



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

***L. lactis ssp. lactis* y *Lb. acidophilus* inmovilizados en un soporte de celulosa para la producción de una bebida tipo yogurt.**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**QUÍMICA DE ALIMENTOS**

**PRESENTA**

**MARISOL MORALES FLORES**

**DIRECTOR DE TESIS**

**M. EN C. PABLO PÉREZ GAVILÁN ESCALANTE**



**Ciudad Universitaria, CD. MX., 2016**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

**JURADO ASIGNADO:**

- PRESIDENTE:** M. en C. Lucia Cornejo Barrera
- VOCAL:** Q.F.B. Rodolfo Fonseca Larios
- SECRETARIO:** M. en C. Pablo Pérez Gavilán Escalante
- 1er. SUPLENTE:** Dra. Carmina Montiel Pacheco
- 2° SUPLENTE:** M. en C. Tania Gómez Sierra

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

**Instituto de Investigaciones Biomédicas. UNAM**

**ASESOR DEL TEMA:**

**M. en C. Pablo Pérez Gavilán Escalante** \_\_\_\_\_

**SUPERVISOR TÉCNICO:**

**Q. A. Luis Macedo Segura** \_\_\_\_\_

**SUSTENTANTE:**

**Marisol Morales Flores** \_\_\_\_\_

## AGRADECIMIENTOS

*A mis padres, por la educación y valores que me han inculcado y que me han formado como la persona que soy, gracias por su apoyo económico y moral, por su esfuerzo y sacrificio que han hecho día a día para que pueda cumplir mis metas, este logro también es suyo.*

*A mi hermana Belén, gracias por el apoyo incondicional, por los consejos y por ser un ejemplo a seguir.*

*A mi asesor el Dr. Pablo y a Luis por darme la oportunidad de trabajar con ustedes, por los conocimientos compartidos, gracias por su apoyo, paciencia y confianza.*

*A mis amigos en general que a pesar del tiempo y distancia me han acompañado en este camino brindándome su apoyo, sus consejos y lo más valioso, su amistad.*

*A Gabriel, gracias por tu apoyo y comprensión, por estar presente en esta etapa de mi vida, por apoyarme y ayudarme en cada paso que doy.*

*A todas las personas que han influido de alguna manera en mi formación académica, profesional, y personal.*

*Gracias.*

# ÍNDICE

---

	Página
<b>1. Introducción.....</b>	<b>1</b>
<b>2. Objetivos.....</b>	<b>2</b>
<b>3. Marco Teórico.....</b>	<b>3</b>
3.1 Leche.....	3
3.2 Secreción de la leche y estructura de la glándula mamaria.....	3
3.3 Composición química de la leche.....	6
3.3.1 Agua.....	7
3.3.2 Lípidos.....	7
3.3.3 Proteínas.....	11
3.3.4 Lactosa.....	17
3.3.5 Vitaminas.....	17
3.3.6 Sales y compuestos inorgánicos.....	18
3.3.7 Enzimas.....	18
3.4 Microbiología de la leche .....	19
3.5 Industrialización de la leche.....	21
3.6 Leche Fermentada.....	28
3.6.1 Leche acidófila .....	29
3.6.2 Yogurt.....	29
3.7 Bacterias lácticas.....	33
3.7.1 Género <i>Lactococcus</i> .....	36
3.7.2 <i>Lactococcus lactis ssp. lactis</i> .....	37
3.8 Probióticos.....	38
3.8.1 Género <i>Lactobacillus</i> .....	40
3.8.2 <i>Lactobacillus acidophilus</i> .....	40
3.9 Inmovilización celular.....	43
3.9.1 Técnicas de Inmovilización celular.....	45
<b>4. Material y Metodología .....</b>	<b>47</b>
4.1 Materiales.....	47
4.1.1 Microorganismos empleados.....	47

4.1.2	Medios de cultivo.....	47
4.1.3	Soporte sólido.....	48
4.1.4	Leches empleadas.....	48
4.2	Metodología.....	50
4.2.1	Reactivación de <i>Lactobacillus acidophilus</i> .....	50
4.2.2	Propagación de <i>Lactococcus lactis ssp. lactis</i> .....	51
4.2.3	Curva de crecimiento de <i>Lb. acidophilus</i> y <i>L. lactis ssp. lactis</i> .....	51
4.2.4	Activación de <i>Lb. acidophilus</i> en medio industrial.....	52
4.2.5	Inmovilización de <i>Lb. acidophilus</i> y <i>L. lactis ssp. lactis</i> .....	52
4.2.6	Cuantificación bacteriana antes y después de la inmovilización.....	53
4.2.7	Aplicación del dispositivo en diferentes tipos de leche y a diferentes temperaturas.....	54
4.2.8	Evolución de pH, acidez y viscosidad al aplicar el dispositivo en diferentes tipos de leche a temperatura ambiente.....	55
4.2.9	Evaluación sensorial.....	56
4.2.9.1	Prueba de preferencia del dispositivo mezcla: <i>Lb. acidophilus/L. lactis ssp. lactis</i> en diferentes tipos de leche.....	56
4.2.9.2	Comparación entre dos bebidas tipo yogur elaboradas con diferentes dispositivos: Prueba triangular y de preferencia.....	57
4.2.10	Vida de anaquel del dispositivo mezcla <i>Lb. acidophilus/L. lactis ssp. lactis</i> .....	59
5.	Resultados y discusión.....	61
5.1	Curva de crecimiento.....	61
5.2	Cuantificación bacteriana antes y después de la inmovilización.....	63
5.3	Aplicación del dispositivo en diferentes tipos de leche a diferentes temperaturas.....	63
5.4	Evolución de pH, acidez y viscosidad al aplicar el dispositivo en diferentes tipos de leche a temperatura ambiente.....	74
5.5	Evaluación Sensorial.....	81

5.5.1 Prueba de preferencia de las bebidas tipo yogur elaboradas con el dispositivo <i>Lb. acidophilus/L. lactis ssp. lactis</i> en diferentes tipos de leche.....	81
5.5.2 Comparación entre dos bebidas tipo yogur elaboradas con diferentes dispositivos: Prueba triangular y de preferencia.....	86
5.6 Vida de anaquel del dispositivo <i>Lb. acidophilus/L. lactis ssp. lactis</i> .....	91
<b>6. Conclusiones.....</b>	<b>96</b>
<b>7. Bibliografía.....</b>	<b>98</b>
<b>8. Anexo.....</b>	<b>106</b>

# 1. INTRODUCCIÓN

---

Es sabido todos los beneficios para la salud que se les atribuye a las bacterias lácticas, llamados probióticos. Los probióticos son microorganismos vivos que se encuentran en algunos productos alimentarios, y cuyo consumo en cantidades suficientes puede ser beneficioso para la salud. Los probióticos contribuyen al mantenimiento de un equilibrio saludable de bacterias dentro del tracto gastrointestinal, son productores de antimicrobianos, eliminación de la flora nociva y/o patógena, estos beneficios mencionados son atribuibles a las bacterias lácticas vivas, es decir, metabólicamente activas y capaces de reproducirse.

Existen en el mercado diferentes productos que dicen tener bacterias lácticas, como el yogurt en diferentes presentaciones, sin embargo, existe la duda de que las bacterias lácticas llegan vivas al consumidor y en concentraciones suficientes como para obtener los beneficios ya mencionados, ya que las bacterias lácticas sufren una serie de cambios desde su producción hasta su consumo, pasando por una serie de manipulaciones que modifican las condiciones de sobrevivencia. Por tanto, el punto importante no es si el producto los posee o no, sino en qué cantidad y con qué actividad metabólica.

En estudios previos se ha visto que es posible conservar las bacterias lácticas desecadas y fijadas en un soporte de celulosa, además se han realizado estudios con *Lactococcus lactis ssp. lactis* con buenos resultados en la fijación y producción de bebida tipo yogurt por lo que partiendo de ello se desarrolló un dispositivo práctico y comercialmente viable con el que se pueda producir una bebida tipo yogurt que garantice la presencia de bacterias lácticas vivas en cantidad y metabólicamente activas para ejercer su acción prebiótica.



## 2. OBJETIVOS

---

### OBJETIVO:

- Desarrollar un dispositivo a base de *Lactobacillus acidophilus* y *Lactococcus lactis ssp. lactis* inmovilizadas en un soporte sólido de celulosa que sea práctico de utilizar y con la cantidad necesaria de ambas cepas para ser aplicado en leche y obtener una bebida tipo yogurt con los beneficios de ambas bacterias.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Inmovilización de *Lactobacillus acidophilus* y *Lactococcus lactis ssp. lactis*
- Determinar la viabilidad de las bacterias secadas en el dispositivo.
- Evaluar el efecto del dispositivo en diferentes tipos de leche entera con diferentes tratamientos térmicos.
- Realizar pruebas sensoriales para la bebida tipo yogur elaborada con el dispositivo.
- Comparar las características de la bebida tipo yogur elaborado con *Lb. acidophilus/L. lactis ssp. lactis* con otra bebida elaborada en estudios previos.
- Determinar la vida de anaquel del dispositivo *Lb. acidophilus/L. lactis ssp. lactis* almacenado a 4°C.

## **3. MARCO TEÓRICO**

---

### **3.1 Leche.**

De acuerdo con la norma NOM-155-SCFI-2012, la leche se define como, “el producto obtenido de la secreción de las glándulas mamarias de las vacas, sin el 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.

### **3.2 Secreción de la leche y estructura de la glándula mamaria.**

La ubre de los mamíferos cuadrúpedos, por su ubicación ventral, está diseñada para ofrecer al neonato un fácil acceso a la leche. En la vaca se encuentra suspendida por fuera de la pared del abdomen posterior. Es una glándula cutánea exocrina, debido a que la leche es sintetizada en células especializadas agrupadas en alveolos, y luego excretadas fuera del cuerpo por medio de un sistema de conductos

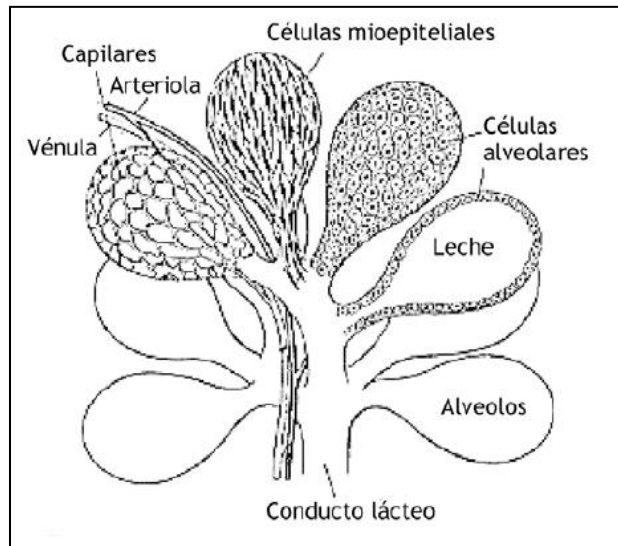
La ubre bovina está constituida por cuatro glándulas mamarias, mejor conocidas como cuatro cuartos, Cada cuarto es una unidad funcional en sí misma que opera independientemente y drena la leche por medio de su propio canal (Gasque, 2008).

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 un número de 4 a 8 que radia en varias direcciones 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 unos nuevos dobles 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).

El alveolo es la unidad funcional de producción. Este es una esfera hueca cuya pared es una sola capa de células secretas de leche agrupadas. Los capilares sanguíneos y

células mioepiteliales rodean el alveolo, y la leche secretada se encuentra en la cavidad interna (lumen) Figura 1.



Fuente: Gasque, 2008

**Figura 1. Estructura alveolar de la glándula mamaria.**

Las funciones del alveolo son:

- a) Recepción de los nutrientes o precursores circulantes en la sangre,
- b) Transformación de los precursores en nutrientes de la leche,
- c) Descarga de la leche dentro del lumen.

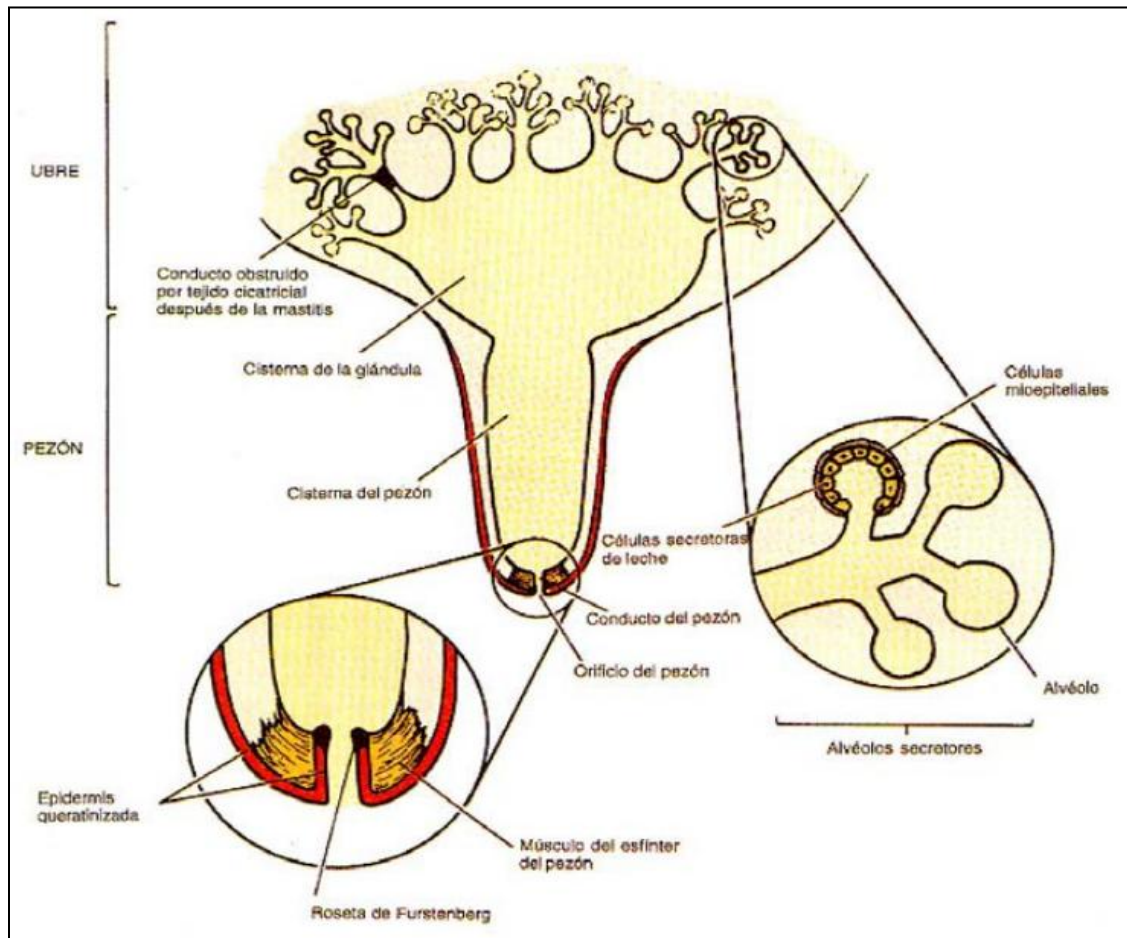
Tanto los conductos terminales como los alveolos son microscópicos, y se componen de una capa simple de células epiteliales. La función de las células que forman estas estructuras es la de retirar nutrientes de la sangre, transformarlos en leche y descargar esta última en el lumen de cada alveolo.

En torno a cada alveolo hay una red capilar que suministra sangre que contiene nutrientes y hormonas para la síntesis de la leche, y retira productos de desecho de las células alveolares. De igual forma, hay una red de células musculares especializadas, las mioepiteliales, que son las que envuelven a cada alveolo. Esto se contrae en respuesta a la hormona oxitocina, obligando a la leche del lumen del alveolo a entrar a los conductos y a la cisterna glandular de los pezones (Gasque, 2008).

La secreción de la leche está regulada principalmente por mecanismos hormonales. Sin embargo, la excreción de la leche se inicia a través de mecanismos nerviosos. El proceso de evacuación de la leche involucra un reflejo involuntario nervioso hormonal. El estímulo nervioso resultante de la palpitación del pezón mamado, y otro estímulo que en un mamífero asocia con el acto de ordeño llega al sistema nervioso central o lo largo de los nervios somáticos, hacia la medula y de allí al hipotálamo y causa la liberación de oxitocina y en menor grado de vasopresina del lóbulo posterior (Ávila, 2010).

La leche deja el lumen por medio de un tubo colector. Un lóbulo es un grupo de entre 10 a 100 alveolos que drenan por medio de un conducto en común. Los lóbulos en sí se encuentran organizados en unidades de mayor tamaño, que descargan la leche dentro de un conducto colector que conduce a la cisterna de la glándula, que descansa directamente encima del pezón de la glándula.

El pezón forma una especie de ducto ensanchado proyectado a la superficie de cada glándula y por medio del cual la leche puede ser extraída de la misma. Posee una piel suave que lo recubre y un vasto sistema de inervación e irrigación sanguínea. La punta de la teta se cierra con un anillo de músculo liso o esfínter llamado canal del pezón (Gasque, 2008). En la Figura 2 se muestra el esquema de la ubre y el pezón.



Fuente: Gasque, 2008.

**Figura 2. Esquema de ubre y pezón (Conductos y sistema secretor de leche)**

### 3.3 Composición química de la leche

Inmediatamente después del parto, la vaca empieza con las secreciones mamarias, durante los primeros dos o tres días produce el calostro, que es un líquido con alto contenido de sólidos, de fuerte olor y sabor amargo, abundante en inmunoglobulinas. La leche está constituida por agua, grasas, proteínas, azúcares, vitaminas y minerales. Los porcentajes varían dependiendo de factores tales como la raza y edad de la vaca, tipo y frecuencia de alimentación, estado de lactación, enfermedades, entre otros. En el cuadro 1, se muestra la composición promedio (Badui, 2006).

**Cuadro 1. Composición de la leche de vaca**

<b>Componente</b>	<b>Porcentaje</b>
<b>Agua</b>	86.6%
<b>Grasa</b>	4.1%
<b>Proteínas</b>	3.6%
<b>Lactosa</b>	5.0%
<b>Cenizas</b>	0.7%

Fuente: Fennema, 2010.

### **3.3.1 Agua**

El agua es el componente mayoritario de la leche, aproximadamente 87.5%, la cual constituye la fase continua de la leche, su función es actuar como disolvente de los otros componentes, como la lactosa y las sales (Keating, 1999).

### **3.3.2 Lípidos.**

La grasa presente en la leche de vaca se caracteriza por contener una mezcla de triglicéridos. El 50% de los ácidos grasos, son aproximadamente de cadena corta (C4-C14) y el resto de los ácidos grasos de cadena larga (C16, C20) (Ávila 2010).

La grasa es sintetizada por el retículo sacorplásmico y es dirigida hacia el lado citoplásmico de la membrana donde es colectada como gotitas lipídicas, sólo 25% de los ácidos grasos que la componen son originado de la dieta, los demás son sintetizados en la célula secretora. Hay dos mecanismos que intervienen en la síntesis de los ácidos grasos. El primer mecanismo se considera el 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  $\beta$ -hidroxibutírico como el elemento a partir del cual la síntesis de ácidos grasos comienza.

El mecanismo exacto de la elongación o crecimiento de la cadena en la glándula mamaria, así como la naturaleza de los pasos reductivos intermedios no se ha establecido todavía, un mecanismo propuesto es el siguiente (Pérez-Gavilán, 1984):

- 1) Tanto la malonil CoA como la acetil CoA, 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 reducción, deshidratación y una nueva reducción para formar un compuesto C<sub>4</sub> saturado unido a la enzima, o por una condensación repetida de múltiples grupos malonil en la unidad acetil para formar un compuesto ceto unido a la enzima. Los grupos carbonilos del compuesto cetil son entonces reducidos, deshidratados y reducidos nuevamente al acil saturado que se disocia en un ácido graso libre.

Mientras que las enzimas de la glándula mamaria están caracterizadas en forma incompleta, existe alguna evidencia de que la ruta 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).

La fracción de lípidos está representada por un gran número de sustancias solubles en disolventes orgánicos, aun cuando el 96 a 98% corresponden al grupo de los triacilglicéridos. Otros lípidos que se encuentran en concentraciones menores son; diacilglicéridos, monoacilglicéridos, fosfolípidos, ácidos grasos libres, esteroides y sus ésteres y algunos hidrocarburos, en el cuadro 2 se muestran los porcentajes (Badui, 2006).

**Cuadro 2. Lípidos de la leche de vaca.**

	<b>Porcentaje total de lípidos</b>	<b>Concentración (g/L)</b>
<b>Triacilglicéridos</b>	96-98	31.0
<b>Diacilglicéridos</b>	2.10	0.72
<b>Monoacilglicéridos</b>	0.08	0.03
<b>Fosfolípidos</b>	1.10	0.35
<b>Ácidos grasos libres</b>	0.20	0.08

<b>Colesterol</b>	0.45	0.15
<b>Hidrocarburos</b>	Rastros	Rastros
<b>Ésteres de esteroides</b>	Rastros	Rastros

Fuente: Badui, 2006.

### ▀ **Fosfolípidos.**

Los fosfolípidos representan aproximadamente el 1% del total de los lípidos de la leche, el cual corresponden a una concentración promedio de 0.35% g/L y está constituido principalmente por lecitina (34%), cefalina (28%) y esfingomielina (30%), además de fosfatidilinositol y fosfatidilserina. En general, sus ácidos grasos presentan una cadena mayor a 14C y son constantes, ya que no varían tanto como los triacilglicéridos, los saturados más importantes son el palmítico y el esteárico, y los insaturados, el oleico y el linoleico.

A pesar de su baja concentración, los fosfolípidos cumplen varias funciones biológicas y, además, afectan la estabilidad de la leche; actúan como emulsionantes naturales de los glóbulos de la grasa y la estabilizan, y por ser ricos en ácidos insaturados, se oxidan fácilmente (Badui, 2006).

### ▀ **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 de 0.1 hasta 20 micras de diámetro. La estabilidad de los 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 (MMG), está compuesta de lípidos polares y neutros, enzimas, glicoproteínas y trazas de diferentes elementos (Pérez-Gavilán, 1984).

El glóbulo graso consta de un núcleo lipídico compuesto casi exclusivamente por triacilglicéridos, una capa de algunas proteínas citoplasmáticas adsorbidas antes de la secreción y una membrana plasmática de revestimiento exterior. Sin embargo, la



membrana plasmática no recubre al glóbulo porque algunas proteínas citoplásmicas también se encuentran en la superficie externa (Fennema, 2010).

La grasa contenida en el interior de la membrana del glóbulo graso está formada principalmente de triglicéridos, con di y monoglicéridos, así como ácidos grasos libres en cantidades menores.

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.

La composición de los aminoácidos de las proteínas de la MMG 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.

La cantidad de enzimas presentes en el glóbulo graso se ve influida por numerosos factores que incluyen como es estado de lactación, especie y enfermedades de la ubre. Muchas enzimas se originan del retículo endoplásmico o del plasmalema de la célula secretora de la glándula mamaria.

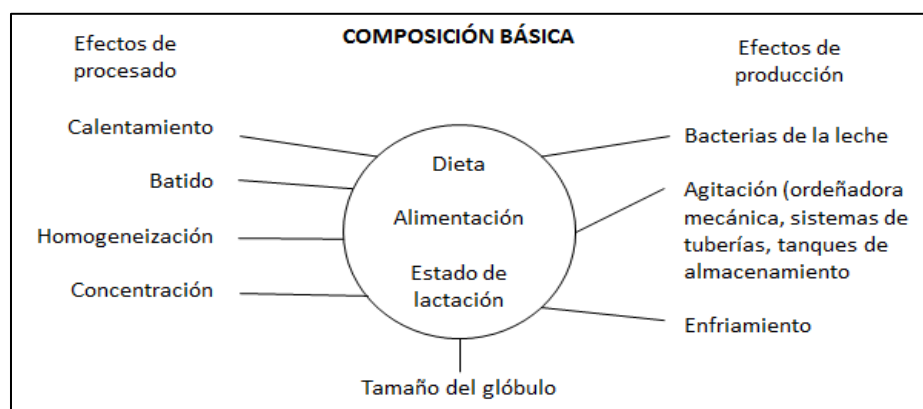
Altos niveles de cobre, molibdeno, zinc y fierro, así como bajos niveles de calcio y magnesio se encuentran asociados a la MGG (Pérez-Gavilán 1984).

La estabilidad del glóbulo de grasa depende de las propiedades de la MMG. Estas propiedades, a su vez, dependen de la composición de la membrana, las propiedades de los fosfolípidos, especialmente esfingomielina, así como del tamaño de la cadena y el grado de instauración de los ácidos grasos libres o fosfolípidos tienen importancia vital en los procesos de estabilización de la membrana del glóbulo graso.

Los fosfolípidos y las 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 a la superficie (Fennema, 2010).

La difracción de la luz por estos glóbulos es responsable del aspecto “cremoso” de la leche entera. Durante la secreción de los glóbulos de grasa a través de la membrana plasmática, los glóbulos adquieren un revestimiento de la membrana plasmática que sirve para estabilizar la emulsión de aceite en agua. Esta membrana de cobertura contiene proteínas de la membrana celular, incluidos las enzimas, y casi el 70% de los fosfolípidos y el 85% del colesterol de la leche. Debido a que los glóbulos grasos

tienen menor densidad que la fase acuosa de la leche, ascienden espontáneamente a la superficie líquida originando la “nata” a consecuencia el “descremado” de la leche no homogeneizada. No obstante el descremado ocurre más rápidamente de lo que es predecible a partir del tamaño de los glóbulos grasos individuales. Este incremento de la velocidad de descremado se debe al agrupamiento de glóbulos grasos por interacción de proteínas de la membrana con inmunoglobulinas y proteínas de vesículas membranosas de la leche descremada. Los grandes agregados, ascienden mucho más rápido que los glóbulos individuales (Fennema, 2010). La composición de la MMG se puede modificar por dos tipos de variables, las variables endógenas o factores directamente relacionados con la vaca, y los factores exógenos, como se muestra en la figura 3 (Pérez-Gavilán 1984).



