83 | 95 | 106 | 118 | 130 |
| 47 | 29 | 39 | 50 | 62 | 73 | 84 | 96 | 108 | 119 | 131 |
| 48 | 29 | 40 | 51 | 62 | 74 | 85 | 97 | 109 | 121 | 133 |
| 49 | 29 | 40 | 51 | 63 | 74 | 86 | 98 | 110 | 122 | 134 |
| 50 | 30 | 41 | 52 | 63 | 75 | 87 | 99 | 111 | 123 | 135 |
| 65 | 34 | 46 | 59 | 72 | 86 | 99 | 113 | 126 | 140 | 154 |
| 70 | 35 | 48 | 61 | 75 | 89 | 103 | 117 | 131 | 146 | 160 |
| 75 | 36 | 50 | 64 | 78 | 92 | 106 | 121 | 136 | 151 | 166 |
| 80 | 37 | 51 | 66 | 80 | 95 | 110 | 125 | 140 | 156 | 171 |
| 85 | 38 | 53 | 68 | 83 | 98 | 113 | 129 | 144 | 160 | 176 |
| 90 | 40 | 54 | 70 | 85 | 101 | 116 | 132 | 149 | 165 | 181 |
| 95 | 41 | 56 | 71 | 87 | 103 | 120 | 136 | 153 | 169 | 186 |
| 100 | 42 | 57 | 73 | 89 | 106 | 123 | 140 | 157 | 174 | 191 |