Fuente: Pérez-Gavilán 1984.

**Figura 3. Factores que alteran la composición del glóbulo graso en la leche de bovino.**

### 3.3.3 Proteínas.

Las proteínas son elementos constitutivos esenciales de toda célula y tienen una gran importancia en la leche y los productos lácteos. La leche contiene como término medio un 3.2% de proteínas de las que el 80% son caseínas, y las proteínas del suero o seroproteínas son corresponden al 20% restante.

Las proteínas son polímeros de aminoácidos y algunas contienen además otros componentes.

Los aminoácidos son sustancias orgánicas nitrogenadas de carácter anfótero, ya que poseen a la vez un grupo carboxílico (ácido) y un grupo amino (básico). Una característica de todos los aminoácidos es que el grupo amino siempre está fijado sobre el carbono común al grupo carboxílico. Por esta razón se les llama  $\alpha$ -aminoácidos.

Los aminoácidos que componen las proteínas de la leche son 19. De entre ellos, algunos son hidrocarburos alifáticos y otros tienen grupos funcionales adicionales.

En algunos aminoácidos encontramos grupos alcohol, sulfhidrilo, amido, aromático y otros; estas funciones son el origen de las propiedades que caracterizan y diferencian a las diferentes proteínas (Amiot, 1991).

Debido a que las caseínas y las proteínas del suero están estabilizadas por diferentes mecanismos en el seno de la leche, es sencillo separarlas mediante la manipulación de parámetros como pH, temperatura y fuerza iónica, y con el uso de sustancias como la urea, de tal manera que se obtienen todas las fracciones que se indican en el cuadro 3 (Badui, 2006).

**Cuadro 3. Distribución de las proteínas de la leche.**

	<b>Total de proteínas (%)</b>	<b>Peso molecular</b>	<b>Número de aminoácidos</b>	<b>Punto isoeléctrico</b>
<b>Caseínas</b>	80			4.1
$\alpha$	34	23,612	199	
$\alpha$	8	25,228	207	4.5
$\beta$	25	23,980	209	4.1
$\kappa$	9	19,005	169	5.8
$\gamma$	4			
<b>Proteínas del suero</b>	20			
$\beta$ -lactoglobulina	9	18,263	162	5.3
$\alpha$ -lactoalbúmina	4	14,174	123	5.1
proteasa peptona	4	4,000-200,000		
Inmunoglobulinas	2	150,000 – $1 \times 10^6$		4.5-8-3
Seroalbúminas	1	69,000		4.7

Fuente: Badui, 2006.

Normalmente se distinguen entre la caseína que, precipitan a pH 4,6 y las proteínas del suero no precipitan a menos que previamente hayan sido desnaturalizadas por el calor u otros tratamientos.

Las proteínas del suero, incluyen las lactoalbúminas y las lactoglobulinas. Estos dos grupos de proteínas se pueden separar utilizando una solución saturada de sulfato magnésico que precipita las lactoglobulinas, manteniendo a las lactoalbúminas en solución (Amiot, 1991).

### ■ **Caseínas.**

Las caseínas (del latín *caseus*, queso) son por definición las fosfogluco proteínas que precipitan de la leche descremada a pH 4.6 y 20°C, es decir, son proteínas que contienen tanto residuos de hidratos de carbono como de fosfatos; estos últimos generalmente esterifican a los hidroxilos de las serinas.

Su estabilidad en el seno de la leche se debe a su fuerte carga eléctrica negativa, que cuando se neutraliza en el punto isoeléctrico, las hace inestables. Su contenido de nitrógeno es aproximadamente de 15.6%, excepto en el caso de la fracción  $\kappa$  que es de 14.3%, ya que contiene una mayor cantidad de hidratos de carbono.

Prácticamente todas las moléculas de caseína están asociadas entre sí integrando las micelas, pero existe una pequeña solución que se encuentra en solución (Badui, 2006).

### ■ **Propiedades de las caseínas.**

Las caseínas tienen un alto contenido de ácidos glutámicos y aspártico, cuyos carboxilos se encuentran ionizados al pH 6.7 de la leche, esto hace que siempre se mantenga una carga negativa que las estabiliza.

El aminoácido prolina, también abundante, está distribuido homogéneamente a lo largo de la estructura primaria de las caseínas u provoca por impedimento estéricos, que no se formen hélices como estructura secundaria.

Debido a que contienen más aminoácidos hidrófobos que hidrófilos, presentan dentro de su estructura primaria zonas con propiedades francamente apolares.

Las caseínas  $\alpha$  y  $\beta$  son muy sensibles a la alta concentración de los iones calcio propios de la leche; estos precipitan si no se contará con la caseína  $\kappa$ , que cumple una función protectora y estabilizadora.

Contiene regiones cargadas que les permite unirse electrostáticamente y presentan regiones fosforiladas que facilitan sus interacciones con calcio.

Todas las caseínas tienen secciones con una hidrofobicidad alta que proviene de los aminoácidos aromáticos y alifáticos, además de una carga neta negativa de los ácidos aspártico y glutámico; estos dos factores son los que determinan su estabilidad y, al mismo tiempo su solubilidad (Badui, 2006).

Las caseínas  $\alpha$  son más ricas en fósforo. También son ricas en grupos ácidos libres. Su punto isoeléctrico es el más bajo, pH 4.1.

Las caseínas  $\beta$  son solubles a baja temperatura, 2°C. Contienen menos fósforo pero son más ricas en azufre que las caseínas  $\alpha$ . Tienen su punto isoeléctrico a pH 4.9

Las caseínas  $\kappa$  son pobres en fósforo (0.2%) y algunas ricas en segmentos glucídicos (5%). Son el sustrato específico de la acción proteolítica del cuajo y están constituidas por un segmento terminal aminado que es la para-kappa-caseína, caracterizada por residuos hidrófobos de carácter básico, es decir, electropositivo. El otro segmento terminal es un carboxilo glicopeptídico muy hidrófilo, de carácter ácido y en consecuencia, electronegativo. Las caseínas  $\kappa$  tienen diferentes componentes glucídicos (0 a 6%) y contienen ácido siálico (0.8%).

Las caseínas  $\gamma$  son las más heterogéneas de la fracción caseínica. Todas están relacionadas con las variantes genéticas de las caseínas  $\beta$ . Se ha sugerido que las caseínas  $\gamma$  son derivados de éstas caseínas y que se forman por proteólisis endógena o a partir de los segmentos precursores de la biosíntesis de las caseínas  $\beta$  (Amiot, 1991).

## ■ **Proteínas del suero.**

Las proteínas del suero son compactas, globulares, con un peso molecular que varía entre 14,000 y 1, 000,000 de daltones, y son solubles en un intervalo de pH muy amplio. En estado natural no se asocian con las caseínas, pero en la leche tratadas térmicamente y homogeneizadas, hay una fracción que si lo hace.

Las proteínas constan por lo menos de ocho fracciones diferentes, entre las cuales destacan la  $\beta$ -lactoglobulina, la  $\alpha$ -lactoalbúmina, las inmunoglobulinas, la albúmina bovina y las proteasa peptonas.

En general son muy sensibles a las temperaturas altas y en menor grado al pH ácido, debido a que están muy hidratadas y no tienen tanta carga eléctrica externa, son las primeras proteínas de la leche en desnaturalizarse y su calentamiento libera grupos sulfhidrilo que reducen el potencial oxidación. Contienen la mayoría de aminoácidos y presentan un mejor balance de éstos que las propias caseínas, por lo que su valor nutritivo es superior.

La  $\beta$ -lactoglobulina suma aproximadamente 45% del total de las proteínas del suero, es insoluble en agua destilada, soluble en soluciones diluidas de sales, se desnaturaliza y precipita a menos de 73°C por la acción de soluciones al 50% de sulfatos de magnesio o amonio. Sus aminoácidos hidrófilos y los ionizables se encuentran distribuidos de manera homogénea provocando que los apolares, tirosina, triptófano, leucina, fenilalanina, etc., establezcan una alta hidrofobicidad y que no se puedan unir entre ellas en forma hidrófoba.

La  $\alpha$ -lactoalbúmina es, por orden de importancia, la segunda proteína del suero, y tiene actividad biológica, ya que es parte constitutiva del sistema enzimático requerido para la síntesis de la lactosa. Entre sus características se encuentra su bajo peso moléculas, su alto contenido en triptófano y una secuencia de aminoácidos bastante parecida a la lisozima del huevo.

Las inmunoglobulinas suman el 10% de todas las proteínas del suero, provienen de la sangre animal, consta de moléculas de glucoproteínas con un alto contenido de grupos azufrados y con una actividad biológica de anticuerpos.

La albúmina bovina es la misma que la del suero sanguíneo, sirve de transporte de ácidos grasos, contiene un gran número de cistinas y un grupo sulfhidrilo libre, y es fácilmente desnaturizable incluso a bajas temperaturas (Badui, 2006).

### ■ La micela de caseína.

Como resultado de su fosforilación y estructura anfifílica, las caseínas interactúan entre sí con el fosfato cálcico para formar grandes micelas esféricas de tamaño variable entre 30 a 300 nm de diámetro. Las caseínas  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\kappa$ , se presentan generalmente en forma de polímeros pero forman complejos micelares en presencia de iones calcio. La asociación de estas tres fracciones sigue la relación general  $1\kappa: 3\beta: 5\alpha$ .

La estructura de la micela de caseína no se conoce bien todavía, sin embargo, se puede suponer que estaría formada por un gran número de subunidades entre ellas. Se le atribuye una estructura esponjosa no rígida en donde las caseínas  $\alpha$  y  $\beta$  formarían cadenas de copolímeros unidos por la caseína  $\kappa$  como si se tratara de una cadena. Las moléculas estarían unidas entre ellas por muchos puentes de  $\text{PO}_4$  y Ca. Además del fosfato cálcico, también se encuentran otras sales minerales de la leche (Mg, Na, K) y los citratos coloidales, cuyas formas de unión no se conocen bien, pero probablemente contribuyen a la estabilidad de las micelas. Además, las micelas retienen de 2.5 a 3.5 veces su peso en forma de agua de hidratación. Esta agua contribuye de forma importante a la estabilidad de las micelas.

El hecho de que la caseína no se encuentre en la leche en disolución sino en forma de micelas, tiene importantes consecuencias sobre las propiedades reológicas de la leche, también son responsables de la estabilidad física de los productos fermentados, concentrados y quesos.

La estructura y la estabilidad de las micelas de las micelas de caseínas se modifican si, al cambia la proporción entre el fosfato cálcico coloidal y el disuelto en el suero se modifica el tamaño de la micela, otro factor es, al bajar el pH de la leche se solubiliza más fosfato cálcico coloidal, por lo que debajo de pH de 5.2, las micelas de caseína empiezan a formar agregados grandes y finalmente al llegar a su punto isoeléctrico,

pH 4.6, se hacen completamente insolubles, dando como resultado la formación de un coágulo (Amiot, 1991).

#### **3.3.4 Lactosa.**

La lactosa es el azúcar de la leche y es por mucho el más abundante de los hidratos de carbono presente en ella. La lactosa se sintetiza únicamente de glucosa.

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

Para formar la glucosa en la glándula mamaria, la molécula de la glucosa debe ser fosforilada, formándose la glucosa-6-fosfatasa que se convierte a glucosa-1-fosfato misma que se une a la uridintrifostato galactosa, este se une a la glucosa libre y da la lactosa con la liberación de uridintrifostato.

La última etapa de la síntesis de la lactosa se cataliza por la lactosa sintetasa que se compone de dos moléculas proteínicas, siendo una de ellas la  $\alpha$ -lactoalbúmina (Ávila, 2010).

La lactosa solo tiene aproximadamente solo el 15% de poder edulcorante de la sacarosa y contribuye, junto con las sales, al sabor global de este alimento. Al ser un azúcar reductor intervienen en las reacciones de Maillard y de caramelización. Existen dos formas isoméricas,  $\alpha$  y  $\beta$ , que se diferencian por sus propiedades físicas, tales como poder rotatorio, temperatura de fusión, solubilidad, etc. (Badui, 2006).

#### **3.3.5 Vitaminas**

La leche fresca, recién ordeñada, contiene la mayoría de las vitaminas, aun cuando algunas de ellas están en concentraciones muy bajas, los diversos tratamientos a las que se le somete inducen fuertes pérdidas de las más termosensibles, principalmente las hidrosolubles.



Las vitaminas liposolubles A, D, E y K se encuentran interaccionando con los glóbulos de grasa, la primera se presenta en mucho mayor proporción que las otras tres. Su contenido en la leche depende de la dieta de la vaca.

En el suero se localizan las hidrosolubles, tales como la riboflavina, B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub>, C, biotina, niacina, tiamina, folatos y ácido pantoténico. La microflora intestinal de la vaca sintetiza varias vitaminas del grupo B y la K, y una alta proporción se absorbe a través de la pared intestinal y luego se incorpora a la leche (Badui, 2006).

### **3.3.6 Sales y compuestos inorgánicos**

La leche contiene varias sales, de las que destacan los citratos, cloruros, bicarbonatos y fosfatos de calcio, magnesio, sodio y potasio, los cuales se encuentran en solución o formando parte del sistema coloidal de las caseínas. Aproximadamente el 50% del fósforo total está esterificado a las fosfoserinas de las caseínas, y la mayoría de los elementos químicos están presentes en forma iónica en el suero, aunque parte del calcio se asocia con otras proteínas. A pesar de que el alto contenido de calcio de la leche (120 mg/ 100 g, aproximadamente) es superior a la concentración de saturación de una solución acuosa, está estabilizado, ya que el 70% se encuentra en forma coloidal, unido a las caseínas mediante el fosfato correspondiente y el resto se localiza solubilizado en el suero. El magnesio hace que el fosfato de calcio no forme estructuras más estables, como la hidroxapatita, ésta se sintetiza al someter la leche a tratamientos térmicos fuertes. Las sales desempeñan un papel muy importante en la estabilidad térmica de los productos lácteos, de tal manera que si añade calcio y/o magnesio, el sistema proteínico se desestabiliza. La relación de concentración de Ca:P es la adecuada para que exista una buena absorción y aprovechamiento de ambos elementos en el organismo humano (Badui, 2006).

### **3.3.7 Enzimas**

Las enzimas se encuentran en baja concentración, están distribuidas en leche tanto unidas a las micelas de caseína o a la membrana de glóbulo de grasa, como en forma libre en el suero y se sintetizan en la glándula mamaria, aunque algunas

proviene de contaminaciones microbianas. Se han identificado más de 20, de entre ellas destacan las indicadas en el cuadro 4 (Badui, 2006).

**Cuadro 4. Enzimas más importantes de la leche.**

<b>Enzima</b>	<b>Localización de la leche</b>	<b>Característica</b>
Lipasa	90% en las micelas y 10% en el suero.	Responsable de reacciones de rancidez, sobrevive a la pasteurización.
Proteasa	Asociada con las micelas	Resistencia al calor, actividad de endopeptidasa.
Fosfatasa alcalina	80% en la membrada del glóbulo de grasa y el resto en la fase acuosa	Usada como índice de pasteurización
Catalasa	Asociada con la membrana del glóbulo de grasa, con las micelas y con el suero	Aumenta por los leucositos y se usa como prueba de mastitis
Lactoperoxidasa	Suero	La más resistente al calor, usada para detectar tratamientos térmicos muy fuertes.
Xantina oxidasa	Asociada con la membrana del glóbulo de grasa.	Degrada el flavin-adenin-dinucleótido y riboflavina. Esta es la posible razón del alto contenido de riboflavina en la leche.

Fuente: Badui, 2006.

### **3.4 Microbiología de leche.**

La leche es una buena fuente de nutrimentos y de energía, no sólo utilizables por los mamíferos, sino también por muchos microorganismos que son capaces de crecer en ella. Son fundamentalmente las bacterias, aunque algunos mohos y levaduras también son capaces de desarrollarse en la leche.

La mayoría de los microorganismos son indeseables en la leche porque son patógenos o porque pueden producir enzimas cuya acción origina transformaciones indeseables en la leche. Los microorganismos no patógenos por sí mismo no deterioran la calidad de la leche. Pero estos microorganismos requieren nutrimentos, que obtienen produciendo enzimas que hidrolizan la lactosa, proteínas, grasas u otras sustancias de la leche, liberando así los compuestos necesarios para su crecimiento. Estas transformaciones pueden generar en la leche alteraciones como la acidificación durante el almacenamiento. Los aromas producidos por la luz, la oxidación e hidrólisis de la grasa, aromas extraños que alteran su calidad y pueden disminuir su aptitud para el proceso, algunos de estos son, bacterias ácido lácticas, coliformes, *Bacillus*, *Pseudomonas Alcaligenes*, *Flavobacterium*, entre otras (Walstra, 2001).

Los tipos predominantes provenientes de una ubre sana son *Micrococcus*, *Streptococcus* y *Corynebacterium*. Por lo general, la leche cruda contiene  $<10^3$  microorganismos por mililitro.

Cuando una vaca padece enfermedad infecciosa, el agente etiológico puede llegar a la leche. En el caso de la mastitis, los microorganismos patógenos se hallan presentes en la ubre y siempre pasan a la leche. Si una vaca presenta mastitis, pueden excretar *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus*, coliformes y *Pseudomonas* en números relativamente altos (Ray, 2010).

También se deben de tomar precauciones durante y después del ordeño, puesto que también determinan que microorganismos llegan a la leche y en qué cantidad. Algunas de las fuentes de contaminación suelen ser, la alimentación del ganado, suelo, estiércol, polvo, equipo de ordeño, agua, entre otros.

Los microorganismo patógenos que se pueden encontrar en la leche ya sea por contaminación de esta o enfermedad del animal son *Campylobacter jejuni*, *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, entre otras. Siendo *Mycobacterium tuberculosis*, el más importante ya que es la bacteria más termorresistente que se pueden encontrar en la leche (Walstra, 2001).

### 3.5 Industrialización de la leche

La leche además de tener una composición química adecuada, tiene que ser de buena calidad higiénica. Éste es un aspecto esencial para la salud pública, para la calidad de los productos lácteos y para que la leche pueda someterse a los distintos tratamientos tecnológicos (Walstra, 2001).

A partir de la leche fresca se elaboran distintos derivados, en el mercado se encuentra una gama de productos lácteos, leche entera, descremada, deslactosada, leche en polvo, condensada, evaporada, mantequilla, quesos, crema fermentada, yogurt y más.

Por contener un gran número de nutrimentos y por ser un alimento tan completo, con un pH casi neutro y alta actividad del agua, la leche está sujeta a contaminaciones microbiológicas que la hacen un producto altamente perecedero. Los distintos derivados que de ella se obtienen representan una forma más factible, obteniendo productos con una vida de anaquel mucho mayor que la materia prima de origen (Badui, 2006).

La leche cruda para su consumo, se debe de someter a diversos tratamientos que la convierten en un producto menos propensa al deterioro. A continuación, se mencionan los principales pasos a los que es sometida la leche para su consumo:

**Clarificación:** La leche cruda trae consigo innumerables macro y micropartículas cuerpos extraños, cuya intensidad y peculiaridad, dependen de los cuidados que se hayan practicado durante y después del ordeño. Por lo tanto es importante que se eliminen el mayor número de impurezas (Keating, 1999).

La clarificación es un procedimiento con el cual se asegura la máxima limpieza de leche, al eliminar la mayor parte de las macropartículas. Limpieza previa de la leche por medio de centrifugación y/o filtración para eliminar partículas extrañas. Entre estas partículas se encuentran células epiteliales, leucocitos, sedimento bacteriano y materia extraña (Pérez, 2011).

**Bactofugación:** Esta técnica trata de eliminar los microorganismos de la leche por una fuerza centrífuga a la temperatura de pasteurización (Veisseyre, 1972).

Las bacterias, y sobre todo las esporas bacterianas, pueden separarse de la leche aplicando una fuerza centrífuga muy intensa y una alta temperatura, en una centrífuga de diseño especial que se llama bactofugador. Con un tratamiento doble a unos 73°C, se consigue aproximadamente tres reducciones decimales, y un poco más para las esporas, tales como los Bacilos y los Clostridium, que afecta la elaboración de algunos quesos (Walstra, 2001).

**Descremado:** Esta operación tiene como finalidad remover total o parcialmente el contenido de grasa de la leche, esto se efectúa a la diferencia de gravedad específica de la grasa y de la leche descremada, aprovechando la inestabilidad de la emulsión en que se encuentra la grasa de la leche. La separación se efectúa por centrifugación, que emplea la fuerza centrífuga para acelerar el proceso de separación de las fases de la leche. Para lograr un descremado óptimo se debe someter la leche a una temperatura entre 30 y 35°C.

El descremado total de leche se lleva a cabo para obtener una crema con alto contenido de materia grasa (alrededor de 40%) y emplearse para la elaboración de mantequilla. La leche descremada tiene una variedad de usos entre los cuales se encuentra la producción de quesos de diferente contenido graso, la producción de leche en polvo descremada o para la producción de caseína (Keating, 1999).

**Estandarización:** El contenido de grasa de la leche varía entre especie animales o entre una vaca y otra dependiendo de la raza, otros factores que pueden influir son la dieta, la edad de la vaca, el estado de lactancia de la vaca, enfermedades, incluso la época del año. La leche debe ser estandarizada para dar un producto uniforme. Después del descremado la grasa se adiciona nuevamente a la leche descremada para obtener un producto con el contenido de grasa deseado.

De acuerdo a la norma NOM-155-SCFI-2012 la leche entera debe tener 30 g/L de grasa butírica, la leche parcialmente descremada 28 g/L, semidescremada 16 g/L o leche descremada 0.5 g/L

## ■ **Tratamientos Térmicos:**

Uno de los métodos más comunes de conservación de los alimentos es mediante un calentamiento que destruye los microorganismos y las enzimas no deseadas, como la fosfatasa alcalina en el caso de la leche (Badui, 2006).

Hoy en día se aplican diferentes combinaciones de temperaturas y tiempos para tratar la leche, algunos se mencionan a continuación.

### • **Termización:**

Es un tratamiento térmico que se aplica para prolongar el tiempo de almacenamiento de la leche antes de someterla a una pasteurización u otros tratamientos térmicos más severos. La termización de la leche consiste en su calentamiento a temperaturas de 57 a 68°C durante un tiempo de 15 segundos.

Este proceso reduce la flora de microbiana de la leche y, siempre que se enfríe y se mantenga a 0 a 1°C, el tiempo de almacenamiento puede prolongarse hasta siete días sin pérdidas de calidad. Es importante mantener la leche termizada a baja temperatura hasta que reciba el tratamiento térmico con el fin de retrasar el crecimiento de las bacterias aerobias formadoras de esporas (Early, 1998).

### • **Pasteurización:**

De acuerdo a la Norma Oficial Mexicana, NOM-184-SSA1-2002, define a la pasteurización como; al tratamiento térmico al que se someten los productos, consistente en una relación de temperatura y tiempo que garantice la destrucción de organismos patógenos y la inactivación de algunas enzimas de los alimentos. De acuerdo a su relación tiempo-temperatura existen dos tipos de pasteurización: lenta y rápida, también llamadas “pasteurización por lotes” y “pasteurización continua” respectivamente. La pasteurización rápida también se conoce como HTST (high temperature short time) por sus siglas en inglés, que significa “temperatura alta, tiempo corto” (Pérez, 2011).

**Pasteurización baja:** Este método consiste en calentar la leche a una temperatura de 63°C, y mantenerla a esa temperatura por un periodo de 30 minutos y después enfriarla, es un método lento y discontinuo, pero presenta la ventaja de no modificar

las propiedades de la leche. No se coagulan las albúminas, ni las globulinas (Veisseyre, 1972).

**Pasteurización alta:** Se define como el calentamiento a 72°C durante 15 segundos. El método es rápido y continuo, pero modifica ligeramente las propiedades de la leche. Las albúminas y las globulinas sufren siempre una coagulación parcial. Se emplean los llamados “pasteurizadores” o, más propiamente, “intercambiadores de calor a placas” en donde la leche hace el siguiente recorrido, precalentamiento, pasteurización a 72°C por 15 segundos, enfriamiento con agua fría y finalmente con agua helada (Belitz, 2004).

Básicamente la pasteurización de la leche tiene dos objetivos, uno para conservar la salud, al obtenerse un producto inocuo para el consumo humano y para mejorar y mantener la calidad de la leche. Durante la pasteurización se eliminan microorganismos termosensibles como los coliformes, no así las esporas o la peroxidasa, ni las bacterias termorresistentes, como las lácticas, es decir, la leche pasteurizada todavía tiene una determinada cuenta microbiana, principalmente bacterias lácticas, no patógenas pero si fermentativas, y requiere de refrigeración, ya que su vida de anaquel es tan solo de algunos días.

Además con el tratamiento de pasteurización se elimina también una de las principales bacterias patógenas en la leche, *M. tuberculosis*, su destrucción se garantiza al medir indirectamente la actividad residual de la enzima fosfatasa alcalina, ya que su inactivación indica que el tratamiento térmico fue efectivo, midiendo así la eficiencia de la pasteurización (Badui, 2006).

- **Ultrapasteurización (UHT):**

La ultrapasteurización es un tratamiento térmico más intenso, la temperatura que se debe alcanzar es de 135° a 149°C de 2 a 8 segundos, esto de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana, NOM-184-SSA1-2002, a esta temperatura se destruye prácticamente todos los microorganismos y las enzimas más termorresistentes mediante dos métodos comerciales: el indirecto, que usa intercambiadores de calor, y el directo, por inyección directa de vapor a la leche y su posterior eliminación en un

tanque a presión reducida. El producto obtenido puede almacenarse sin refrigeración por periodos hasta de varios meses siempre y cuando no se abra el envase (Badui, 2006).

### ■ **Alteraciones en los tratamientos térmicos.**

El efecto más importante del tratamiento térmico de la leche es, sin ninguna duda, la reducción en la velocidad del deterioro microbiano enzimático. Además, el calor produce otros efectos sobre las características de la leche, entre ellos:

**Color:** El calentamiento tiene inicialmente un efecto blanqueador sobre la leche, debido a que aumenta la cantidad de fosfato coloidal y disminuye  $[Ca^{2+}]$ . Al aumentar la intensidad del tratamiento, el color se vuelve marrón debido a que se producen reacciones entre las proteínas y la lactosa, especialmente las reacciones de Maillard, y como consecuencia disminuye la lisina disponible.

**Viscosidad:** Puede aumentar ligeramente como consecuencia de que la mayor parte de las proteínas del suero se desnaturalizan y se vuelven insolubles, además, las micelas de caseína se agregan, y esto puede terminar en coagulación.

**Aroma:** Se modifica por las reacciones de Maillard, se forman lactonas y metilcetonas a partir de la grasa y se forman grupos sulfhidrilo libre.

**Valor nutritivo:** Éste disminuye al menos en lo que respecta a determinados nutrimentos como consecuencia de las reacciones de Maillard y se algunas vitaminas se degradan (Walstra, 2001).

### ■ **Homogeneización.**

La homogeneización se emplea para estabilizar los lípidos y evitar la separación de fases con formación de crema (Badui, 2006).

Para ello, es necesario reducir mucho el tamaño de los glóbulos grasos. La homogeneización reduce incluso el tamaño de partículas.



Mejora la estabilidad para evitar la coalescencia parcial, el aumento de la estabilidad de los glóbulos grasos homogeneizados se debe a la reducción de su diámetro y a la adquisición de una nueva capa superficial (Walstra, 2001).

La homogeneización no solo rompe los glóbulos de grasa, si no que provoca una interacción lípido-proteína. Después de la homogeneizada, la leche adquiere nuevas características y propiedades que hacen que se reduzca notablemente su tendencia natural al cremado y aumente la estabilidad de la fase lipídica.

En el proceso se genera un gran número de pequeños glóbulos de grasa, la difracción de la luz es mayor, por tanto, la leche adquiere un color más blanco; al mismo tiempo, este aumento en el área superficial hace que los glóbulos se vuelvan más susceptibles a la fotooxidación, pero también se inhibe la autooxidación iniciada por el cobre y los fosfolípidos, ya que estos se solubilizan en el suero y pierden su efecto catalítico. Si la leche no está pasteurizada, la homogeneización provoca la rancidez hidrolítica ocasionada por las lipasas, al interaccionar con los glóbulos la caseína pone en contacto íntimo la enzima con la fase lipídica, lo cual favorece por el considerable incremento del área superficial. En general esto no ocurre, ya que la leche se pasteuriza inmediatamente antes o después de la homogeneización con lo cual se inactivan las lipasas (Badui, 2006).

### ● **Leche en polvo.**

En base al Codex alimentarius, se entiende por leches en polvo al producto obtenido mediante la eliminación de agua de la leche entera.

La finalidad de la elaboración de la leche en polvo es convertir la leche cruda líquida perecedera en un producto que pueda conservarse durante varios años sin pérdidas sustanciales de calidad. Las alteraciones más frecuentes son el desarrollo de aromas a sebo, debido a las reacciones Maillard y autooxidación, y una pérdida de valor nutritivo, en especial una disminución de lisina disponible (Walstra, 2001).

Para la fabricación de la leche, se precalienta y se concentra a 45 a 48% sólidos. Esta concentración es necesaria para obtener un producto de grano más pesado.

Existen varios métodos para la desecación de los productos líquidos, pero en los últimos tiempos el más común es por atomización (Walstra, 2001).

La finalidad de la atomización es conseguir la formación de unas gotitas suficientemente pequeñas para que se deshidraten rápidamente, pero tan minúsculas como para que escapen con el aire de salida una vez que han sido desecadas (Walstra, 2001).

Consiste en mezclar en una cámara de secado la leche pulverizada en gotitas de diámetro menor a 300  $\mu\text{m}$ , con aire caliente a una temperatura de entrada de 150 a 220°C. El aire suministra el calor y las gotitas pierden su humedad. La temperatura de vaporización en las condiciones normales del aire de entrada es de 40 y 50°C, la temperatura de las partículas nunca excede a la del aire frío de salida. Las partículas secas se separan del aire, antes o después de su extracción de la cámara de secado, se enfrían y se envasan (Varman, 1995).

El producto en polvo tiene que ser fácil de manipular, después de añadir agua, el producto en polvo debe reconstituirse completamente y fácilmente, quedando como una mezcla homogénea de composición similar a la del producto original. La completa reconstitución implica que no queden partículas sin disolver y que no se formen granos de mantequilla, no aparecer gotas de aceite en la superficie de la disolución (Walstra, 2001).

La solubilidad de la leche en polvo tiene la más grande importancia comercial. La pérdida de solubilidad es debida a los cambios sufridos por la proteína durante el proceso del precalentamiento y deshidratación.

Cuando la leche es producida en buenas condiciones, el sabor se asemeja mucho al de la leche fresca pasteurizada, pero si el calor es excesivo o si la leche fluida no estaba en buenas condiciones, el sabor puede variar y la leche en polvo puede adquirir un sabor a cocido, a sobrecalentado o a quemado (Keating, 1994).

### **3.6 Leches Fermentadas.**

La leche fermentada es la que ha sido transformada por el desarrollo de bacterias lácticas u otros microorganismos, la principal característica es que transforman la lactosa en ácido láctico, produciendo en la leche un descenso de pH (hasta 4.6 a 4.0), y como consecuencia de este se produce la coagulación de la caseína que a su vez ocasiona la formación de un gel.

Además de la transformación de la lactosa, se producen fenómenos de proteólisis y lipólisis por acciones microbiana y enzimática, que confieren a los productos derivados unas determinadas características nutricionales y que también determinan su aroma, sabor y consistencia (Astiasaran, 2000).

El término “fermentadas” describe el proceso de inoculación o siembra de la leche con microorganismos que transforman la lactosa en ácido láctico. En las rutas metabólicas de estas bacterias se originan además dióxido de carbono, ácido acético, diacetilo, acetaldehído y muchos otros compuestos que también determinan el sabor, la textura y aroma característicos de cada uno de los productos fermentados (Early, 1998).

Además, la fermentación es una forma simple, barata y segura de conservar la leche. Las bacterias lácticas modifican las características de la leche, de forma que la mayoría de los microorganismos indeseables, incluido los patógenos, no pueden crecer en ella o mueren, ya que el ácido láctico ejerce un efecto protector que inhibe el desarrollo de muchos microorganismos no deseables y/o patógenos, por esta razón, los productos lácteos fermentados se conservan durante más tiempo que la leche no acidificada. Sin embargo, el bajo pH no impide crecimiento de mohos contaminantes en el producto, que forman gas y alteran su sabor y aroma (Early, 1998) (Walstra, 2001).

Actualmente las leches fermentadas son consumidas en todo el mundo y existen muchas variantes según el tipo de tecnología utilizada y principalmente el tipo microorganismo que la fermentan. Algunos de estos productos lácteos son el yogur, leche acidófila, kéfir, kumis, etc. (Veisseyre, 1972).

### 3.6.1 Leche acidófila

Elaborada con *Lactobacillus acidophilus* y se consume por su valor terapéutico, ya que dicha cepa implanta en el intestino, aportando beneficios a la salud.

El medio es la leche descremada esterilizada que, después de enfriada a 37°C se inocula con 1% de cultivo activo. Para conseguir la máxima viabilidad microbiana se necesita de una incubación controlada hasta alcanzar un 0.6 a 0.7% de ácido láctico.

La leche para procesar puede ser descremada o entera, debe de ser tratada térmicamente para alcanzar una buena calidad bacteriológica, con este fin, la leche se calienta hasta unos 95°C, durante 1 hora como máximo, y a continuación se enfría a 37°C, la leche a esta temperatura se inocula con el cultivo de *Lb. acidophilus* y se incuba hasta que tiene lugar la coagulación. El almacenamiento del producto debe realizarse a 5-10°C.

El hecho más importante del sistema de producción es el cuidado que debe ejercerse para evitar la contaminación de la leche debido a que *Lb. acidophilus* sólo crece en ella lentamente, por lo tanto es indispensable que el inóculo se mantenga en un estado activo (Tamime y Robinson, 1991).

### 3.6.2 Yogur.

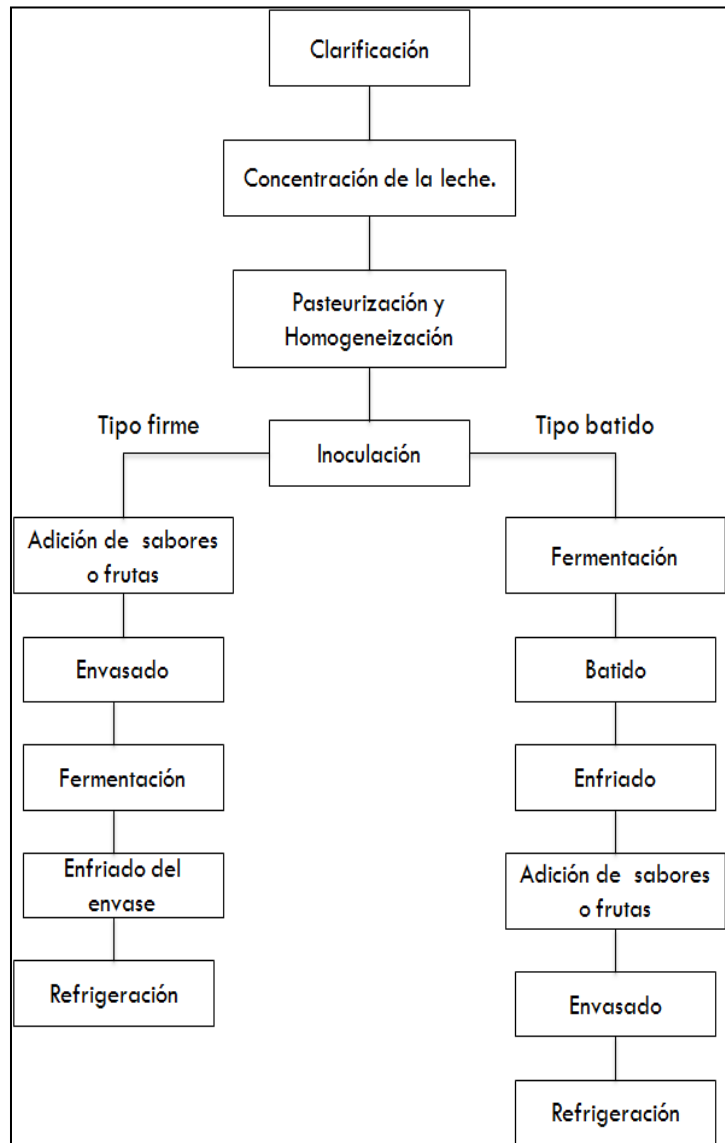
El yogur es un producto lácteo fermentado que resulta del crecimiento de las bacterias lácticas *Lactobacillus delbrueckii* ss. *bulgaricus* y *Streptococcus salivarius* ss. *thermophilus* en leche. De esta fermentación debe resultar un líquido suave y viscoso, o un gel suave y delicado, de textura firme, uniforme, con la mínima sinéresis y con un sabor característico (García, 2004).

Los métodos de fabricación varían considerablemente en los distintos países según la materia prima utilizada, el volumen de producción, la formulación del producto el tipo de yogur que se desea obtener, pero hay unos principios básicos comunes que determinan la naturaleza y calidad del producto final, como son: (Early, 1998).

- Aumento de la cantidad de sólidos que contiene la leche.
- Tratamiento de la leche a altas temperaturas (>80°C) durante un tiempo suficiente para que se produzca la desnaturalización del suero.

- Siembra de leche fría con un cultivo bacteriano en el que los microorganismos mayoritarios son *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus*
- Incubación de la leche según el tipo de yogur, en condiciones que favorezcan la formación del coágulo homogéneo, liso y viscoso con las características deseadas de pH, sabor y aroma.
- Enfriamiento y adición de frutas, aromatizantes, colorantes.
- Envasado y almacenamiento en refrigeración.

La industria reconoce dos tipos fundamentales de yogur: firme y batido, clasificación que se basa en el método de elaboración y en la estructura física del coágulo (Tamime y Robinson, 1991). En la figura 4 se observa el diagrama general de ambos métodos tipos de elaboración.



Fuete: García 2004

**Figura 4. Diagrama de elaboración de yogur**

En el proceso de fabricación del yogur firme, la leche sembrada con el cultivo se distribuye en los envases de venta. Los envases se incuban a condiciones adecuadas. La temperatura de conservación varía según se aplique el método corto o largo. El sistema corto consiste en incubar la leche de 40 a 43°C por 2 a 4 horas, mientras que la incubación larga se mantiene de 30 a 32°C por un tiempo de 12 horas. Cuando la leche alcanza el pH necesario, los envases se enfrían para aminorar la fermentación. En la elaboración del yogur batido, la leche se siembra y se

incuba en un tanque de fermentación; el coágulo formado se rompe durante las posteriores etapas de refrigeración y envasado. Los tiempos y temperaturas de incubación son los mismos que para el yogur firme. Una vez que el pH desciende hasta el valor deseado, el coágulo se enfría y se refrigera, y se procede a la adición de ingredientes y al llenado de los envases y tiene lugar la segunda refrigeración (Early, 1998). El producto alcanza una acidez entre 0.8 y 1.4% de ácido láctico y un pH entre 3.70 y 4.60. Por lo general, la leche se modifica, ya sea por la adición de leche descremada en polvo u otros sólidos de leche como caseinatos. El propósito de tal modificación es mejorar la firmeza del producto y darle una mayor resistencia a los daños mecánicos, evitando así el desuerado durante el manejo normal del yogur (García, 2004).

El contenido de sólidos no grasos de leche en el yogur es variable, pero nunca debe ser menor de 8.5%, de lo contrario el producto puede tener una consistencia demasiado suave y una estructura del gel muy débil. A mayor contenido de sólidos totales menor grado de sinéresis del producto. La concentración de sólidos tiene también relevancia nutrimental, ya que al modificar la leche se incrementa el contenido de proteínas y otros nutrimentos. La leche se concentra normalmente hasta un contenido de sólidos totales de 15% a 18%. El contenido de grasa, tiene contribución en la viscosidad, textura y apariencia del producto y coadyuva a evitar la sinéresis. El Codex Alimentarius especifica un contenido de grasa mínimo de 3% para el producto entero y menor de 0.5% para el yogur descremado (García, 2004).

Los edulcorantes se añaden para contrarrestar la acidez desarrollada durante la fermentación. La sacarosa y la glucosa con los edulcorantes más frecuentes, también pueden añadirse otras sustancias como maltosa, galactosa y fructosa. Los edulcorantes sintéticos que se utilizan en la formulación de los yogures bajos en calorías y los más empleados son el aspartamo, el ciclamato y la sacarina (Early, 1998). El uso de estabilizantes es una práctica muy común en algunos países; sin embargo, el yogur puede ser elaborado sin estos aditivos sin deterioro de su calidad. La ventaja de su utilización es que contiene mayor fuerza a la estructura del gel haciéndolo menos vulnerable a los factores mecánicos que pueden ocasionar la

ruptura del coágulo y la consecuente sinéresis. Los estabilizantes también mejoran el cuerpo, la textura, la sensación táctil en la boca y la apariencia del yogur. Algunos comúnmente utilizados son: grenetina, almidón, carragenina, alginatos, goma guar, goma de algarrobo, pectina, entre otros (García, 2004).

### **3.7 Bacterias Lácticas.**

Las bacterias acidolácticas o bacterias lácticas (BAL), son los microorganismos utilizados para la elaboración de productos lácteos, son bacterias Gram-positivas. En base a su morfología, las bacterias lácticas pueden clasificarse en cocos y bacilos (Walstra, 2001).

En las clasificaciones generales, las BAL se dividen en dos grandes grupos: mesófilas y termófilas. Las primeras tienen una temperatura óptima de crecimiento de 30 a 33°C y son principalmente especies del género *Lactococcus* y *Leuconostoc*. Se utilizan en los procesos tecnológicos cuyas fermentaciones se realizan a temperaturas de 20 a 24°C. Las bacterias lácticas termófilas presentan una temperatura de óptima de crecimiento de 40 a 45°C y se emplean cuando los procesos fermentativos se llevan a cabo a temperaturas entre 30 y 50°C. Las BAL termófilas más importantes son *Streptococcus thermophilus* y las especies de *Lactobacillus* (*L. helveticus*, *L. delbrueckii* ssp. *lactis*, *L. casei*, *L. plantarum*). Además, hay otras bacterias lácticas que pueden tener beneficios para la salud, como *Lb. acidophilus*, *L. reuteri* y las especies *Bifidobacterium* (Early, 1998).

#### **Exigencias nutrimentales.**

Las bacterias lácticas se caracterizan por exigencias nutrimentales numerosas, solo pueden crecer en medios ricos en vitaminas, bases nitrogenadas y fuentes de carbono y nitrogenadas.

Para realizar una conversión completa de la leche en un producto fermentado se estima que las bacterias lácticas deben multiplicarse hasta  $10^9$  células por mL de leche, y  $10^{10}$  células/mL en la cuajada para producir suficientes cantidades de ácido láctico y de compuestos aromáticos. Esta capacidad depende del crecimiento de



varios factores del entorno; la temperatura, el pH y la presencia de otros microorganismos (Ray, 2010).

## ■ **Metabolismo**

El metabolismo de los glúcidos implica el transporte del azúcar hasta el interior de la célula y su hidrólisis posterior (Walstra, 2001).

Captación del azúcar por la célula bacteriana y formación de monofosfatos de hexosa. Durante el crecimiento de las bacterias en la leche, la lactosa debe de ser transformada a través de la membrana celular.

- a) *Un sistema fosfoenol-piruvato fosfotransferasa dependiente (PEP/PTS)*. LA lactosa es transformada en lactosa P- y transportada al interior de la célula. Allí, una fosfo- $\beta$ -galactosidasa (P- $\beta$ -gal), hidroliza la lactosa-P en glucosa y galactosa 6-P. la glucosa es convertida en glucosa-6-P. Ambos azúcares fosfato son posteriormente metabolizados.
- b) *Un sistema permeasa ATP-dependiente*. La lactosa es transportada como tal y es hidrolizada en glucosa y galactosa por una  $\beta$ -galactosidasa ( $\beta$ -gal o lactasa). La glucosa es a su vez convertida en glucosa 6-P.

En general las bacterias lácticas tienen ambos mecanismos de transporte. Sin embargo, en la mayoría de las bacterias homofermentativas mesófilas predomina el sistema de transporte PEP/PTS; especialmente, para el género *Lactococcus* en donde la actividad de la  $\beta$ -gal es muy escasa. En la mayor parte de las bacterias heterofermentativas, el principal sistema de transporte es la permeasa (Walstra, 2001).

## ■ **Fermentación láctica homofermentativa.**

El azúcar se metaboliza vía glicolítica o ruta de Embden-Meyerhof; la galactosa-6-P sigue la ruta de la tagatosa. Las principales enzimas en el proceso de fermentación son:

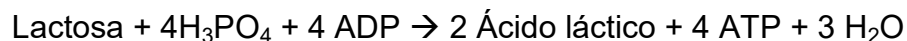
- Aldosas: necesarias para hidrolizar las hexosas difosfato a gliceraldehído-3-P
- Piruvato kinasa (PK): es necesario para la formación de piruvato a partir de la PEP
- Lactato deshidrogenasa (LDH): fundamental para la producción de ácido láctico a partir del piruvato.

La regulación de las actividades de todas estas enzimas controla la captación de azúcar para su metabolismo. Los factores determinantes son los siguientes:

- La formación de PEP activa la captación de azúcar a través del sistema PEP/PTS.
- Los metabolitos intermediarios fosforilados hasta el gliceraldehído-3-P, especialmente las hexosas difosfato, activan la PK y la LDH.
- El NADH, formada durante la hidrólisis del gliceraldehído-3-P, debe ser oxidado por la producción de ácido láctico a partir del piruvato.

Como resultado de estos factores, las bacterias lácticas esencialmente homofermentativas se comportan como “bombas de ácido láctico”; cuando la glicólisis es óptima, convierten entre el 90% y el 95% del azúcar en ácido láctico.

Una molécula de disacáridos rinde dos moléculas de hexosa. A partir de una molécula de hexosa, se forman dos moléculas de gliceraldehído-3-P (Walstra, 2001).



### ■ **Utilización de proteínas. Sistema proteolítico.**

La utilización de los péptidos libres de la leche por las células de las bacterias lácticas es una necesidad ya que la concentración de aminoácidos libres en la leche no puede asegurar el crecimiento de estas bacterias, debido a que su concentración es baja y por la ausencia de ciertos aminoácidos como la metionina.

Tras la utilización de los aminoácidos y los péptidos libres, las bacterias para crecer en leche, deben hidrolizar las proteínas.

Debido a su carga y tamaño, las proteínas y los oligopéptidos de la leche no pueden atravesar la membrana citoplasmática de las bacterias, su hidrólisis necesita la presencia de proteasas y peptidasas bacterianas extracelulares o ligados a la envoltura bacteriana.

La actividad proteolítica global de las bacterias lácticas es considerada como débil comparada con la de otros géneros bacterianos como *Bacillus* o *Pseudomonas*, pero su equipo enzimático es más complejo por la diversidad y la naturaleza de las enzimas detectadas y por su localización intra o extracelular.

El sistema proteolítico de las bacterias lácticas está constituido por dos tipos de enzimas distintas: las proteasas capaces de hidrolizar proteínas nativas, por ejemplo, las caseínas y sus derivados, y la peptidasas, caracterizadas por la hidrólisis de péptidos provenientes de la degradación de las proteínas (Leveau, 2000).

### **3.7.1 Género *Lactococcus*.**

Este género incluye varias especies pero sólo una, *Lactococcus lactis*, se ha usado ampliamente en la fermentación láctea. Tiene tres subespecies: *lactis*, *cremoris* y *horniae*, pero solo las primeras dos se usan en la fermentación láctea.

Se presentan en forma de cocos, dispuestos en pares o en cadenas de longitud variable. Son bacterias Gram positivas, no esporuladas, inmóviles, homofermentativas, anaerobias facultativas y microaerófilas. En general crecen bien entre los 20 y 30°C. Estas bacterias no pueden crecer en concentraciones de NaCl de 6.5% o cuando el pH es superior a 9.60 (Ray, 2010).

La capacidad de producir grandes cantidades de ácido láctico por fermentación de los hidratos de carbono presentes y la consecuente caída de pH son los factores primarios en los que se basa la actividad microbiana de las bacterias lácticas (Daeschel, 1989).

Sin embargo, el complejo sistema antagonista de las bacterias lácticas no sólo se basa en la producción de ácidos sino que también participan activamente otros metabolitos inhibitorios que, a pesar de ser sintetizados en menor cantidad contribuyen a los fenómenos de antibiosis. Entre ellos cabe destacar la producción compuestos aromáticos como diacetilo, y acetaldehído, derivados deshidratados del

glicerol (reuterina), enzimas bacteriolíticas y bacteriocinas (Lindgren y Dobrogoz, 1990).

### ■ Bacteriocinas

Las bacteriocinas son péptidos con actividad antimicrobiana producidos por síntesis ribosomal y son segregadas por un gran número de bacterias para inhibir el crecimiento de otros microorganismos competidores (Papagianni, 2003).

En el caso de las bacterias ácido-lácticas las primeras observaciones comenzaron en 1928 cuando se describió que ciertas cepas de *Lactococcus* empleadas en la fabricación de quesos producían un efecto inhibitor del crecimiento de otras BAL y potencialmente podían inhibir el crecimiento de las bacterias patógenas y nocivas para la conservación del queso (Cotter et al, 2005).

#### **3.7.2 *Lactococcus lactis ssp. lactis***

La Nisina, descrita en 1928, fue la primer bacteriocina aislada a partir de la bacteria ácido láctica *Lactococcus lactis ssp. lactis* durante la fase exponencial de crecimiento. Es un péptido de 34 aminoácidos, de bajo peso molecular menor a 5 kDa (Cotter, 2005).

Es utilizada como conservador de alimentos y reconocida por la FDA con la categoría de GRAS (Generally Recognized As Safe). Se produce de forma natural en algunos productos lácteos y se utiliza en la producción de alimentos y como aditivo en productos lácteos para prevenir la descomposición ocasionada por bacterias Gram positivas, especialmente de los géneros *Clostridium* y *Straphylococcus*, *Bacillus* y *Lysteria* (Maldonado y Llanas, 2007).

La síntesis de la nisina es compleja, requiere de procesos de transcripción, traducción, modificaciones post-traduccionales, secreción, procesamiento y señales de transducción (Sangronis y García, 2007).

La nisina es ácida por naturaleza por lo que es estable en condiciones ácidas; su solubilidad aumenta al aumentar la temperatura y disminuir el pH (Simova et al, 2006).

### ■ **Modo de acción**

La acción de las bacteriocinas está determinada por composición de la membrana citoplasmática, la estructura y la expresión de una proteína en función de la inmunidad, además de la composición química del medio ambiente (Cintas et al, 2001).

Las bacterias Gram positivas se caracterizan por poseer un alto contenido en lípidos aniónicos en su membrana, en este caso el modo de acción de las bacteriocinas es la unión inicial a la membrana bacteriana por atracción electrostática entre los lípidos cargados negativamente y las bacteriocinas con su carga neta positiva localizada en uno de sus extremos después se produce la inserción de las bacteriocinas en la bicapa lipídica.

De este modo se forman poros en la membrana bacteriana, la cual queda permeabilizada, la célula empieza a perder iones y metabolitos fundamentales para su supervivencia y eventualmente se produce la muerte bacteriana (Bizani et al., 2005).

### **3.8 Probiótico.**

El término probiótico significa “a favor de la vida” y actualmente se utiliza para designar los microorganismos vivos que, administrados a una dosis suficiente contiene un efecto beneficioso a la salud general del hombre o animal (FAO/OMS, 2001).

El primer estudio que demostró los efectos beneficiosos de los microorganismos que fermentaban los alimentos fue llevado a cabo por Eli Metchnikoff, científico ruso y premio Nobel en Medicina en 1908, que señaló que estos microorganismos podían influir en el balance de la microbiota intestinal, y en parte, eran los responsables de la longevidad de los habitantes de Bulgaria (Felley et al., 2001). Metchnikoff, afirmó que “la dependencia de los microbios intestinales con respecto a los alimentos hace posible adoptar medidas para modificar la flora de nuestro organismo y sustituir los microbios nocivos por microbios “útiles” (Metchnikoff, 1907).

Se utilizó por primera vez el término probiótico por Lilly y Stillwell en el año de 1965, refiriéndose a “sustancia que estimula el crecimiento de otros microorganismos”. Este término se redefinió posteriormente como “agente microbiano viable que al utilizarse en el hombre o en animales aporta efectos beneficiosos en el huésped mejorando el balance de la microbiota intestinal (Salminen, 1998).

### ■ **Microorganismos probióticos.**

Son bacterias grampositivas y se utilizan, aunque no exclusivamente, bacterias de los géneros *Lactobacillus* (*L. acidophilus*, *L. johnsonii*, *L. casei*, *L. delbrueckii*) y *Bifidobacterium bifidobacterium bifidus*, *B. longum*, *B. breve*, *B. infantis*)

Para que se pueda determinar si un microorganismo es probiótico tiene que cumplir las siguientes propiedades (Romero, 2004):

- No ser patógeno ni toxigénico
- Formar parte de la microbiota del intestino humano
- Sobrevivir en su paso por el tracto digestivo
- Alcanzar su lugar de acción en el intestino en buenas condiciones viables
- Capacidad de adherirse a la superficie de las mucosas y prevenir la adhesión y colonización de patógenos

Los microorganismos probióticos utilizados en los alimentos deben ser capaces de sobrevivir al paso por el aparato digestivo, sino también de proliferar en el intestino. Esto significa que deben ser resistentes a los jugos gástricos y poder crecer en presencia de bilis, en las condiciones existentes en los intestinos, o ser consumidos en un alimento que, actuando como vehículo, les permita sobrevivir al paso por el estómago y a la exposición a la bilis (FAO/OMS, 2001).

### ■ **Mecanismos de acción de los probióticos:**

- Producción de sustancias antimicrobianas como por ejemplo ácido láctico, peróxido de hidrógeno, diacetilo y bacteriocinas. Estos compuestos reducen el número de células patógenas viables, afectan el metabolismo bacteriano o la producción de toxinas.

- Disminución del pH intestinal favoreciendo el crecimiento de microorganismos beneficiosos.
- Aumento de la resistencia a la colonización por competir con patógenos para unirse a los sitios de adhesión en la superficie del epitelio gastrointestinal.
- Competición por nutrientes.
- Estimulación de la respuesta inmune. La estimulación de la inmunidad innata y adquirida protege contra la enfermedad intestinal, estimulando la producción de inmunoglobulina A, activando macrófagos e incrementando la concentración del interferón gamma (Isolauri et al., 2001; Collado et al., 2007).

### **3.8.1 Género *Lactobacillus*.**

Son bacterias grampositivas con forma de bastoncillos, a menudo son largas y delgadas, aunque pueden observarse cocobacilos más pequeños, pueden presentarse en como células simples o en cadenas cortas o largas. Por lo general son inmóviles, no esporulados, la mayoría de las especies son anaerobio facultativas. Los lactobacilos se denominan así porque más del 50% de los productos terminales de la fermentación de la glucosa es ácido láctico, algunas especies también pueden producir ácido acético, etanol y CO<sub>2</sub>, algunas también producen diacetilo.

Tienen una amplia distribución y pueden encontrarse en plantas, vegetales, granos, semillas, leche cruda, productos lácteos, algunas se encuentran en el tracto digestivo en humanos y animales. Entre las especies, algunas se usan en la fermentación controlada de alimentos, algunas se consumen vivas por su efecto favorable en la salud intestinal (Ray, 2010).

Los lactobacilos son de una acidificación más lenta que en el caso de *Streptococcus* pero generalmente es más intensa gracias a una mejor resistencia a los pH ácidos, hasta 3.5 y a una concentración más elevada de ácido láctico (Leveau, 2000).

### **3.8.2 *Lactobacillus acidophilus*.**

Esta bacteria crece fácilmente en medios mucho más ácidos. Es una de las especies del género que se encuentra en mayor proporción en el tracto gastrointestinal de los humanos así como de los animales, se encuentra en el yeyuno en bajas cantidades,

pero en cantidades relativamente altas en el íleon. Sin embargo, también está presente en la boca y vagina (Ray, 2010).

Cuando se encuentran en suficiente proporción son considerados como probióticos, los cuales son capaces de modificar favorablemente el balance de la microbiota intestinal, inhibiendo el crecimiento de bacterias nocivas y también potencian el funcionamiento del sistema inmunológico. Este efecto es producido gracias a la capacidad de metabolizar cantidades relativamente grandes de los ácidos láctico y acético. Más aún pueden producir sustancias específicas inhibitorias, bacteriocinas, que son eficaces contra bacterias grampositivas estrechamente relacionadas (Ray, 2010).

Además, está involucrado en la producción de muchos productos de leche fermentada con valor probiótico. Su consumo tiene el potencial para ayudar a la digestión de lactosa, para evitar la diarrea del viajero, para reducir la duración de la diarrea por rotavirus, para ejercer la actividad antitumoral, para mejorar la actividad del sistema inmune y para ayudar en el control de colesterol en suero (Oliveira et al., 2001).

#### ● **Beneficios de *Lacobacillus acidophilus*:**

- Equilibrio de la microbiota intestinal: Prevención de diarreas

La diarrea infecciosa es un importante problema a nivel mundial, que causa varios millones de muertes cada año. Se estima que la diarrea transmitida por los alimentos afecta cada año hasta el 30% de la población, incluso en los países desarrollados (FAO/OMS, 2001).

La diarrea aguda, es causada principalmente por rotavirus en niños, además de estas infecciones hay muchas especies de bacterias que son causa de enfermedad y muerte en seres humanos, los probióticos pueden inhibir el crecimiento y adhesión de bacterias enteropatógenas que suelen causar este malestar (Coconnier, 1993).

Un problema que acompaña al tratamiento con antibióticos es la aparición de diarrea, los trastornos causados por estos en la microbiota intestinal pueden combatirse



mediante la ingestión regular de leche o de yogurt con *Lb. acidophilus*, la ingestión de esta cepa permite la colonización del intestino y equilibra la microbiota intestinal.

La acidificación del medio intestinal es suficiente para mejorar el tránsito intestinal y para inhibir numerosas bacterias patógenas como *E. coli* y *Salmonella*, el ácido láctico inhibe el metabolismo oxidativo, disminuye el pH intracelular y finalmente es bactericida. *Lb. acidophilus* es capaz de desconjugar sales biliares; el ácido biliar resultante actúa de manera más eficaz sobre el crecimiento de las bacterias patógenas (Leveau, 2000).

- Hidrólisis de la lactosa:

Las personas con intolerancia a la lactosa, no tienen la capacidad de producir lactasa ( $\beta$ -galactosidasa) en el intestino delgado. Cuando consumen la molécula de lactosa, su intestino delgado no puede metabolizarlas ni absorberlas, sino que pasan al colon, donde son hidrolizadas por la lactasa de diferentes bacterias, para producir glucosa y galactosa, entonces son metabolizadas y producen ácidos y gases, lo que da por resultado la acumulación de líquido, diarrea y flatulencia, el consumo de células vivas en especial de *Lb. acidophilus* reducen la intolerancia a la lactosa, este efecto positivo se ha atribuido a la capacidad de esta bacteria que es capaz de aportar la lactasa necesaria al intestino delgado dado que lo puede colonizar y en consecuencia suministrar la lactasa, a diferencia de bacterias como *Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus* y *Str. thermophilus* las cuales no sobreviven a la acidez estomacal y no son bacterias intestinales (Ray, 2010).

- Reducción del cáncer de colon:

Hay algunos datos iniciales que indican que los microorganismos probióticos pueden impedir o retrasar la aparición de ciertos tipos de cáncer, esto debido a que los elementos que constituyen la microbiota intestinal pueden producir sustancias carcinógenas como las nitrosaminas (FAO/OMS, 2001).

Además, muchas de las bacterias indeseables del colon poseen enzimas que pueden activar procarcinógenos, que pueden causar cáncer de colon, los *Lactobacillus* pueden reducir la producción de dichas enzimas, al incrementar la actividad

peristáltica intestinal contribuyen a la remoción regular de la materia fecal, esto disminuye las concentraciones de las enzimas y de carcinógenos en el colon, reduciendo la incidencia del cáncer (Ray, 2010).

En ratas alimentadas con leche con *Lb. acidophilus* tienen menos enzimas fecales ( $\beta$ -glucosidasa,  $\beta$ -glucuronidasa) capaces de convertir sustancias procancerígenas en cancerígenas. Así *Lb. acidophilus* podría ser responsable de una resistencia a la aparición de cáncer de colon (Leveau, 2000).

- Reducción de niveles de colesterol:

Se atribuye a dos posibles factores: uno es la capacidad de los lactobacilos para metabolizar el colesterol de la dieta, lo que reduce las cantidades absorbidas en la sangre, la otra posibilidad es que algunos lactobacilos tienen la capacidad de desconjugar las sales biliares y evitar su resorción en el hígado, éste órgano, a su vez, usa más colesterol para sintetizar las sales biliares e indirectamente ayuda a reducir los niveles de colesterol (Ray, 2010).

### **3.9 Inmovilización celular**

La inmovilización de microorganismos en soportes naturales o sintéticos proporciona estabilidad a las funciones celulares. Esta técnica permite alcanzar altas concentraciones celulares en volúmenes reducidos (Duran-Páramo, 2000).

La inmovilización celular puede ser definida como la ubicación física de células en un espacio o región específica, de forma natural o inducida, en la cual son capaces de mantener una actividad catalítica deseada (Karel et al., 1985).

Un evento que se da naturalmente gracias a procesos de adherencia a superficies o a otros microorganismos, debido a estructuras celulares o a sustancias que estos mismos segregan. De forma artificial o inducida, puede darse por atrapamiento en los espacios o poros de fibras y geles, entre muchos (Couto et al., 2004).

Para lograr que una inmovilización sea eficaz, se debe tener en cuenta que los espacios que se usarán como soporte de inmovilización cumplan con ciertos parámetros tales como la presencia de una superficie de adherencia amplia, que sea

de fácil operación y regeneración; debe tener buena porosidad con el fin de permitir un intercambio constante de sustratos, productos, o gases.; debe tener buena estabilidad química, biológica, mecánica y térmica así como resistente a enzima, solventes o cambios de presión. En cuanto a las células a inmovilizar, deben estar viables y deben mantener un metabolismo activo por periodos largos, así como su metabolismo no debe verse afectado por los procesos de inmovilización (Garzón-Jimenez, 2008).

Un soporte adecuado para la inmovilización de microorganismos debe proporcionar condiciones apropiadas para supervivencia de las células y su funcionamiento como inoculo, lo cual da como resultado una vida media suficientemente largo. Se requiere que el soporte no se tóxico, ni contaminante y que tenga una calidad constante, para permitir una liberación precisa de los microorganismos en el sitio de interés y eventualmente se evite la dispersión de los microorganismos (Gentry et al., 2004).

### ► **Ventajas de la inmovilización de células**

**Concentración de biomasa:** la concentración de biomasa no disminuye, pero tampoco aumenta, debido a que las células se encuentran atrapadas impidiendo su crecimiento y reproducción.

**Actividad metabólica:** Estudios han demostrado que el metabolismo de las células inmovilizadas es mucho mayor en comparación al presentado por células libres. El incremento a la actividad metabólica puede deberse a diferentes factores, que gracias al incremento de biomasa en el soporte, así como la concentración de nutrientes alrededor del soporte, permitirán que se presente este incremento. De igual forma debido a que tanto el soporte como la misma biopelícula que algunos de los microorganismos forman, atrapan gran parte de los nutrientes, sustancias presentes en el medio, estos estarán más disponibles que para las células inmovilizadas, que si estuvieran libres (Cohen, 2001).

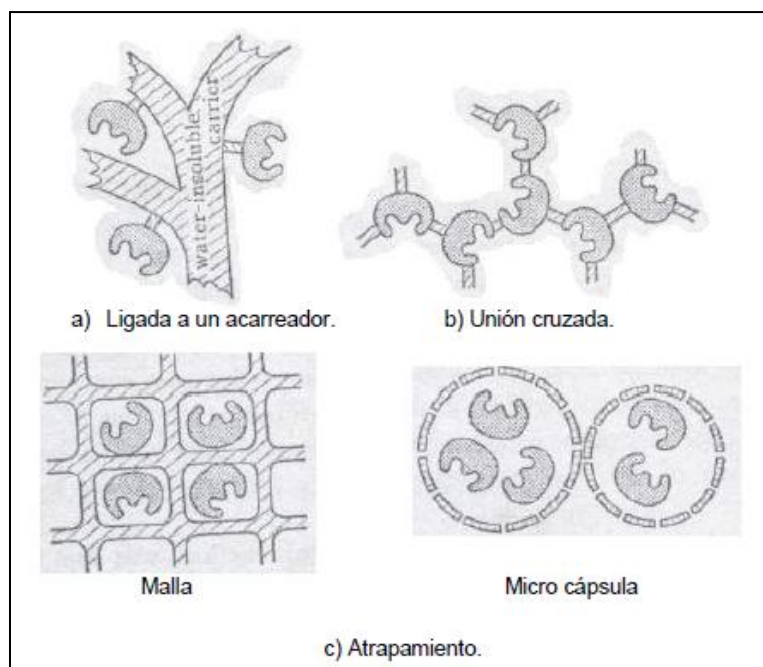
**Resistencia a la toxicidad:** estudios afirman que aquellos microorganismos que eran capaces de formar algún tipo de aglomeración o biopelícula, tenían mayor resistencia

que aquellos que no la formaban. Este fenómeno, es atribuido a diferentes razones entre las cuales se encuentran las diferencias fisiológicas entre los microorganismos inmovilizados y los de crecimiento libre; también es atribuido a la concentración de nutrimentos alrededor de la matriz, lo cual permite que los microorganismos sobrevivan a las altas concentraciones de compuestos tóxicos (Lazarova y Manem 1995), (Naza, 2007).

### 3.9.1 Técnicas de inmovilización

En 1978, Chibata propuso tres métodos generales para inmovilizar células microbianas (Figura 5), estos son:

- Ligada a un acarreador (carrier-binding), este método se basa en la unión de las células microbianas directamente en acarreadores insolubles en agua.
- Unión cruzada (cross-linking), basada en la unión de las células microbianas con reactivos bifuncionales o multifuncionales por enlaces químicos,
- Atrapamiento



Fuente: Chibata, 1978

**Figura 5. Métodos de inmovilización celular.**

El método de atrapamiento, es uno de más usados en los últimos años para la inmovilización celular y se basa en el confinamiento de las células en una malla formada por una matriz polimérica o micro cápsula formada de una membrana semipermeable. El método antes mencionado, difiere del método de unión cruzada en que la célula en sí, no se une con la matriz o la membrana (Chibata, 1978).

La técnica de atrapamiento es aplicable a diversos microorganismos y en ésta se utiliza gelatina, agar, gel de poliacrilamida, alginato de calcio, carragenina, quitosano, alcohol polivinílico o sol-gel como materiales para la formación de la matriz (Najafpour, 2007).

Otros materiales comúnmente usados como soporte para la inmovilización son los residuos lignocelulósicos, cuya ventaja adicional radica en la producción de azúcares durante su hidrólisis, lo que a su vez minimiza la generación de desechos (Zhang, et al., 2009).

## 4. MATERIALES Y METODOLOGÍA

---

### 4.1 Materiales

#### 4.1.1 Microorganismos empleados:

- ***Lactococcus lactis ssp. lactis* BM147:** La cepa empleada es perteneciente a la Colección de Cultivos del Instituto de Investigaciones Biomédicas (UNAM-48) de la Universidad Nacional Autónoma de México D.F.
- ***Lactobacillus acidophilus* ATCC® 4356:** La cepa fue importada de EUA por American Type Culture Collection.

#### 4.1.2 Medios de cultivo

##### **Leche descremada con un contenido de 9.9% de sólidos totales.**

Se preparó disolviendo, 11 g de leche descremada en polvo Svelty Figura 0% de Nestlé en 100 mL agua, se agitó durante 5 minutos y se esterilizó en autoclave a una temperatura de 121°C por 15 minutos.

##### **Medio industrial**

Este medio de cultivo fue propuesto por Golhaber (1982) elaborado con materias primas de grado industrial disueltas en agua destilada. La composición se describe en el cuadro 5.

**Cuadro 5. Composición del medio industrial**

Componente	gramo/Litro agua
Leche descremada <sup>1</sup>	60 g
Glucosa <sup>2</sup>	25 g
Extracto de levadura <sup>3</sup>	10 g
Caseinato de sodio <sup>4</sup>	20 g
pH 7.2 ±0.1	

1. Svelty figura 0% de Nestlé®

2. J.T. Baker

3. BD DIFICO

4. Nutrical S.A de C.V.

- **Agar APT**

Se empleó Agar APT (BD DIFICO), su composición se muestra en el cuadro 6. 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 6. Composición Agar APT (DB DIFCO)**

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

- **Medio dilución**

Como medio de dilución, se empleó solución salina al 0.85%. Esta se preparó disolviendo 0.85 g 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 empleó papel filtro de poro abierto (KIMIA DISTRIBUIDOR)

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

#### **4.1.4 Leches empleadas**

Se utilizaron distintas marcas de leche con diferentes tratamientos térmicos, dichas leches se muestran a continuación en el cuadro 7.

**Cuadro 7. Tipos y marcas de leche empleadas**

<b>Marca y característica</b>	<b>Presentación</b>
Leche de establo Pasteurizada	
<b>Alpura®</b> clásica leche entera pasteurizada	1 L
<b>Lala®</b> Leche entera pasteurizada	1 L
<b>Alpura®</b> selecta. Leche entera ultrapasteurizada	1 L
<b>Lala®</b> leche entera ultrapasteurizada	1 L
<b>Nido®</b> Leche entera en polvo Nestlé	2.2 KG
<b>Alpura®</b> Leche entera en polvo	500 GR

Las leches pasteurizadas y ultrapasteurizadas, fueron adquiridas en tiendas de autoservicio. Y se mantuvieron a una temperatura de 4°C hasta su uso.

La leche de establo, fue obtenida de la ordeña de la mañana de un establo en el pueblo de Santa Cruz Acapixca, delegación Xochimilco, Ciudad de México. A las dos horas de su ordeño, se pasteurizó a una temperatura de 65°C durante 20 minutos y se conservó a 4°C hasta su uso.

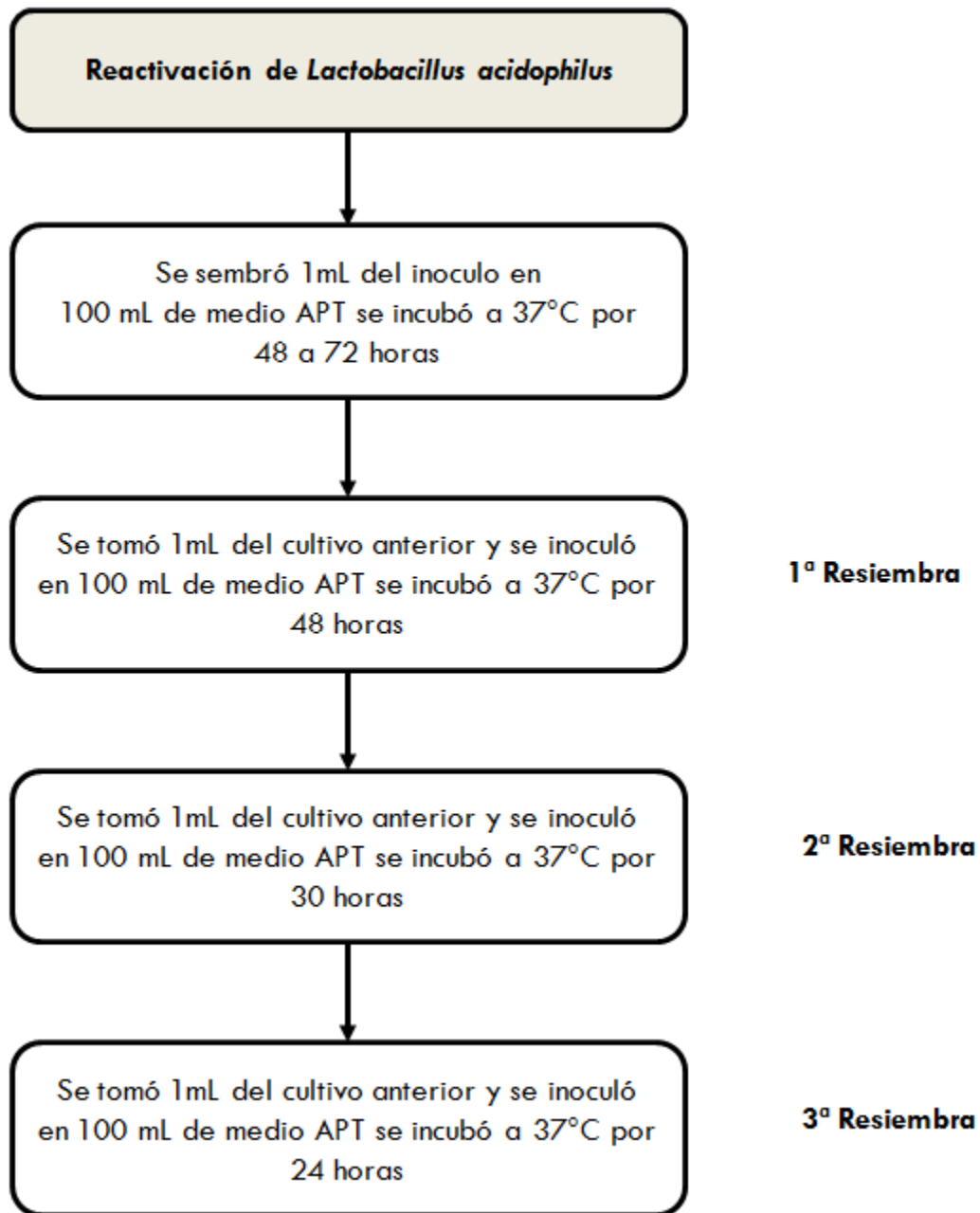
Para las leches en polvo, fueron preparadas en el momento al que iban a ser utilizadas y se prepararon al 9.1% de sólidos totales. Se pesaron 20 gramos de leche en polvo y se disolvieron en 200 mL de agua potable.



## 4.2 METODOLOGÍA

### 4.2.1 Reactivación de la cepa *Lactobacillus acidophilus*.

Los microorganismos liofilizados se reactivaron de acuerdo a la metodología propuesta por ATCC que se muestra en el siguiente diagrama.



#### **4.2.2 Propagación *Lactococcus lactis ssp. lactis***

Se partió de un inóculo sembrado en medio industrial con una concentración de  $10^9$  UFC/mL. Para la propagación se resembró 1 mL de inóculo en 100 mL de medio industrial, se incubó por 24 horas a 29°C.

#### **4.2.3 Curva de crecimiento *Lb. acidophilus* y *L. lactis ssp. lactis*.**

Se realizó una curva de crecimiento para ambas cepas, en el caso de *Lb. acidophilus*, se partió de la 3ª resiembra de la propagación de la cepa en medio APT.

Se tomó 1 mL de la tercera resiembra y se inóculo en 100 mL de medio APT esteril, se incubó a 37 °C, se cuantificó el crecimiento microbiano, durante 7 tiempos: 0, 4, 8, 24, 28, 32 y 48 horas.

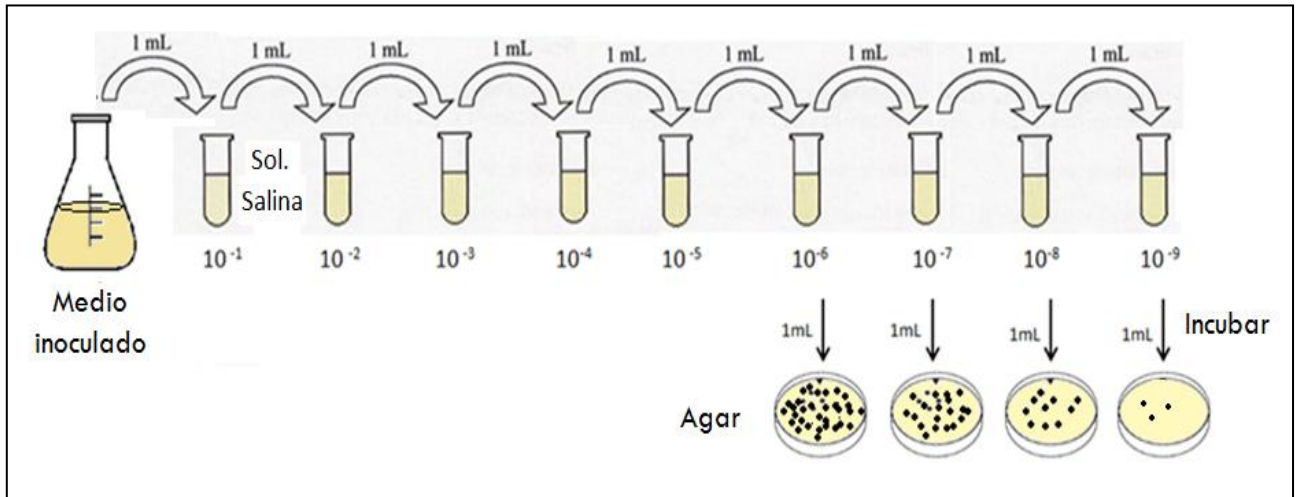
Para cuantificar el crecimiento microbiano, se tomó 1 mL de muestra del medio APT inculado en cada tiempo y se realizaron diluciones de  $10^{-1}$  a  $10^{-9}$ . Se sembró 1 mL en agar APT esteril de las diluciones  $10^{-4}$  a  $10^{-7}$  para los tiempos 0, 4 y 8, para los tiempos 24, 28, 32 y 48 horas de las diluciones  $10^{-4}$  a  $10^{-9}$ , las siembras se realizaron por duplicado y se incubaron a 37°C por 48 horas.

Para *L. lactis ssp. lactis* se tomó 1 mL de la propagación y se inóculo en 100 mL de medio industrial esteril, se incubó a 29°C, se cuantificó el crecimiento microbiano en 7 tiempos: 0, 2, 4, 6, 8, 10 y 24 horas.

Para cuantificar el crecimiento microbiano, se tomó 1 mL de muestra de medio industrial inculado en cada tiempo y se realizaron diluciones de  $10^{-1}$  a  $10^{-9}$ . Posteriormente, se sembró 1 mL en agar APT esteril de las diluciones  $10^{-3}$  a  $10^{-6}$  para los tiempos 0, 2 y 4 horas, para los tiempos 6 y 8 horas de las diluciones  $10^{-4}$  a  $10^{-7}$  y para los tiempos 10 y 24 las diluciones  $10^{-5}$  a  $10^{-9}$ , las siembras se realizaron por duplicado y se incubaron a 29°C por 48 horas.

Para ambas cepas se realizó la cuenta de las colonias y se obtuvo un promedio, el valor obtenido se multiplicó por el inverso de la dilución efectuada, dando como resultado, la población microbiana en viable cada uno distintos tiempos de crecimiento, UFC/mL.

En la figura 6 se muestra el ejemplo de la cuantificación en general del crecimiento bacteriano.



**Figura 6. Ejemplo de cuantificación de crecimiento bacteriano**

#### **4.2.4 Activación de *Lb. acidophilus* en medio industrial.**

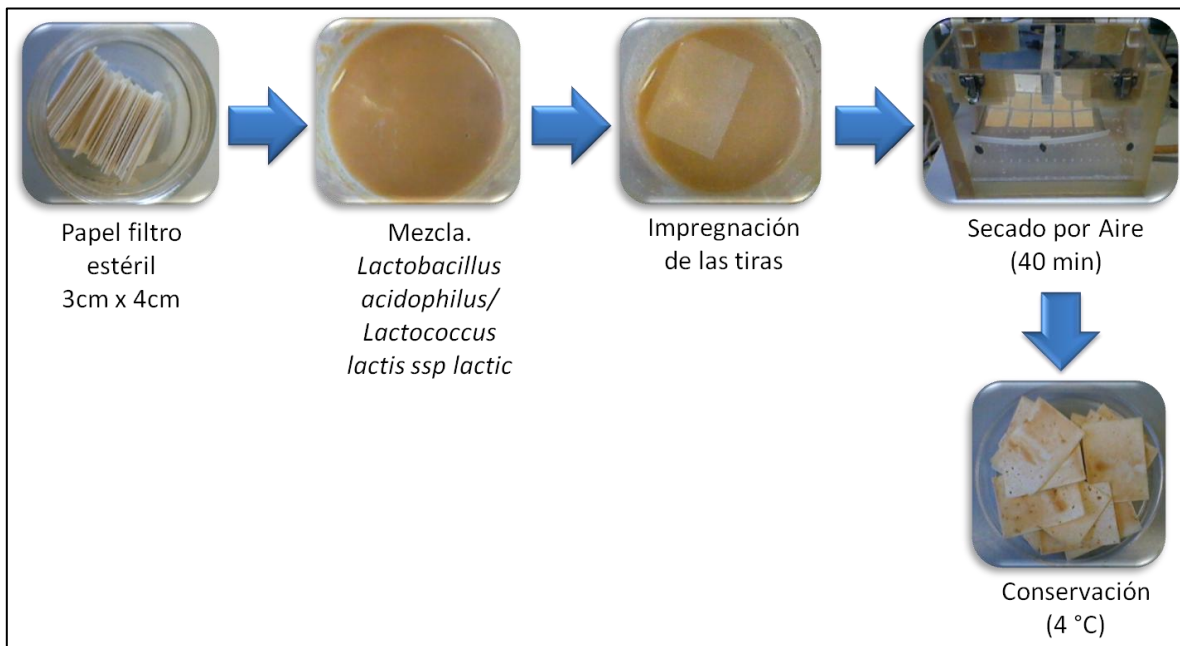
Del cultivo que se utilizó para la curva de crecimiento en medio APT, se inoculó 1 mL de *Lb. acidophilus* en 100 mL de medio industrial, se incubó a 37 °C por 48 h. Posteriormente se hicieron tres resiembras bajo las mismas condiciones.

#### **4.2.5 Inmovilización de *Lb. acidophilus* y *L. lactis ssp. lactis*.**

Para la inmovilización de las bacterias, se partió de cultivos de *Lb. acidophilus* y *L. lactis ssp. lactis* crecidos por separado en medio industrial a 37°C y 29°C respectivamente, durante 48 horas. Transcurrido ese tiempo, se combinaron las cepas 1:1, se agitó por 30 segundos y se sumergieron tiras de papel filtro en la mezcla, se retiró el exceso y se colocaron en una cámara de secado de aire (secador PPG, figura 7), la cual seca la muestra por medio de aire frío hasta obtener un peso constante; para el dispositivo el tiempo de secado fue de 40 minutos, hasta obtener peso constante. Una vez secado el dispositivo se colocó en cajas Petri de plástico para su conservación en refrigeración a una temperatura de 4°C. El procedimiento de inmovilización se muestra en la figura 8.



**Figura 7. Secador PPG**



**Figura 8. Inmovilización del dispositivo *Lb. acidophilus* y *L. lactis ssp. lactis* en el soporte de celulosa.**

A las tiras de papel filtro con *Lb. acidophilus* y *L. lactis ssp. lactis* inmovilizadas se le denomina dispositivo.

#### **4.2.6 Cuantificación bacteriana antes y después de la inmovilización.**

Se sumergieron 4 tiras de papel filtro de 3 cm x 4 cm en una mezcla 1:1 de *Lb. acidophilus* y *L. lactis ssp. lactis*, posteriormente 2 tiras se inmovilizaron, como se describe anteriormente. A las tiras sin inmovilizar se les realizó cuenta en placa,

para lo cual estas tiras se sumergieron en solución salina estéril agitando durante 30 segundos y se realizaron diluciones hasta  $10^{-9}$ . Las últimas cuatro diluciones se sembraron, tomando 1ml de cada dilución por separado vertidas en cajas Petri y agregando 15 mL agar APT estéril, se incubaron a  $29^{\circ}\text{C}$  durante 48 horas. Transcurrido ese tiempo, se realizó la cuenta de las colonias, y se obtuvo un promedio y el valor obtenido se multiplicó por el inverso de la dilución efectuada. Obteniéndose así, la población microbiana, UFC/tira, presentes en las tiras sin inmovilización.

Para las tiras inmovilizadas se realizó el mismo procedimiento y se comparó la población microbiana, UFC/tira, presente en las tiras inmovilizadas y sin inmovilización.

#### **4.2.7 Aplicación del dispositivo en diferentes tipos de leche a diferentes temperaturas.**

Como se pretende que el dispositivo sea empleado en la fermentación de una amplia variedad de leches de vaca se decidió realizar pruebas con marcas de leche comerciales para probar que el dispositivo funciona con cualquier leche en un rango de temperatura de  $23^{\circ}\text{C}$  a  $37^{\circ}\text{C}$  en un tiempo de 24 horas.

Para las pruebas se utilizaron las leches descritas en el apartado de materiales.

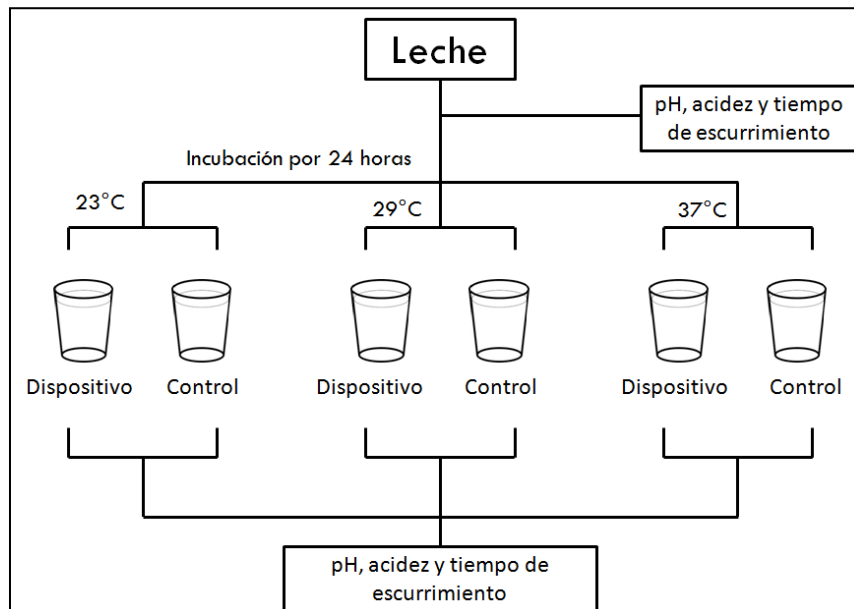
A cada una de las leche empleadas se les determino pH, acidez y tiempo de escurrimiento a temperatura ambiente,  $23^{\circ}\text{C}$ , tomando una muestra de 50 mL.

Para las mediciones de pH, acidez y tiempo de escurrimiento se emplearon los siguientes métodos:

- Determinación de pH: se utilizó un potenciómetro CORNING Pinnacle 530 pH meter, electrodo de vidrio.
- Determinación de acidez se tomaron 10 mL de muestra que se titularon con NaOH 0.1N y como indicador se empleó fenolftaleína al 1%.
- Determinación del tiempo de escurrimiento, este se determinó empleando un cronometro para medir el tiempo que tardaba en desplazarse 25 mL de muestra colocados en una bureta de 50 mL con una salida modificada a un diámetro de 0.7mm, el tiempo se tomó a partir de que la llave de la bureta se abrió.

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 de cada tratamiento aplicando el mismo tiempo y temperaturas de incubación (23, 29 y 37°C).

Transcurridas las 24 horas de incubación a todas las muestras se les determinó pH, acidez y tiempo de escurrimiento. Este procedimiento se realizó por duplicado, registrando el promedio obteniendo. En la figura 9 se muestra el procedimiento de aplicación del dispositivo en leche.



**Figura 9. Procedimiento de aplicación del dispositivo mezcla *Lb. acidophilus/L. lactis ssp. lactis* en leche.**

#### **4.2.8 Evolución del pH, acidez y viscosidad al aplicar el dispositivo en diferentes tipos de leche a temperatura ambiente.**

Para cada marca y tipo de leche empleada se tomaron 10 muestras de 100 mL y se les aplicó el dispositivo, se enumeraron del 1 al 10, y se incubaron a temperatura ambiente (23°C), las muestras se fueron monitoreando en 10 tiempos: 0, 3, 6, 9, 15, 18, 21, 24, 27 y 30 horas. Es decir a la muestra 1, le

correspondió el tiempo 0 se determinó pH, acidez y viscosidad, a las 3 horas se tomó la muestra 2 y se determinó los mismos parámetros, a las 6 horas la muestra 3 y así sucesivamente hasta completar un periodo de 30 horas. Este procedimiento se realizó por duplicado, registrando el promedio obteniendo.

#### **4.2.9 Evaluación Sensorial.**

##### **4.2.9.1 Prueba de preferencia del dispositivo mezcla: *Lb. acidophilus/ L. lactis ssp. lactis* en diferentes tipos de leche.**

Se evaluó la preferencia del dispositivo mezcla (*Lb. acidophilus* y *L. lactis ssp. lactis*) en tres tipos de leches entera, pasteurizada, ultrapasteurizada y leche en polvo (al 10% de sólidos), todas las leches empleadas fueron de la marca Alpura®.

Para esto, se realizó una prueba de ordenamiento para determinar la preferencia entre los distintos tipos de leche mencionados. La prueba se realizó en la Facultad de Química con 100 consumidores, jueces no entrenados.

Los dispositivos empleados para la elaboración de las bebidas tipo yogur se elaboraron un día antes y almacenaron a 4 °C. Para la preparación de las muestras fue la siguiente:

Para cada tipo de leche se tomaron 20 vasos de 250 mL, y se les aplicó el dispositivo, se incubaron todas las muestras a 23 °C por 25 horas, transcurrido ese tiempo y previo a la degustación a las bebidas tipo yogurt se determinó su pH y su acidez.

Posteriormente se mezclaron los 20 vasos correspondientes a cada bebida y se le adicionó un 10% de azúcar refinada.

Se sirvieron 20 mL en vasos de poliestireno para un total de 100 muestras. Cada vaso se identificó con una clave. A cada evaluador se le proporcionó una charola con tres bebidas tipo yogurt elaboradas, sirviéndose a temperatura ambiente y se les entregó el siguiente cuestionario Figura 10.



Nombre: \_\_\_\_\_ Sexo: F M Edad: \_\_\_\_\_

1. INSTRUCCIONES: Frente a usted tiene 3 muestras de bebida tipo yogurt, evalúe de izquierda a derecha, enjuagándose entre cada muestra, y ordene de acuerdo a su preferencia siendo 1 la de mayor y 3 la de menor preferencia.

Preferencia	1	2	3
Clave			

1.1 De la muestra que eligió como preferida evalúe los siguientes atributos, marque con una X su nivel de agrado.

	Me gusta Mucho	Me gusta	Me gusta poco	Ni me gusta ni me disgusta	Me disgusta poco	No me gusta	Me disgusta mucho
Apariencia							
Color							
Olor							
Sabor							
Textura							

**Figura 10. Cuestionario empleado para la prueba de preferencia del dispositivo mezcla: *Lb. acidophilus/L. lactis ssp. lactis***

#### 4.2.9.2 Comparación entre dos bebidas tipo yogur elaboradas con diferentes dispositivos: Prueba triangular y de preferencia.

Teniendo como antecedente el dispositivo de *L. lactis ssp. lactis* realizado en la tesis “Dispositivo de bacterias lácticas inmovilizadas en un soporte de celulosa para la producción de una bebida tipo yogur” (De la Cruz, 2013). Para evaluar la diferencia entre el dispositivo de *L. lactis ssp. lactis* y el dispositivo mezcla (*Lb. acidophilus/L. lactis ssp. lactis*). Se realizó una prueba triangular así como una prueba de preferencia. Las bebidas tipo yogur que se evaluaron fueron preparadas con leche ultrapasteurizada marca Alpura®, éstas bebidas se dieron a probar a 100 consumidores o jueces no entrenados. La prueba se realizó en la Facultad de Química de la UNAM. Las muestras de bebida tipo yogur se prepararon de la siguiente forma:

Ambos dispositivos se elaboraron un día antes previo a la elaboración de las bebidas tipo yogur, y se conservaron a 4 °C. Posteriormente se tomaron 18 vasos



con 250 mL de leche ultrapasteurizada, a los cuales se les aplicó el dispositivo con *L. lactis ssp. lactis*, y se incubó a 23°C por 25 horas. Para el dispositivo mezcla (*Lb. acidophilus/ L. lactis ssp. lactis*) se realizó el mismo procedimiento.

Previo a la evaluación, a todos los vasos de las dos bebidas tipo yogurt de les determinó su pH y acidez. Posteriormente se mezclaron los 18 vasos correspondientes a cada dispositivo y se les adicionó un 10% de azúcar refinada. Se sirvieron 20 mL en vasos de poliestireno para un total de 100 muestras. Cada vaso se identificó con una clave.

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 se presentaron al evaluador, sirviéndose a temperatura ambiente, y se le entrego el siguiente cuestionario Figura 11.

UNAM. Facultad de Química Evaluación Sensorial. Bebida tipo yogurt

Nombre: \_\_\_\_\_ Sexo: F M Edad: \_\_\_\_\_

2. INSTRUCCIONES: Frente a usted tiene 3 muestras de bebida tipo yogurt, pruebe de izquierda a derecha, enjuagándose entre cada muestra. Existen 2 muestras iguales y una diferente, marque con una X la muestra diferente.

475	932	156

2.1 De las muestras que probó marque con una X la que prefiere.

Las iguales: \_\_\_\_\_ La diferente: \_\_\_\_\_

2.2 De la muestra que eligió como preferida evalúe los siguientes atributos, marque con una X su nivel de agrado.

	Me gusta Mucho	Me gusta	Me gusta poco	Ni me gusta ni me disgusta	Me disgusta poco	No me gusta	Me disgusta mucho
Apariencia							
Color							
Olor							
Sabor							
Textura							

**Figura 11. Cuestionario empleado para la prueba triangular y de preferencia entre dos bebidas tipo yogurt elaboradas con diferentes dispositivos.**

#### **4.2.10 Vida de anaquel del dispositivo mezcla *Lb. acidophilus/L. lactis ssp. lactis*.**

Para evaluar la influencia del tiempo de almacenamiento de los dispositivos mezcla sobre la aceptabilidad de las bebidas tipo yogurt por parte de los consumidores, se realizó una prueba triangular. Se probaron dos dispositivos, uno con 1 día de almacenamiento y otro con 6 meses de almacenamiento a 4°C.

Ambas bebidas tipo yogurt se evaluaron en leche ultrapasteurizada marca Alpura® y se prepararon de la siguiente manera:

Se tomaron 20 vasos con 250 mL de leche, a cada uno se le colocó un dispositivo almacenado durante 1 día a 4°C. El mismo procedimiento se realizó de igual forma con el dispositivo almacenado durante 6 meses a 4°C. Todos los vasos se incubaron a 23°C durante 25 horas.

Transcurrido el tiempo, se determinó pH y acidez a las muestras con ambos dispositivos. Previo a la degustación a cada mezcla se le adiciono un 10% de azúcar refinada, se sirvieron 20 mL en vasos de poliestireno.

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 se presentaron al evaluador, sirviéndose a temperatura ambiente, y se le entrego el siguiente cuestionario, figura 12.



Nombre: \_\_\_\_\_ Sexo: F M Edad: \_\_\_\_\_

1. INSTRUCCIONES: Frente a usted tiene 3 muestras de bebida tipo yogurt, pruebe de izquierda a derecha, enjuagándose entre cada muestra. Existen 2 muestras iguales y una diferente, marque con una X la muestra diferente.

102	731	485

De las muestras que probó ¿cual prefiere? Marque con una X

Las iguales \_\_\_\_\_ La diferente \_\_\_\_\_ Ambas \_\_\_\_\_

!!!GRACIAS!!!

**Figura 12. Cuestionario empleado para la prueba triangular para vida de anaquel.**

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. Aplicando la siguiente ecuación:

$$\chi^2 = \frac{(|x_1 - np| - 0.5)^2}{np(1-p)}$$

Dónde:

 $x_1$  = No. De aciertos

n= No. De jueces

p= probabilidad de éxito en un ensayo =0.33

1-p= Probabilidad de falla en un ensayo =0.66

0.5 = factor de correlación

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1 Curva de Crecimiento

En la figura 13 se muestra el crecimiento de *Lb. acidophilus* con respecto al tiempo, se observa que no presentó una fase lag, esto pudo deberse a que los microorganismos tuvieron una pre-activación antes de ser inoculados, facilitando su crecimiento, de manera que inmediatamente se observa su fase exponencial, transcurridas 24 horas de incubación se observa que alcanza su fase estacionaria, presentando a ese tiempo una población de  $10^9$  UFC/mL, para las 48 horas la población se siguió manteniendo el nivel de concentración.

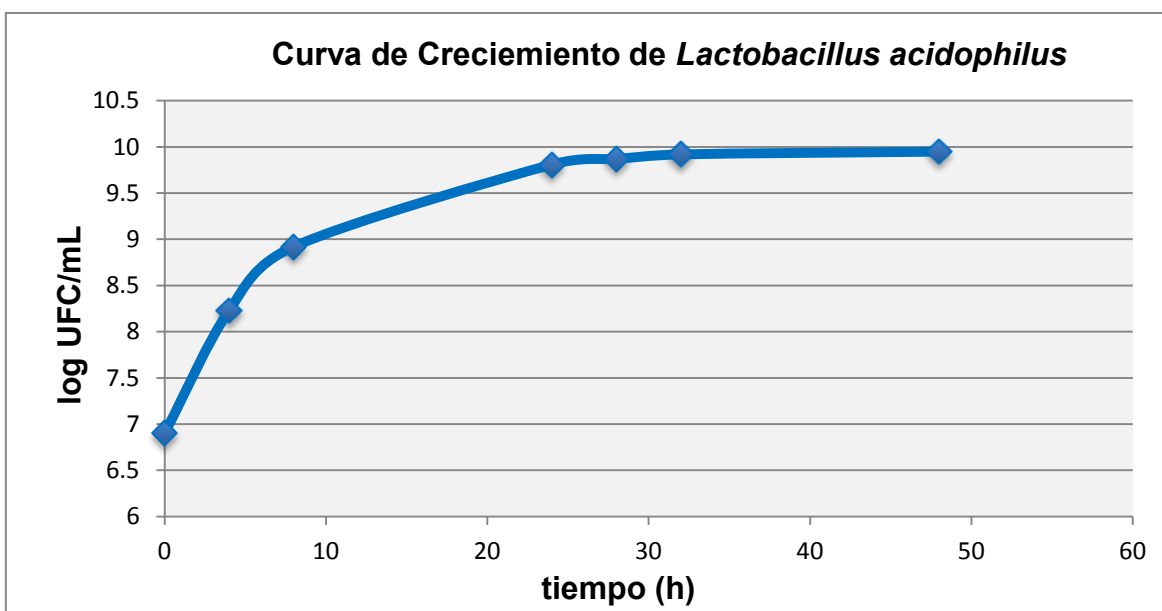


Figura 13. Curva de crecimiento de *Lb. acidophilus* incubado a 37°C

Para el caso de *L. lactis ssp. lactis*, en la figura 14 se observa su curva de crecimiento obtenida, en esta se observa una pequeña fase lag, y alcanza su fase estacionaria alrededor de las 10 horas de incubación, alcanzando una población de  $10^9$  UFC/mL, el crecimiento de esta bacteria es más rápido en comparación con *Lb. acidophilus*, recordemos que cada una de las cepas fueron incubadas a su respectiva temperatura óptima de crecimiento.

La literatura menciona que el plazo que se necesita para que una célula se divida o para que la población celular se duplique se conoce como tiempo de generación, no todas las bacterias tienen el mismo tiempo de generación, este depende en gran medida de los nutrientes presentes en el medio de cultivo y de otras condiciones como la temperatura de incubación. Para el caso de *Lb. acidophilus* incubado a 37°C en leche su tiempo de reproducción es de 66 a 87 minutos. Mientras que para *L. lactis ssp. lactis* bajo las mismas condiciones es de 26 minutos (Pelczar, 1990). En base a esto y pese a que las curvas de crecimiento se realizaron bajo las condiciones óptimas de cada bacteria, los resultados obtenidos concuerdan con lo antes mencionado, reflejando en general que *L. lactis ssp. lactis* tarda menos tiempo en llegar su fase estacionaria en comparación que *Lb. acidophilus*, siendo que para ambas bacterias la concentración que se mantuvo en esta fase fue  $10^9$  UFC/mL.

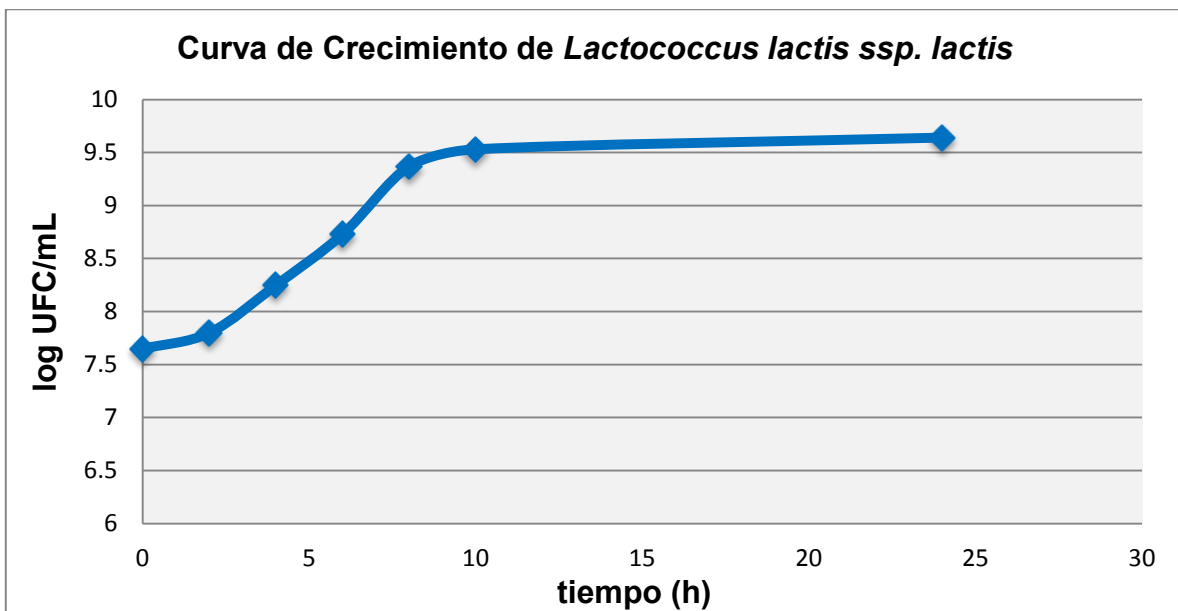


Figura 14. Curva de crecimiento de *L. lactis ssp. lactis* incubada a 29°C

## **5.2 Cuantificación bacteriana antes y después de la inmovilización.**

En la cuenta en placa del dispositivo antes de ser secado se obtuvo un resultado de  $3 \times 10^9$  UFC/tira y una vez inmovilizadas las bacterias, se encontró que disminuyó la población microbiana un ciclo logarítmico, obteniendo un resultado de  $1 \times 10^8$  UFC/tira. A pesar de esta disminución, en el dispositivo quedaron impregnadas una cantidad significativa de bacterias, que de acuerdo con lo reportado en la literatura, el rango sugerido de concentración de bacterias para ejercer un efecto benéfico es de  $10^6$  a  $10^7$  UFC/mL (Ray, 2010). Por tanto el dispositivo desarrollado cuenta con la cantidad de bacterias suficientes para ejercer un efecto benéfico sobre el huésped. Además, varios estudios han demostrado que el metabolismo de las células inmovilizadas es mucho mayor en comparación al presentado por las células libres (Angelova, et al., 2000). El incremento en la actividad metabólica, puede deberse a diferentes factores: Mandigan y colaboradores (2004); afirman que gracias al incremento de la biomasa en el soporte, así como la concentración de nutrientes alrededor del soporte, permitirán que se presente este incremento. De igual forma debido a que tanto el soporte como la misma biopelícula que algunos de los microorganismos forman, atrapan gran parte de los nutrientes presentes en el medio, estos estarán más disponibles para las células inmovilizadas que si estuvieran libres (Cohen, 2001).

## **5.3 Aplicación del dispositivo en diferentes tipos de leche y en diferentes temperaturas.**

El dispositivo se probó en varios tipos de leche con diferente tratamiento térmico, para asegurar que este no interferirá en la producción de la bebida tipo yogur. Se tomó como referencia la leche bronca, la cual al presentar un mínimo procesamiento y una menor modificación en su composición, en comparación con las leches de marcas comerciales, las cuales son sometidas a procesos como homogeneización, envasado, tratamientos térmicos, adición de inhibidores o antibióticos, los cuales podrían intervenir en el funcionamiento del dispositivo.

Se emplearon las marcas de leches de mayor consumo en México, encabezado por Grupo Lala® con el 34%, seguido por Alpura® con 22% y en tercer lugar Nestlé (<http://eleconomista.com.mx/industrias/2014/07/02/mexicanos-consumen-mas-leche-que-resto-latinoamericanos>)

La leche fermentada es la que ha sido transformada por desarrollo de bacterias lácticas que transforman la lactosa en ácido láctico y otros metabolitos, el cambio principal que se da en la leche es el descenso de pH; en el cuadro 8 se muestran los resultados promedios de pH obtenidos.

**Cuadro 8. Influencia de la temperatura en el pH de las bebidas tipo yogur elaboradas con diferentes tipos de leche incubadas por 24 horas.**

Leche		LECHE BRONCA	EN POLVO		PASTEURIZADA		ULTRAPASTEURIZADA	
			ALPURA	NIDO	ALPURA	LALA	ALPURA	LALA
Inicial (23°C)		6.78	6.69	6.78	6.68	6.72	6.67	6.67
Final (24 horas)	Control 23°C	6.69	6.56	6.22	6.52	6.31	6.6	6.6
	Dispositivo 23°C	4.64	4.39	4.4	4.49	4.51	4.38	4.38
	Control 29°C	5.63	5.95	6.18	6.26	6.19	6.65	6.65
	Dispositivo 29°C	4.34	4.25	4.37	4.34	4.27	4.32	4.32
	Control 37°C	5.43	5.18	6.15	5.28	4.98	6.65	6.65
	Dispositivo 37°C	4.33	3.67	3.9	4.2	4.24	4.18	4.19

Para la muestra inicial correspondiente a cada leche, se observa que el pH de cada una es muy cercano al reportado en la literatura, 6.70 (Badui, 2006). Lo cual refleja que las leches empleadas son de buena calidad.

Para las muestras control, si dispositivo, se observa que incubadas a 23°C no hay un cambio significativo en el pH, sin embargo, a 29° y 37°C las muestras comienzan a presentar un descenso de pH esto es debido pueden estar presente bacterias lácticas, éstas son mesofílicas, y pueden llegar a crecer a una temperatura de 20°C, estos microorganismos no deterioran la calidad de la leche, pero requieren nutrimentos, que obtienen produciendo enzimas que hidrolizan la

lactosa, proteínas, grasas u otras sustancias de la leche, produciendo así compuestos como ácido láctico lo cual se refleja en el descenso de pH, también puede presentar formación de gas y producir cambios en el olor (Walstra, 2001).

La temperatura de crecimiento de los microorganismos es un factor estimulante para el descenso de pH. Las bacterias con las que se está tratando tienen diferentes temperaturas óptimas de incubación, siendo *Lb.acidophilus* catalogada como termófila y *L. lactis ssp. lactis* como mesófila.

Para las muestras incubadas a 37°C con el dispositivo después de 24 horas, el pH disminuye aún más, presentando valores de 4.30 hasta 3.60 esto debido a que ambas bacterias se encuentran o aun sobrepasado su temperatura óptima de crecimiento, lo que favorece un mejor desarrollo que se reflejara en pH más bajos debido a la producción de ácido láctico. De acuerdo a la literatura el pH del yogur debe ser igual o inferior a 4.60 (Romero y Mestres, 2004), para el caso de *Lb. acidophilus*, esta puede reducir el pH del medio hasta 3.50 (Ray, 2010).

Para las muestras incubadas a 29°C con el dispositivo, los resultados obtenidos de pH oscilan entre 4.3, esto debido a que para *L. lactis ssp. lactis* es su temperatura óptima de crecimiento y lo que también comienza a estimular a *Lb. acidophilus*.

Para las muestras incubadas a 23°C con el dispositivo, todas las muestras presentaron un pH entre 4.64 y 4.38, para esta temperatura de incubación se obtuvieron valores de pH más altos a comparación de 29° y 37°C, esto es debido a que ninguna de las bacterias se encuentran en su temperatura de crecimiento óptima, sin embargo, los valores obtenidos a temperatura ambiente son deseables para una bebida fermentada como el yogur, se ha encontrado que en los yogurts mexicanos el pH oscila entre 3.95 y 4.70 (García, 2004).

Otro factor que influye en el desarrollo de las bacterias, es el tipo de tratamiento previo al que ha sido sometida la leche.

Tomando como referencia la leche bronca, la cual tiene un tratamiento térmico menos drástico el pH obtenido oscila entre 4.30 y 4.60 esto debido a que el tratamiento térmico al que se sometió, no eliminó totalmente la carga microbiana



de la leche, por tanto hay competencia entre los microorganismos que sobrevivieron en la leche y las bacterias del dispositivo.

En el caso de las leches pasteurizadas, UHT y en polvo, el tratamiento térmico al que fueron sometidas presentaron valores de pH más bajos en comparación con la leche bronca, esto debido a que el tratamiento térmico que recibieron es más drástico y hay una mayor eliminación de microorganismos de la leche, por lo cual las bacterias empleadas en el dispositivo pueden desarrollarse mejor al no tener competencia por los nutrimentos, esto es más notable para la bebida elaborada con leche UHT, en la cual el dispositivo tiene un mejor comportamiento esto independientemente de la temperatura de incubación a la que se someta, ya que en los resultados obtenidos de pH son muy similares para las tres temperaturas manejadas, el tratamiento térmico de la leche UHT al ser el más drástico de las leches empleadas favorece un mejor comportamiento del dispositivo, en especial para el caso del *Lb. acidophilus*, la cual es una bacteria que no forma parte de la flora láctica y crece muy lentamente en la leche, por esta razón se deben evitar las contaminaciones durante la fabricación de la leche acidófila (Tamime y Robinson, 1991).

En el estudio previo: “*Dispositivo de bacterias lácticas inmovilizadas en un soporte de celulosa para la producción de una bebida tipo yogur*” (De la Cruz, 2013), donde el dispositivo elaborado solo con *L. lactis ssp. lactis*, se encontró que en las bebidas elaboradas con este dispositivo en la leche UHT presentan también un mejor comportamiento dado que el pH del producto final es más bajo con este tipo de leche, reportando un valor de 4.63 a 23°C de incubación, sin embargo, en comparación para las bebidas elaboradas con el dispositivo mezcla *Lb. acidophilus*/*L. lactis ssp. lactis* el pH obtenido a estas mismas condiciones es más bajo, 4.38, debido a que ambas bacterias al estar en conjunto contribuyen a disminuir aún más el pH del medio en comparación a que estuviera una sola bacteria.

También hay otros estudios en el que se elaboran bebidas fermentadas con *Bifidobacterium* y *Lactobacillus acidophilus* en donde la muestra se incubó a 43°C por 4 horas, transcurrido ese tiempo el pH obtenido es de 4.6 (Ruíz y Ramírez 2009), comparando este resultado con los obtenidos pese que las muestras fueron incubadas a 23°C se alcanzaron pH más bajos en comparación con el estudio antes mencionado.

Cabe la posibilidad que exista una simbiosis entre *L. lactis ssp. lactis* y *Lb. acidophilus*, como se da en el caso de los microorganismos del yogur, en donde los lactobacilos y los estreptococos establecen un fenómeno de asociación o simbiosis cooperativa que es beneficioso para ambos microorganismos, pero no necesarios. Este tipo de relación se conoce como proto-cooperación (Early, 1998).

La principal función de las bacterias lácticas es la acidificación de la leche, transformando la lactosa en ácido láctico, su importancia se debe a que contribuye a la textura y proporciona sabor característico a las bebidas. En el cuadro 9 se presentan los resultados promedios de acidez obtenidos.

**Cuadro 9. Influencia de la temperatura en la acidez (%ácido láctico) de las bebidas tipo yogur elaboradas con diferentes tipos de leche incubadas por 24 horas.**

Leche		LECHE BRONCA	EN POLVO		PASTEURIZADA		ULTRAPASTEURIZADA	
			ALPURA	NIDO	ALPURA	LALA	ALPURA	LALA
Inicial (23°C)		0.172	0.201	0.139	0.215	0.197	0.220	0.212
Final (24 horas)	Control 23°C	0.262	0.23	0.15	0.262	0.291	0.23	0.261
	Dispositivo 23°C	0.786	0.702	0.62	0.678	0.803	0.74	0.846
	Control 29°C	0.279	0.34	0.35	0.369	0.313	0.241	0.276
	Dispositivo 29°C	0.806	0.74	0.66	0.975	0.873	0.946	1.06
	Control 37°C	0.679	0.47	0.38	0.473	0.459	0.244	0.274
	Dispositivo 37°C	0.925	1.08	0.89	1.28	1.25	1.07	1.16

La leche posee una acidez natural debida a algunos de sus componentes, caseínas, proteínas del suero, fosfatos coloidales y otros componentes como el ácido cítrico y otros ácidos orgánicos. La relación entre pH, acidez y crecimiento de bacterias lácticas, no es directa, aun que están estrechamente ligados. La velocidad de acidificación, depende del tipo de cultivo, heterofermentativo u homofermentativo. En el pH de la leche el ácido láctico no está totalmente disociado y la acidez mide todo el ácido, a diferencia del pH que solo la cantidad disociada (Romero y Mestres, 2004).

Para el caso de las muestras incubadas a 37°C con el dispositivo presentaron un mayor porcentaje de ácido láctico, en promedio 0.98% para leche en polvo, 1.26% para pasteurizadas, 1.11% para las UHT y leche bronca con 0.92%, esto debido al mejor desarrollo que presenta las bacterias a dicha temperatura, en especial *Lb. acidophilus*, ya que se encuentra a su temperatura óptima de crecimiento, además es una bacteria ácido tolerante, el contenido de ácido láctico en la leche puede elevarse un 1 a 2% si no se conserva a una temperatura suficientemente baja, la leche adquiere un sabor muy fuerte y el número de bacterias viables se reduce muy rápidamente (Walstra, 2001).

Las bebidas incubadas a 29°C con el dispositivo presentaron un porcentaje de acidez menor, en comparación con las muestras incubadas a 37°C, a 29°C se obtuvieron valores promedio de 0.80% para leche bronca, 0.7% para leche en polvo, 0.9% para pasteurizadas y 1% para UHT esta temperatura favorece el crecimiento de *L. lactis ssp. lactis*, la cual en condiciones óptimas puede producir hasta 1% de ácido láctico (Ray, 2010), también a esta temperatura ayuda al desarrollo de *Lb. acidophilus* lo que contribuye de forma importante a la producción de ácido láctico a la bebida.

En el caso de las bebidas incubadas a temperatura ambiente (23°C) presentaron un porcentaje promedio de 0.79% para leches UHT, 0.74% en pasteurizada, 0.66% para leche en polvo y 0.78% en leche bronca. A esta temperatura el crecimiento de ambas bacterias es más lento, sin embargo en el caso de *Lb.*

*acidophilus* a pesar de ser catalogada como termófila, la aplicación de un *starter* puede facilitar su crecimiento a una temperatura de 20°C y producir de 0.5-1.5% de ácido láctico (Walstra, 2001).

Para las bebidas elaboradas con el dispositivo mezcla: *Lb. acidophilus* y *L. lactis ssp. lactis* se obtuvo un mejor desarrollo de acidez para todos los tipos de leche en comparación con el dispositivo antes mencionado elaborado solo con *L. lactis ssp. lactis* (De la Cruz, 2013), en donde una bebida elaborada con dicho dispositivo en leche en polvo incubada a 23°C por 24 horas, reportaron un valor de 0.50% de acidez, mientras que para la bebida elaborada con el dispositivo mezcla *Lb. acidophilus* y *L. lactis ssp. lactis*, al igual en leche en polvo bajo las mismas condiciones de incubación se obtuvieron valores de 0.70 % de ácido láctico, lo que refleja que el dispositivo elaborado con dos bacterias, *L. lactis ssp. lactis* y *Lb. acidophilus*, favorezca una mejor producción de ácido láctico incluso a temperatura ambiente, 23°C, como resultado de la mutua cooperación durante el crecimiento de estas bacterias en la leche, la producción de ácido láctico es mucho más rápida de lo que sería esperable en función del ácido que produce cada uno de los microorganismos cultivados individualmente (Early, 1998).

En el yogur se presenta también un fenómeno de antibiosis, ya que los cocos no pueden seguir desarrollándose a partir del momento donde se alcanza determinada acidez. Los bacilos son más acidorresistentes y su crecimiento no se detiene. Los efectos de protocooperación y antibiosis tienen una importancia fundamental en el desarrollo de las bacterias del yogur y sobre la calidad del producto final. La proporción de entre los dos microorganismos va cambiando, inicialmente los cocos crecen más deprisa debido a que los bacilos sintetizan factores de crecimiento, después del desarrollo de los cocos se hace más lento por el efecto del ácido producido. Mientras que los bacilos han empezado a crecer más rápidamente estimulados por los factores de crecimiento producidos por los cocos (Walstra, 2001).

La reducción del pH en la leche provoca cambios en las características fisicoquímicas de las micelas de caseína, llegando incluso a la formación de geles, debido a una desestabilización del complejo de las caseínas.

Cuando el pH de la leche disminuye hasta 4.6 el cual corresponde al punto isoeléctrico de las caseínas se induce una coagulación de éstas, esto debido a que forman una estructura tridimensional en la que el suero queda atrapado, cuando el pH alcanza alrededor de 4.8 a 4.3 las partículas de caseína forman grandes conglomerados que atrapan la grasa y el suero mismos que son responsables de la viscosidad. El gel obtenido es de textura granulosa, si la acidificación se realiza lentamente y de manera homogénea en la leche, se forma un coágulo liso y homogéneo (Romero y Mestres, 2004).

En el cuadro 10 se observan los resultados promedio obtenidos del tiempo de escurrimiento transcurridas las 24 horas de incubación. Hay varios factores que contribuyen a la consistencia y firmeza del yogur, como la temperatura de incubación y el tratamiento térmico al que fue sometida la leche para la bebida.

**Cuadro 10. Influencia de la temperatura en el tiempo de escurrimiento de las bebidas tipo yogur elaboradas con diferentes tipos de leche incubadas por 24 horas.**

Leche	LECHE BRONCA	EN POLVO		PASTEURIZADA		ULTRAPASTEURIZADA		
		ALPURA	NIDO	ALPURA	LALA	ALPURA	LALA	
Inicial (23°C)	5.57	5.3	5.2	5.27	5.4	5.31	5.16	
Final (24 horas)	Control 23°C	4.5	5.31	5.28	5.16	5.24	5.22	5.12
	Dispositivo 23°C	7.31	7.12	7.52	6.59	7.51	8.78	7.49
	Control 29°C	5.45	5.41	5.13	4.92	5.28	5.21	5.29
	Dispositivo 29°C	8.05	7.66	8.76	7.44	7.87	12.15	9.18
	Control 37°C	5.3	5.15	5.17	4.82	5.24	5.34	5.42
	Dispositivo 37°C	7.85	8.1	9.46	7.83	7.54	15.17	14.04

En las muestras control, leche sin dispositivo, ninguna presentó cambios significativos en su tiempo de escurrimiento, para el caso de las leches control incubadas a 29° y 37°C estas solo presentaron una ligera separación de suero (sinéresis), esto debido a la acidificación de la leche que se genera al someter la leche a altas temperaturas. Para el caso de las muestra control incubada a 23°C este cambio no se presentó.

Para las muestras incubadas a 29 y 37°C aplicando el dispositivo mezcla: *Lb. acidophilus* y *L. lactis ssp. lactis* presentaron un mayor tiempo de escurrimiento, obteniendo valores que oscilan entre 8 a 15 segundos, esto debido a que la temperatura favorece el crecimiento de ambas bacterias generando una mayor cantidad de ácido láctico, que se refleja en pH bajo, lo cual favorece la consistencia de la bebida debido a la desestabilización de las micelas de caseínas dando lugar a la formación del gel que caracteriza a una bebida fermentada como el yogur. Sin embargo, una acidez demasiado elevada,  $\text{pH} < 4$  favorece la contracción del coágulo, lo que se traduce en un aumento en la sinéresis (Romero y Mestres, 2004). A comparación de las bebidas incubadas a 23°C con el dispositivo, en donde éstas presentaron valores más bajos de tiempo de escurrimiento, alrededor de 5.1 a 5.5 segundos, debido a que la temperatura de incubación no es óptima para ambas bacterias, retardando así el descenso de pH hasta el punto isoeléctrico de las caseínas. Sin embargo, cuando la temperatura de incubación es baja, y más tiempo transcurre a alcanzar un determinado pH, el producto final es más firme, cuando se incubaba a 20°C y el gel se forma a esta temperatura, no se produce la separación del suero (sinéresis), debido a que ésta es muy dependiente de la temperatura de incubación (Walstra, 2001).

En comparación de cuando más alta es la temperatura de incubación, el pH deseado se alcanza más rápido dando lugar a la formación del gel, el producto final tiene una mayor tendencia a la separación del suero. La sinéresis se debe fundamentalmente a una reorganización de la red, que da lugar al aumento en el número de uniones entre las partículas. Como consecuencia, la red tiene a

contraerse y a expulsar el líquido intersticial que encierra. Evidentemente, la sinéresis es un proceso indeseable en el yogur (Walstra, 2001).

Como se mencionó antes el tratamiento térmico de leche empleada para la bebida también influye la consistencia final del producto, un calentamiento insuficiente puede resultar en un yogur con poco cuerpo y débil, mientras que un sobrecalentamiento ocasiona un producto con textura granular, 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, para lo cual es fundamental un tratamiento térmico considerable (García, 2004).

En general, para las bebidas elaboradas con leche UHT aplicando el dispositivo, presentaron un gel más firme similar a la de un “flan”, al romper este gel para homogeneizar la bebida, se obtuvo una consistencia característica a un yogur líquido comercial, para este tipo de leche se obtuvo un mejor desarrollo de la viscosidad del producto, alcanzado tiempos de hasta 15.17 segundos, esto también dependiendo de la temperatura de incubación, esto debido al tratamiento térmico al que ha sido sometida la leche utilizada, el efecto del calor sobre las proteínas tiene lugar en dos etapas, primero se altera la estructura originando desnaturalización y después, se produce la agregación de las proteínas seguidas de la coagulación. Estas reacciones dependen de la intensidad y duración del calentamiento (Early, 1998).

Para las muestras elaboradas con leche pasteurizada y en polvo aplicando el dispositivo, se obtuvieron resultados similares, entre 7 y 9 segundos de tiempo de escurrimiento, sin embargo, presentaron un gel más débil y mayor sinéresis en comparación con las bebidas elaboradas con leche UHT, esto es debido al proceso térmico correspondiente a cada leche, para el caso de la leche en polvo también se debe de considerar que en el proceso dado se desnaturalizan las proteínas del suero, pero esto no de manera excesiva lo que puede contribuir a la textura del producto final (Walstra, 2001).

La homogeneización de la leche también influye favorablemente en la bebida tipo yogur, por un lado se produce la incorporación mecánica de los pequeños glóbulos grasos dentro de la estructura del coágulo y por otro la incorporación de la caseína en la superficie de los nuevos glóbulos hace que actúen como grandes partículas de caseína, lo que implica que la concentración efectiva de superficie de caseína se ve incrementada contribuyendo a la formación de un gel más consistente (Romero y Mestres, 2004). Esto se refleja en el caso de la leche bronca aplicando el dispositivo, la cual no cuenta con un tratamiento térmico drástico ni un proceso de homogeneización, obteniéndose valores entre 7 y 8 segundos de tiempo de escurrimiento, incluso a la temperatura de 37°C, este tiempo es similares a las muestras de leche en polvo y pasteurizada, sin embargo, el gel que se obtuvo de la leche bronca era de cuerpo débil, presencia de grumos y sinéresis.

Se ha reportado que el proceso térmico más conveniente en términos de calidad de leche para una mejor consistencia del producto es la de alta temperatura por corto tiempo, como 98°C por 1.87 minutos, en procesos lentos (85°C 10 a 40 minutos) se obtiene una mayor firmeza y viscosidad, pero una pobre retención de agua y textura granular (Walstra, 2001).

En comparación con el dispositivo elaborado solo con *L. lactis ssp. lactis* mencionado anteriormente, en éste se reportaron valores de alrededor de 18 segundos en general para las bebidas elaboradas con leches UHT, Alpura® y Lala®, e incubas a 37°C por 24 horas (De la Cruz, 2013), este tiempo de escurrimiento es mayor en comparación con el dispositivo elaborado con *L. lactis ssp. lactis* y *Lb. acidophilus* bajo las mismas condiciones de tiempo y temperatura de incubación, en donde se alcanzó un tiempo de escurrimiento de 15.17 segundos esto puede deberse principalmente a que el método no es tan preciso debido a que durante la agitación para homogeneizar la bebida hay incorporación de burbujas de aire que induce a la acumulación del suero separado alrededor de las burbujas, lo que perjudica la estabilidad del coágulo (Romero y Mestres, 2004). Cuanto más vigorosa es la agitación, menor es la viscosidad, pero también más suave y homogéneo es el producto, es necesario un gel de gran consistencia para



poder batir con cierta intensidad sin que el producto resulte demasiado fluido (Early, 1998).

Otra razón podría ser que debido a que el dispositivo elaborado con *L. lactis ssp. lactis* y *Lb. acidophilus* alcanza pH más bajos, esto puede ocasionar que cuando el pH desciende por debajo de 4 puede producir sinéresis, durante el batido el gel se rompe en trozos, en los que inmediatamente comienza la sinéresis, se forma una mezcla heterogénea de coágulos y suero, al continuar el batido, los coágulos se rompen y se obtiene un producto más suave y uniforme pero no lo suficientemente viscoso (Early, 1998).

#### **5.4 Evolución de pH, acidez y viscosidad al aplicar el dispositivo en diferentes tipos de leche a temperatura ambiente (23°C)**

- Evolución de pH y acidez.

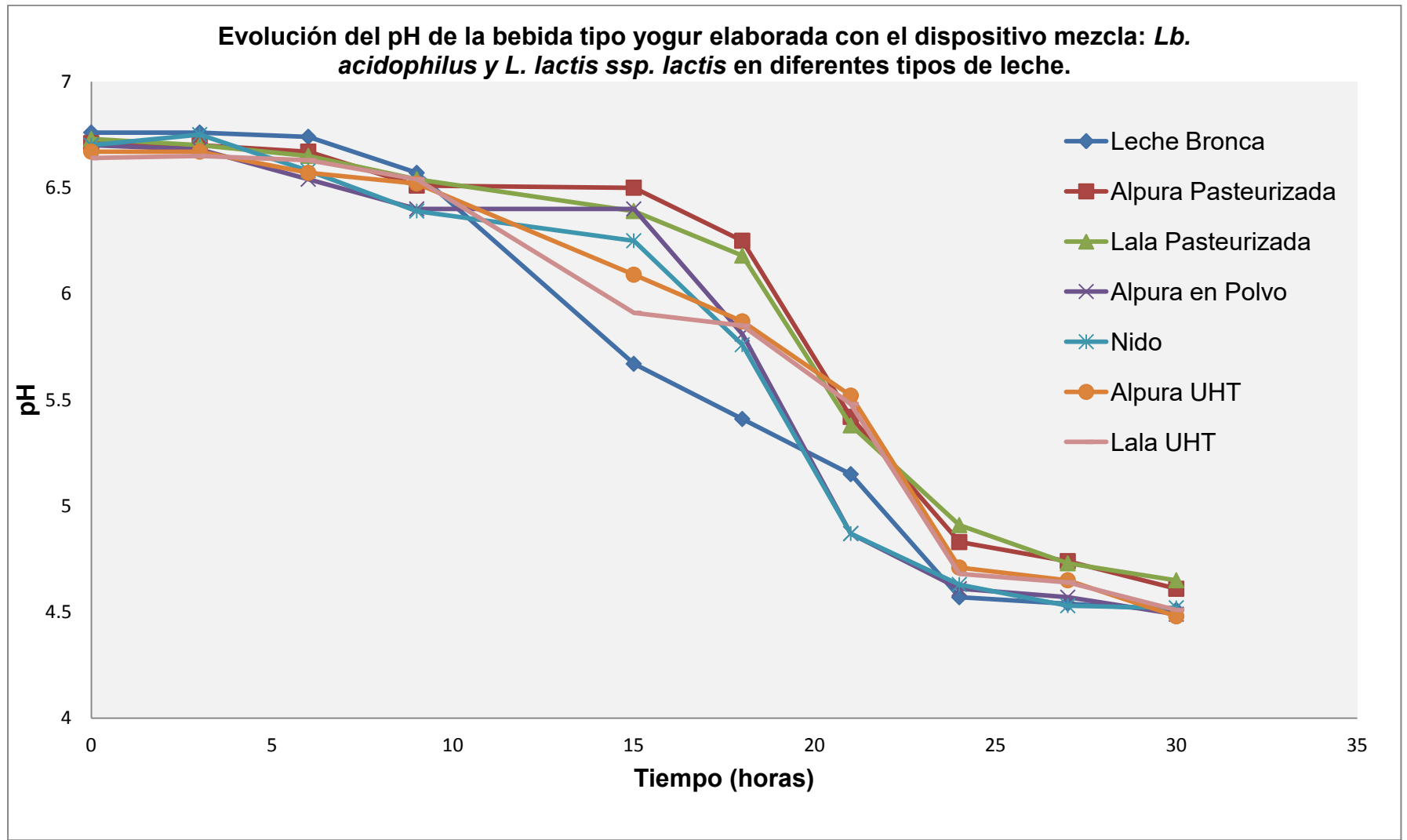
En la figura 15, se muestra el descenso de pH en relación con el tiempo de incubación de las bebidas tipo yogur. En general, se observa un comportamiento similar en la disminución de pH para todas las muestras, ya que a partir de las 15 horas se empieza a resaltar un mayor descenso en el pH. Sin embargo, para el mismo tiempo se observa que para la leche bronca el pH empieza a descender más rápido, a comparación de las otras muestras, esto debido a que el tratamiento térmico previo al que se sometió fue menos drástico, de manera que microorganismos que sobrevivieron en la leche pueden causar que se acidifique (Walstra, 2001).

A partir de las 18 horas, para las bebidas elaboradas con leche pasteurizada, UHT y en polvo, se observa un notorio descenso del pH, que posteriormente sigue en descenso hasta las 24 horas, en donde se observa que todas las muestras comienzan a acercarse al pH deseado para una bebida tipo yogur, pH de 4.60 (García, 2004).

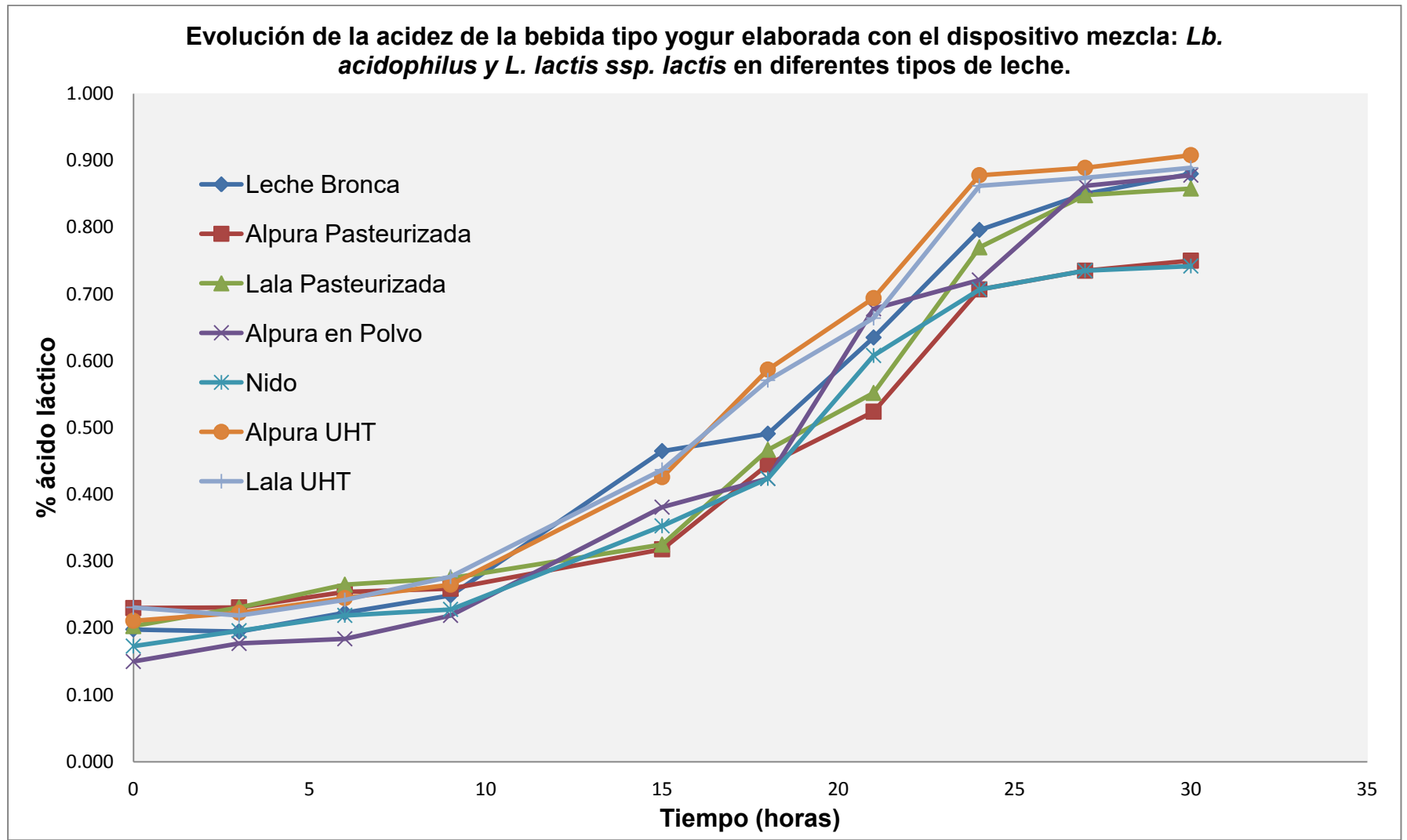
Considerando una protooperación entre *L. lactis ssp. lactis* y *Lb. acidophilus*, como en las cepas del yogur, el crecimiento de estreptococos se ve estimulado por la presencia en el medio de aminoácidos y péptidos liberados en la acción proteolítica del lactobacilo sobre las proteínas de la leche. A su vez el desarrollo de lactobacilos está favorecido por el desarrollo de ácido fórmico y el CO<sub>2</sub> producido por las células del estreptococo. En un cultivo mixto, inicialmente los estreptococos utilizan la lactosa y excretan la galactosa, permaneciendo activos hasta que el pH desciende hasta 4.60, después, los lactobacilos responden a la elevada concentración de galactosa (Early, 1998).

En la figura 16 se muestra el comportamiento de la acidez, la cual tiene comportamiento inverso al del pH, es decir, conforme el pH desciende la acidez tiende a aumentar, debido a la producción de ácido láctico. Al igual a las 15 horas la acidez comienza a aumentar, presentando porcentajes de ácido láctico entre 0.46% y 0.32, conforme transcurre el tiempo la acidez sigue aumentando, y para las 24 horas alcanza valores de 0.7% a 0.82% de ácido láctico, estos valores son muy cercanos a los deseados para un yogur, en donde la acidez alcanza valores entre 0.8 y 1.4% (García, 2004), posterior a las 24 horas de incubación la acidez sigue aumentando y se obtienen valores que van desde 0.75% hasta 0.9% de ácido láctico.

Como en el yogur, suponemos una simbiosis entre ambas bacterias empleadas, la relación entre microorganismos se modifica varias veces durante el transcurso de la incubación. En esta simbiosis los estreptococos es la que inicia la fermentación láctica y el que se desarrolla muy intensamente hasta un pH de 5.5, el consumo de oxígeno y la liberación de sustancias volátiles que produce, crea las condiciones ideales para que se desarrolle el lactobacilo. La actividad proteolítica, de los lactobacilos estimula, a su vez, el crecimiento y la actividad acidificante de los estreptococos. Los lactobacilos desarrollan parte una actividad lipolítica, por la que se liberan ácidos grasos y producen además acetaldehído, constituyendo así el aroma del yogur (Tamime y Robinson, 1991).



**Figura 15. Evolución del pH de la bebida tipo yogur elaborada con el dispositivo mezcla: *Lb. acidophilus* y *L. lactis ssp. lactis* en diferentes tipos de leche incubados a 23°C durante 30 horas.**



**Figura 16. Evolución de acidez (ácido láctico) de la bebida tipo yogur elaborada con el dispositivo mezcla: *Lb. acidophilus* y *L. lactis ssp. lactis* en diferentes tipos de leche incubadas a 23°C durante 30 horas.**

- Evolución de la Viscosidad:

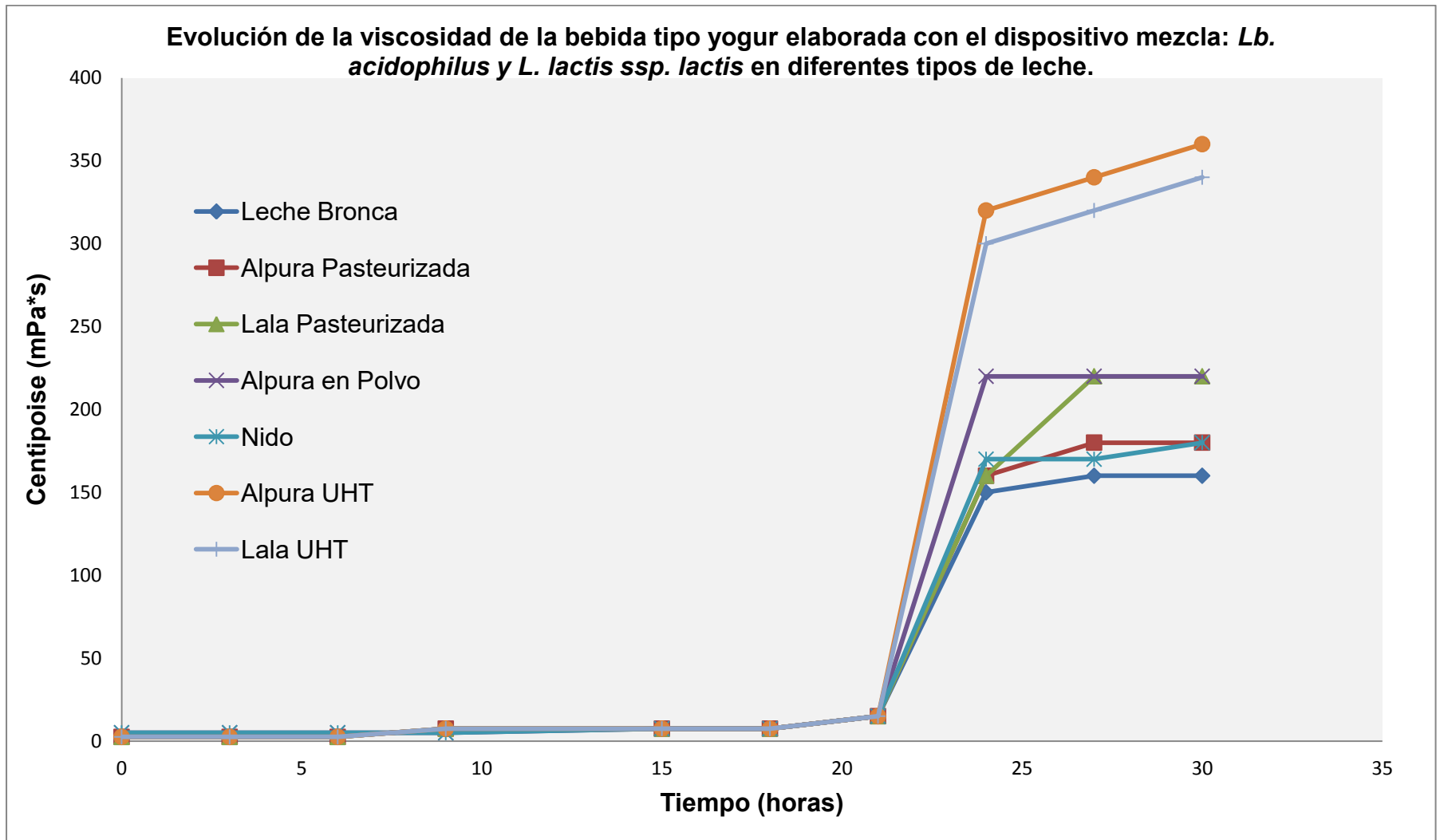
Uno de los atributos de gran importancia en el yogur es la textura, que suele percibirse en términos de la viscosidad y cuya medición es muy importante sobre todo en productos que se supone que deben tener una cierta consistencia en relación con su aspecto. Varios factores influyen en las propiedades reológicas del yogur, como la composición de la leche en términos de estructura de los ácidos grasos, las caseínas presentes, el contenido de vitaminas, de lactosa y de minerales (Tamime y Robinson, 1991).

Anteriormente, se estaba manejando tiempo de escurrimiento de la bebida tipo yogur, debido a que no era una medida convencional, para esta parte del trabajo experimental se determinó viscosidad utilizando el viscosímetro de Brookfield, para tener una mayor precisión y un manejo más rápido.

En la figura 17, se observa el cambio de viscosidad con respecto al tiempo, una vez aplicado el dispositivo, todas las bebidas muestran un comportamiento similar dentro de las primeras 21 horas. Para las 24 horas se refleja el aumento de viscosidad significativo esto puede ser debido a la desestabilización de las micelas de caseínas mediante el paso del fosfato y el calcio de un estado coloidal a una forma soluble que se difunde en la fracción acuosa de la leche, lo que determina una progresiva “depleción” o “agotamiento” del calcio de las micelas que conducen a la precipitación de las caseínas a valores de 4.6 a 4.7, dando lugar a la formación de un gel (Tamime y Robinson, 1991).

En el caso de las bebidas elaboradas con leche UHT, a las 24 horas muestran un mayor aumento en la viscosidad a comparación de las demás muestras, obteniendo valores de 300 centipoise y para las 30 horas alcanzan hasta 360 centipoise, siendo así las bebidas obtenidas con una mayor de viscosidad. La alta viscosidad de las bebidas elaboradas con leche UHT, está relacionada directamente con el pH y la acidez del producto, siendo estas muestras las más favorecidas en ambos parámetros, la literatura nos dice cuando el pH alcanza

valores de 5.1, las partículas sufren disociaciones parciales formando subpartículas, y cuando se alcanza pH del orden de 4.80 a 4.30 las partículas de caseína forman grandes conglomerados que atrapan la grasa y el suero, y que son responsables de las altas viscosidades del producto (García, 2004).



**Figura 17. Evolución de la viscosidad de la bebida tipo yogur elaborada con el dispositivo mezcla: *Lb. acidophilus* y *L. lactis ssp. lactis* en diferentes tipos de leche incubados a 23°C durante 30 horas.**

## 5.5 Evaluación Sensorial.

### 5.5.1 Prueba de preferencia de las bebidas tipo yogur elaboradas con el dispositivo mezcla: *Lb. acidophilus/L. lactis ssp. lactis* en diferentes tipos de leche.

A las bebidas fermentadas que se emplearon para la evaluación sensorial, se les determinó pH y acidez para garantizar que todas las muestras alcanzaron valores deseados para una bebida tipo yogur de estos parámetros.

En el cuadro 11 se observa que todas las bebidas elaboradas con el dispositivo, alcanzan valores tanto de pH como de acidez óptimos para una bebida fermentada. Además se observa que nuevamente la bebida elaborada con leche UHT el dispositivo tiene un mejor comportamiento dando un valor de pH de 4.36 el cual está por debajo de las otras bebidas, al igual que una mayor producción de ácido láctico, obteniendo 0.84%. Con estos resultados obtenidos y previo a la discusión anterior, se puede observar que las muestras son diferentes, tanto en pH, acidez, lo que conlleva a una textura diferente para cada bebida, dado el tipo de leche con el que haya sido elaborada, con la prueba de ordenamiento para la evaluación sensorial se pretende verificar que esta diferencia es identificada por los consumidores y conocer cuál muestra prefieren.

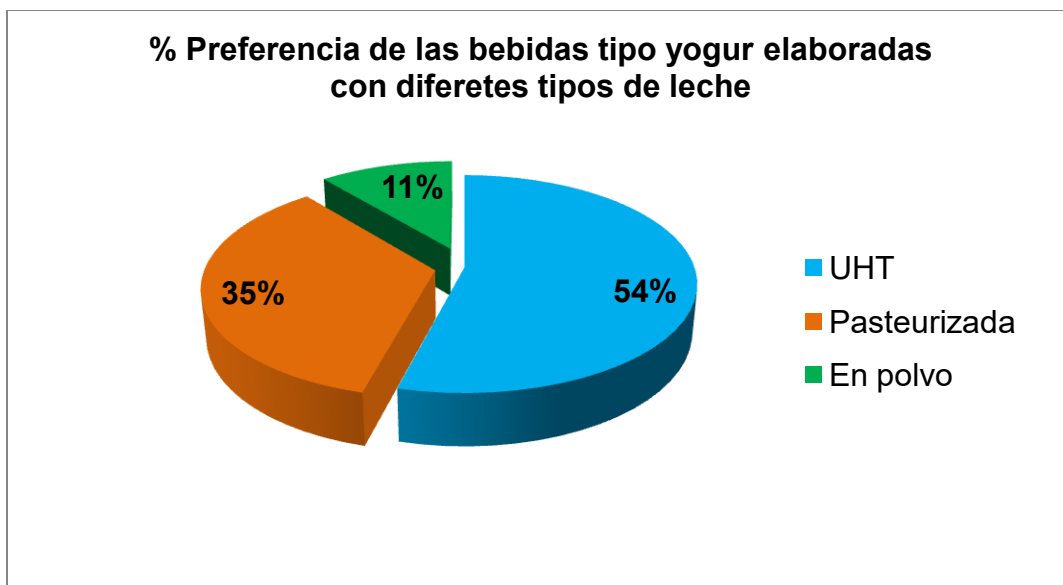
**Cuadro 11. Resultados de pH y acidez de las bebidas tipo yogur elaboradas con el dispositivo mezcla: *Lb. acidophilus/L. lactis ssp. lactis* en diferentes tipos de leche incubados a 23°C por 25 horas.**

No. De Muestra	TIPO DE LECHE					
	POLVO		PASTEURIZADA		UHT	
	pH	% Acidez	pH	% Acidez	pH	% Acidez
1	4.49	0.77	4.39	0.8	4.38	0.84
2	4.51	0.72	4.40	0.69	4.40	0.81
3	4.44	0.79	4.43	0.79	4.38	0.82
4	4.39	0.79	4.55	0.75	4.36	0.84
5	4.42	0.77	4.52	0.77	4.00	0.82
6	4.49	0.77	4.44	0.79	4.36	0.86
7	4.42	0.79	4.45	0.77	4.39	0.85
8	4.44	0.75	4.43	0.77	4.42	0.82
9	4.47	0.75	4.51	0.72	4.36	0.86



10	4.45	0.75	4.43	0.77	4.36	0.84
11	4.45	0.79	4.40	0.77	4.40	0.84
12	4.51	0.72	4.00	0.8	4.39	0.85
13	4.42	0.77	4.44	0.75	4.38	0.87
14	4.43	0.79	4.39	0.82	4.36	0.88
15	4.44	0.75	4.41	0.79	4.42	0.84
16	4.42	0.77	4.47	0.77	4.38	0.87
17	4.44	0.79	4.44	0.77	4.39	0.86
18	4.43	0.79	4.43	0.79	4.36	0.87
19	4.45	0.72	4.47	0.79	4.39	0.82
20	4.42	0.75	4.40	0.77	4.39	0.82
<b>PROMEDIO</b>	<b>4.45</b>	<b>0.76</b>	<b>4.42</b>	<b>0.77</b>	<b>4.36</b>	<b>0.84</b>
DS	0.03	0.02	0.11	0.03	0.09	0.02

En la figura 18 se observan los resultados de la prueba de preferencia, en donde la bebida fermentada elaborada con leche UHT fue la que obtuvo una mayor preferencia por los jueces, 54% de ellos eligieron esta bebida, seguida de la bebida con leche pasteurizada y al último bebida elaborada con leche en polvo.



**Figura 18. Resultados de la prueba de preferencia de la bebida tipo yogur elaboradas con dispositivo mezcla *Lb. acidophilus/L. lactis ssp. lactis* en diferentes tipos de leche.**

Los resultados obtenidos para la prueba de ordenamiento, fueron analizados con las tablas de Newell y MacFarlane (Pedrero, 1989) para determinar si existe diferencia significativa entre las tres bebidas tipo yogur, el en cuadro 12 se observan los resultados del análisis de ordenamiento en donde se obtuvo que para las bebidas elaboradas con leche UHT y pasteurizada no se encontró diferencia significativa entre ellas, mientras que para las bebidas elaboradas con leche pasteurizada y leche en polvo, si se encontró diferencia significativa al igual que en las bebidas elaboradas con leche UHT y leche en polvo. Por lo tanto los jueces fueron capaces de diferenciar las bebidas elaboradas.

**Cuadro 12. Prueba de preferencia: Análisis de Ordenamiento por Rangos**

$\Sigma$ UHT	$\Sigma$ Pasteurizada	$\Sigma$ Polvo
150	181	269

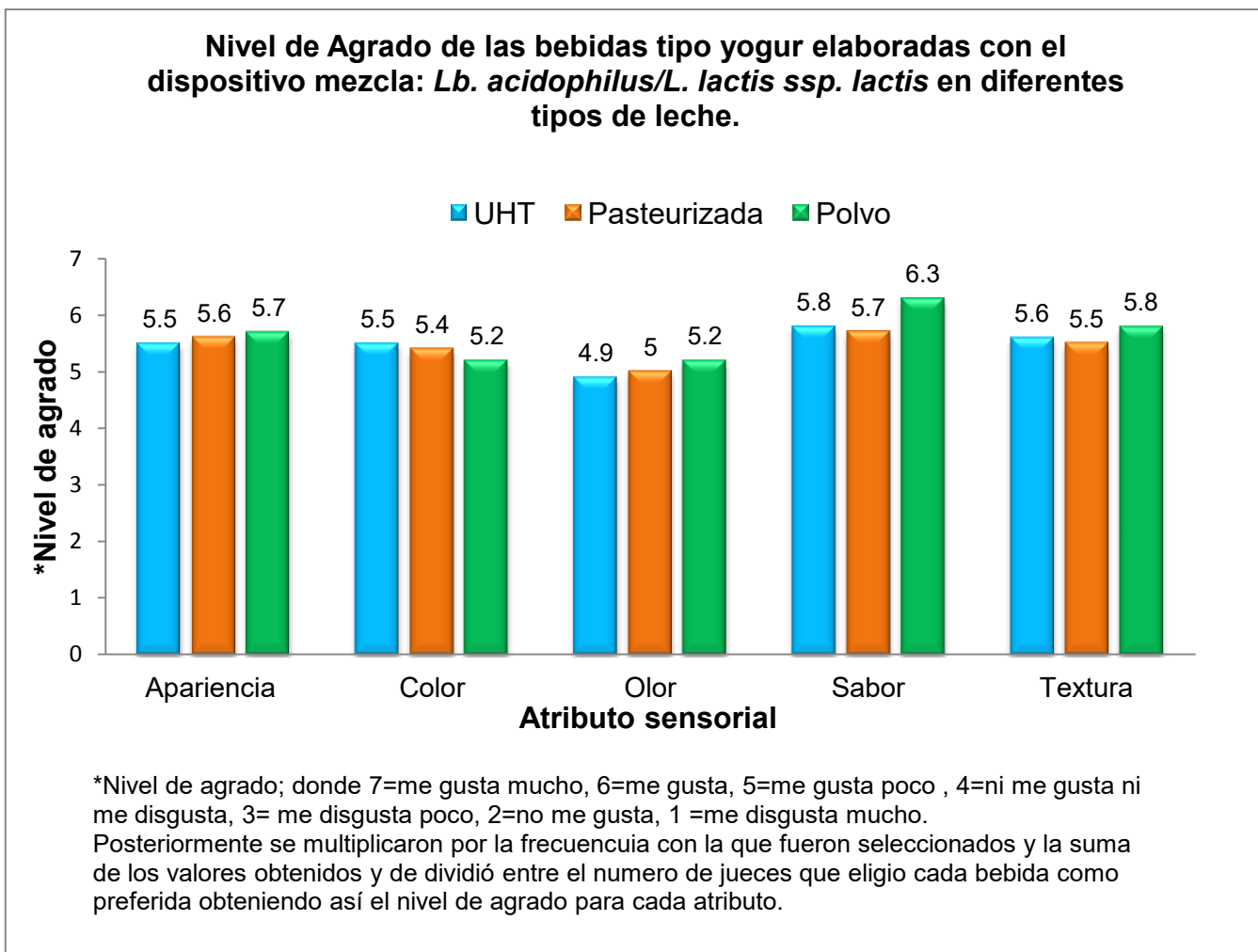
Diferencia de $\Sigma$	Valor tablas $\alpha$ 1%	Resultado y conclusión
$ \Sigma\text{UHT} - \Sigma\text{past}  = 150 - 181 = 31$	42	$31 < 42 \therefore$ NO hay diferencia significativa
$ \Sigma\text{UHT} - \Sigma\text{polvo}  = 150 - 269 = 119$		$119 > 42 \therefore$ SI hay diferencia significativa
$ \Sigma\text{past} - \Sigma\text{polvo}  = 181 - 269 = 88$		$88 > 42 \therefore$ SI hay diferencia significativa

En la figura 19 se observan los resultados obtenidos para el nivel de agrado de cada una de las bebidas evaluadas. La escala hedónica que se empleó va de 1 a 7, siendo 1 me disgusta mucho y 7 me gusta mucho. En los resultados obtenidos se observa que en general, los consumidores asignaron calificaciones similares a la bebida que seleccionaron como preferida, es decir, si un consumidor selecciono

la bebida tipo yogur elaborada con leche pasteurizada como preferida al evaluar sus atributos éste le asignó calificaciones similares a las de algún otro consumidor que prefirió la bebida elaborada con leche UHT.

Para los atributos de apariencia, color y textura de las tres bebidas se obtuvieron resultados similares, encontrándose dentro de la escala entre “me gusta poco” y “me gusta”, para el caso del olor todas las muestras mostraron una menor calificación, siendo este el atributo al que calificaron más bajo, y para el caso del atributo del sabor, se obtuvieron resultados ligeramente más elevados, y para el caso de la bebida elaborada con leche en polvo se observa que obtiene una mayor calificación en este atributo en comparación con las otras dos bebidas, sin embargo, recordemos que para el caso de esta bebida fue elegida como preferida por solo 13 jueces, por lo que podría significar que estos le dieron una calificación más alta en el atributo de sabor a comparación de las demás muestras en donde los valores pudieron ser más dispersos.

En general, las tres bebidas tipo yogur elaboradas fueron aceptas por los jueces, prácticamente para todos los atributos evaluados, las se obtuvieron calificaciones favorables.



**Figura 19. Resultados de la prueba de Nivel de agrado para las bebidas tipo yogur elaboradas con el dispositivo mezcla *Lb. acidophilus/L. lactis ssp. lactis* en diferentes tipos de leche.**

Para las bebidas elaboradas con el dispositivo mezcla *Lb. acidophilus* y *L. lactis ssp. lactis* los resultados obtenidos concuerdan con lo reportado en el estudio antes mencionado, “*Dispositivo de bacterias lácticas inmovilizadas en un soporte de celulosa para la producción de una bebida tipo yogur*” (De la Cruz, 2013), en este estudio se reportó que la bebida con mayor porcentaje de preferencia por los jueces fue también la elaborada con leche UHT, seguida de la pasteurizada y la leche en polvo.

### 5.5.2 Comparación entre dos bebidas tipo yogur elaboradas con diferentes dispositivos: Prueba triangular y de preferencia.

Para determinar si existe una diferencia significativa entre el dispositivo elaborado solo con *L. lactis ssp. lactis* de la tesis “Dispositivo de bacterias lácticas inmovilizadas en un soporte de celulosa para la producción de una bebida tipo yogur” (De la Cruz, 2013) y el dispositivo elaborado con *L. lactis ssp. lactis* y *Lb. acidophilus*, se realizó una prueba triangular, previo a la evaluación sensorial se tomaron valores de pH y acidez para cada bebida. Los resultados obtenidos se muestran en el cuadro 13, en donde se observa una vez más las bebida elaborada con la mezcla de bacterias *Lb. acidophilus* y *L. lactis ssp. lactis*, al cual llamamos dispositivo mezcla, obtuvieron un pH más bajo y un porcentaje de acidez más alto, en comparación con bebida elaborada solo con *L. lactis ssp. lactis*.

**Cuadro 13. Resultados de pH y acidez de las bebidas tipo yogur elaboradas con dos diferentes dispositivos, incubadas a 23°C por 25 horas, empleadas para la evaluación sensorial.**

No. De muestra	Dispositivo			
	<i>L. lactis ssp. lactis</i>		Mezcla ( <i>Lb. acidophilus/L. lactis ssp. lactis</i> )	
	pH	% acidez	pH	% acidez
1	4.53	0.74	4.37	0.82
2	4.46	0.76	4.38	0.81
3	4.46	0.73	4.36	0.84
4	4.45	0.77	4.37	0.80
5	4.52	0.72	4.00	0.82
6	4.49	0.74	4.38	0.84
7	4.51	0.74	4.36	0.84
8	4.53	0.75	4.38	0.82
9	4.46	0.73	4.36	0.84
10	4.53	0.72	4.38	0.82
11	4.53	0.72	4.36	0.82
12	4.55	0.69	4.39	0.89
13	4.51	0.74	4.37	0.86
14	4.49	0.72	4.37	0.84
15	4.51	0.73	4.36	0.82

16	4.46	0.73	4.39	0.84
17	4.45	0.69	4.36	0.82
18	4.53	0.69	4.39	0.84
<b>PROMEDIO</b>	<b>4.50</b>	<b>0.73</b>	<b>4.35</b>	<b>0.83</b>
DS	0.034	0.022	0.088	0.020

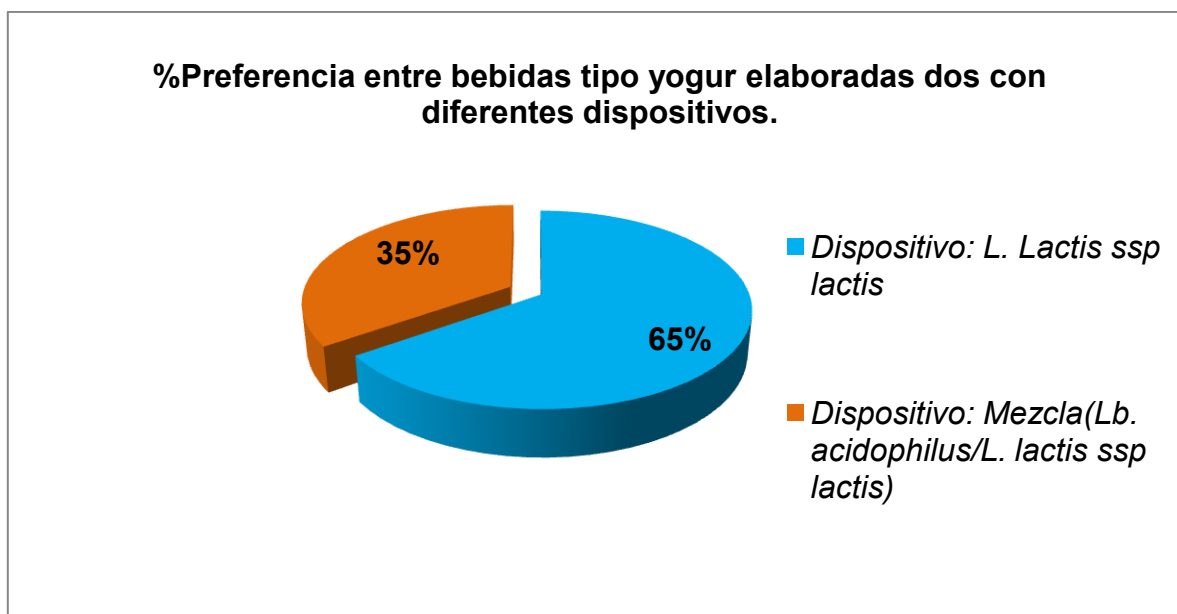
En el cuadro 14 se observan los resultados obtenidos, donde del 100% de jueces que evaluaron las bebidas, 46% fueron capaces de identificar cual era la muestra diferente de las tres bebidas presentadas, recordemos que dos muestras eran iguales y una diferente. Con el análisis de la prueba triangular, al calcular  $\chi^2$ , se obtuvo que si existe diferencia significativa entre ambos dispositivos evaluados, obteniendo una  $\chi^2$  experimental de 7.17 la cual es mayor al valor teórica el cual es de 6.63 reportado en tablas para la distribución estadística con un nivel de significancia de 1%. Por lo tanto existe diferencia significativa entre la bebida elaborada solo con *L. lactis ssp. lactis* y la bebida elaborada con la mezcla de bacterias (*Lb. acidophilus* y *L. lactis ssp. lactis*) esta diferencia es detectada por los jueces. Esta diferencia puede deberse a que la bebida fermentada con *Lb. acidophilus* y *L. lactis ssp. lactis* alcanzó una mayor acidez, el ácido láctico producido contribuye al sabor, aroma y textura, por lo que estos atributos pudieron ser más marcados y alcanzaron a ser percibidos por los jueces.

**Cuadro 14. Análisis de datos de la prueba triangular entre las bebidas tipo yogur con diferente dispositivo**

	Aciertos		Errores		
	46		54		
Dónde:					
$\chi^2 = \frac{( x_1 - np  - 0.5)^2}{np(1-p)}$	$\chi_1$ = No. De aciertos		= 46		
	n= No. De jueces		= 100		
	p= probabilidad de éxito en un ensayo		=0.33		
	1-p= Probabilidad de falla en un ensayo		=0.66		
	0.5 = factor de correlación				
$\chi^2 = \frac{( 46 - (100 \times 0.33)  - 0.5)^2}{(100 \times 0.33)(1 - 0.33)}$ $\chi^2_{exp} = 7.17$					
Valor de $\chi^2$ teórica $\alpha$ 1% = 6.63					
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="text-align: center;"><math>\chi^2</math> experimental = 7.17 &gt; <math>\chi^2</math> teórica = 6.63</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;"><b>∴ Si hay diferencia significativa</b></td> </tr> </table>				$\chi^2$ experimental = 7.17 > $\chi^2$ teórica = 6.63	<b>∴ Si hay diferencia significativa</b>
$\chi^2$ experimental = 7.17 > $\chi^2$ teórica = 6.63					
<b>∴ Si hay diferencia significativa</b>					

Posteriormente se pidió a las jueces que seleccionaran su bebida preferida, bebida elaborada con *L. lactis ssp. lactis* y bebida elaborada con *Lb. acidophilus* y *L. lactis ssp. lactis*. En la figura 20 se muestran los resultados obtenidos, en donde se observa que el 65% de los jueces prefirieron la bebida elaborada solo con *L. lactis ssp. lactis*, y el 35% de los jueces prefirió la bebida elaborada con la mezcla de bacterias. Esta diferencia entre la preferencia puede deberse a que en México, *Lb. acidophilus* no es muy común utilizada como microbiota primaria, debido posiblemente a la cultura de consumo de la mayoría de la población que acepta los productos lácteos, o a la acidez tan alta producida por esta bacteria durante la fermentación, que no es del gusto de los consumidores (Villegas et al., 2012). La Procuraduría Federal del Consumidor, en México, ha hecho estudios de las bebidas lácteas fermentadas disponible en la zona de la Ciudad de México y señalaron que *Lb. acidophilus* estaba ausente (Villegas et al., 2012).

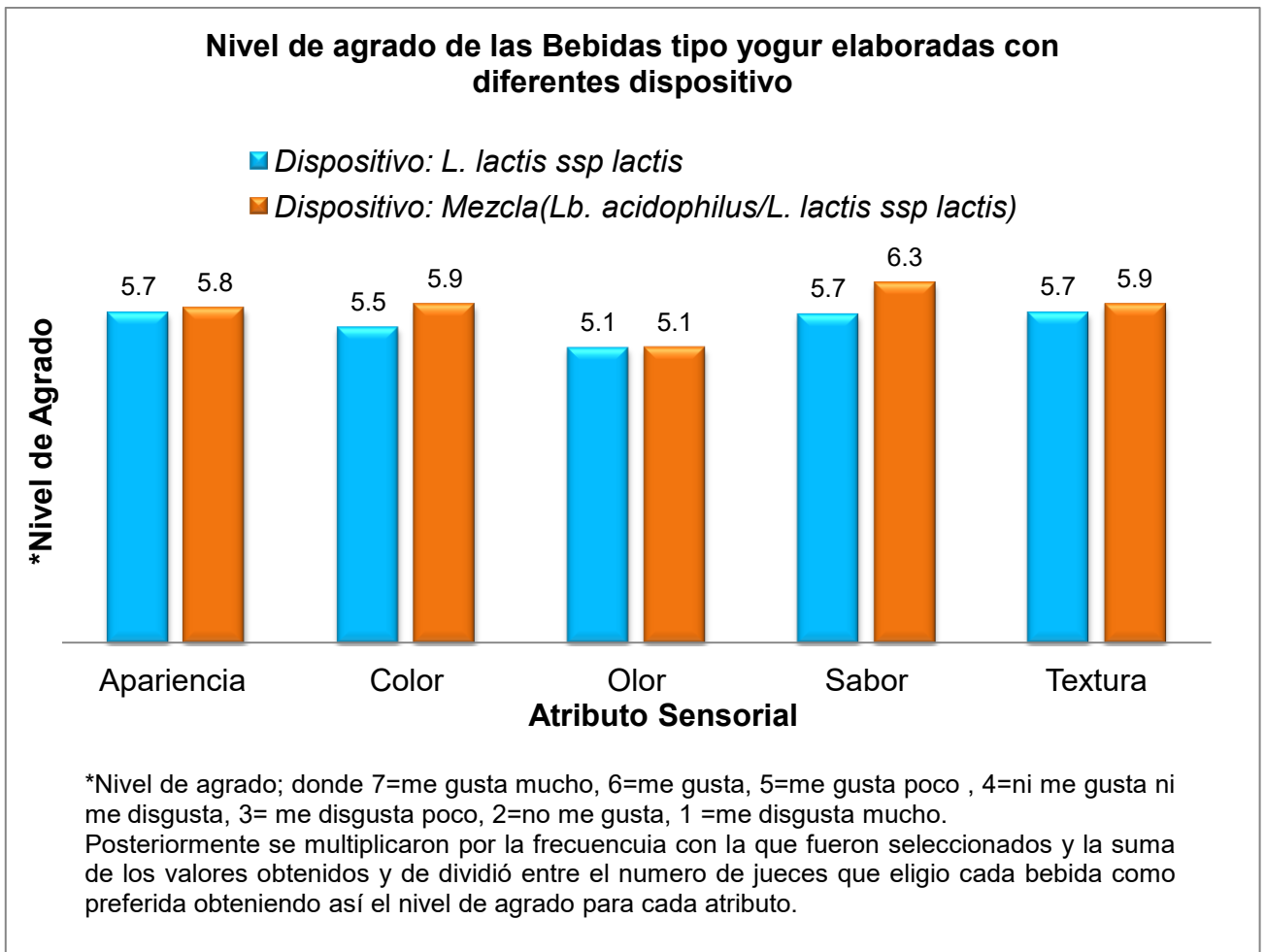
Recordemos que la bebida fermentada con *Lb. acidophilus* y *L. lactis ssp. lactis*, obtuvieron pH más bajo y una mayor acidez a comparación de la bebida fermentada solo con *L. lactis ssp. lactis*, por lo tanto esta diferencia se pudo influir en la preferencia de los jueces.



**Figura 20. Resultados de la prueba de preferencia entre bebidas tipo yogur elaboradas con diferentes dispositivos el de *L. lactis ssp. lactis* y el de la mezcla *Lb. acidophilus/ L. lactis ssp. lactis*.**

Al comparar los resultados del nivel de agrado de los atributos de las dos bebidas tipo yogur en la figura 21, se observó que ambas bebidas obtuvieron resultados muy similares. En el caso del atributo del olor, se obtuvieron valores iguales para ambas bebidas, encontrándose como “me gusta poco” dentro de la escala. Para los atributos de apariencia, color, textura y sabor, a pesar de que el 35% de los jueces seleccionaron como bebida preferida a la elaborada con el dispositivo de la mezcla de bacterias, estos calificaron ligeramente más alta estos atributos encontrándose prácticamente en “me gusta” dentro de la escala hedónica. En general ambos dispositivos presentan una buena aceptación por parte de los jueces.





**Figura 21. Resultado de la Prueba de Nivel de Agrado, de las bebidas tipo yogur elaboradas con dos diferentes dispositivos, el de *L. lactis ssp. lactis* y el de la mezcla (*Lb. acidophilus/L. lactis ssp. lactis*).**

## **5.6 Vida de anaquel del dispositivo mezcla *Lb. acidophilus/L. lactis ssp. lactis*.**

En el cuadro 15, se muestran los resultados obtenidos de pH y acidez para las bebidas elaboradas con el dispositivo que fue almacenado en refrigeración a 4°C durante 6 meses, y las bebidas elaboradas con dispositivos que fueron elaborados un día antes de la evaluación sensorial, para estas bebidas el pH promedio que se obtuvo fue de 4.37 con una acidez de 0.84%, estos valores prácticamente son iguales a los resultados obtenidos para las bebidas elaboradas con el dispositivo de 6 meses en almacenamiento, los cuales obtuvieron en promedio un pH de 4.39 y 0.82% de acidez, por lo tanto se refleja que el almacenamiento del dispositivo por un periodo de 6 meses en refrigeración no altera el metabolismo de las bacterias inmovilizadas en el mismo. Varios estudios han demostrado que el metabolismo de las células inmovilizadas es mucho mayor en comparación al presentado por células libres (Polprasert, 1989) (Angelova, et al., 2000) (Navarro y Durand, 1977). El incremento en la actividad metabólica, puede deberse a diferentes factores; como incremento de la biomasa en el soporte, así como la concentración de nutrientes alrededor del soporte, permitirán que se presente este incremento (Madigan et al., 2004)

Además algunos estudios han sugerido que al estar inmovilizados los microorganismos pueden desencadenar genes específicos que permiten un incremento su metabolismo (Lazarova y Manem, 1995) (Cohen, 2001).

**Cuadro 15. Resultados de pH y acidez de las bebidas tipo yogur elaboradas con dispositivos mezcla: *Lb. acidophilus/L. lactis ssp. lactis* incubadas a 23°C por 25 horas con diferentes tiempos de almacenamiento.**

No. De muestra	Dispositivo			
	1 día de almacenamiento		6 meses de almacenamiento	
	pH	% acidez	pH	% acidez
1	4.40	0.80	4.36	0.84
2	4.37	0.87	4.40	0.80
3	4.39	0.84	4.38	0.82
4	4.34	0.82	4.40	0.80
5	4.36	0.84	4.38	0.84
6	4.38	0.84	4.39	0.82
7	4.36	0.84	4.42	0.80
8	4.36	0.82	4.40	0.80
9	4.40	0.82	4.42	0.80
10	4.36	0.86	4.39	0.84
11	4.35	0.86	4.36	0.87
12	4.40	0.82	4.38	0.86
13	4.40	0.82	4.44	0.82
14	4.39	0.86	4.39	0.81
15	4.34	0.88	4.42	0.80
16	4.38	0.86	4.39	0.84
17	4.36	0.84	4.39	0.86
18	4.37	0.86	4.40	0.80
19	4.35	0.84	4.39	0.82
20	4.36	0.84	4.36	0.84
<b>PROMEDIO</b>	<b>4.37</b>	<b>0.84</b>	<b>4.39</b>	<b>0.82</b>
DS	0.020	0.021	0.021	0.023

Para la prueba sensorial se realizó una prueba triangular, para evaluar si los jueces no entrenados, identificaban la diferencia entre ambas bebidas, con el dispositivo de 6 meses de almacenamiento y 1 día de almacenamiento.

En el cuadro 16 se observa los resultados y análisis y de la prueba triangular, donde se observa que 44 jueces identificaron la diferencia entre ambas bebidas, mientras que el resto no lo hizo.

**Cuadro 16. Resultados de prueba triangular entre las bebidas fermentadas con dispositivos de diferente tiempo de almacenamiento.**

Aciertos	Errores
44	56

Dónde:

$\chi_1$ = No. De aciertos	= 46
n= No. De jueces	= 100
p= probabilidad de éxito en un ensayo	=0.33
1-p= Probabilidad de falla en un ensayo	=0.66
0.5 = factor de correlación	

$$\chi^2 = \frac{(|x_1 - np| - 0.5)^2}{np(1-p)}$$

$$\chi^2 = \frac{(|44 - (100 \times 0.33)| - 0.5)^2}{(100 \times 0.33)(1 - 0.33)}$$

$\chi^2_{exp} = 5.06$

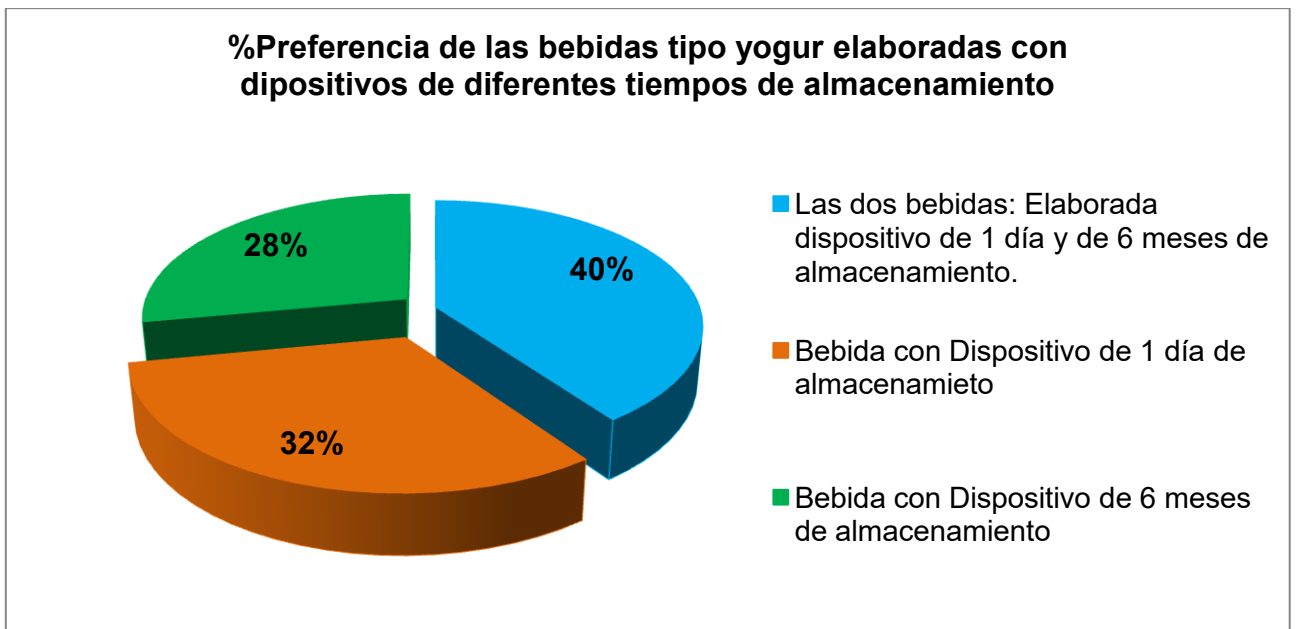
Valor de  $\chi^2$  teórica  $\alpha$  1% = 6.63

$\chi^2$ experimental = 5.06 < $\chi^2$ teórica = 6.63
<b>∴ No hay diferencia significativa</b>

El análisis se hizo mediante  $\chi^2$ , en donde se observa que el valor experimental fue de 5.6 mientras que el valor teórico reportado en tablas para la distribución estadística con un nivel de significancia de 1% es de 6.63, este valor es mayor al experimental, lo que indica que no hay diferencia significativa entre las bebidas elaboradas con dispositivos con diferente tiempo de almacenamiento.

En la tesis “Dispositivo de bacterias lácticas inmovilizadas en un soporte de celulosa para la producción de una bebida tipo yogur” (De la Cruz, 2013), en donde el dispositivo solo contiene *L. lactis ssp. lactis*, para la vida de anaquel en donde se hizo la misma prueba para la comparación de las bebidas, se documentó que si hay diferencia significativa entre ambas muestras, sin embargo, esto lo atribuyeron a una deficiente homogeneización de las bebidas, lo que pudo alterar la consistencia y dulzor de ésta.

Para el dispositivo elaborado con la mezcla de bacterias, se pidió a los jueces que seleccionaran su preferencia hacía las bebidas tipo yogur evaluadas. En la figura 22 se observan los valores obtenidos para esta prueba, en donde el 40% de los jueces prefirió ambas muestras esto pudo deberse que no percibieron diferencia significativa entre ambas bebidas, además no hay una diferencia notoria en la cantidad de jueces que seleccionaron en específico alguna de los dos bebidas tipo yogur, obteniendo 32% para la bebida elaborada con el dispositivo de 1 día y 28% para la bebida elaborada con el dispositivo de 6 meses de almacenamiento.



**Figura 22. Resultados de la prueba de Preferencia entre las bebidas tipo yogur elaboradas con dispositivos mezcla *Lb. acidophilus/L. lactis ssp. lactis* con diferentes tiempos de almacenamiento.**

Para el dispositivo elaborado con *Lb. acidophilus* y *L. lactis ssp. lactis*, se observa en general tanto en los resultados de pH y acidez, como en la prueba sensorial, no hay diferencia significativa entre las bebidas elaboradas con dispositivos con diferentes tiempos de almacenamiento. Por tanto, este dispositivo tiene una vida de anaquel de por lo menos 6 meses, debido a que la inmovilización de células permite una mejora significativa de su estabilidad, durante el periodo de almacenamiento 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), además las células inmovilizadas pueden suplementarse con nutrimentos co-inmovilizados y pueden sobrevivir largos periodos de tiempo conservando su actividad fisiológica (Stormo y Crawford, 1992). El dispositivo al sumergirse en leche, las bacterias vuelven disponer de agua por lo que recuperan su capacidad de crecimiento (Tortora et al., 2007) además obtienen los nutrimentos de la leche para su desarrollo, ocasionando la fermentación de la leche y por lo tanto la producción de ácido láctico, reduciendo el pH a niveles deseables para una bebida tipo yogur independientemente del tiempo de almacenamiento.

## 6. CONCLUSIONES

---

- ▶ El dispositivo elaborado mediante la inmovilización de *Lb. acidophilus* y *L. lactis ssp. lactis* en un soporte de celulosa cuenta con una concentración de  $1 \times 10^8$  UFC/dispositivo.
- ▶ El dispositivo *Lb. acidophilus/L. lactis ssp. lactis* funciona adecuadamente en leche pasteurizada, UHT y en polvo, obteniendo a las 24 horas de incubación una bebida fermentada con características de pH, acidez y textura similares a los de un yogur, incluso a temperatura ambiente, demostrando que las bacterias inmovilizadas se encuentran vivas y metabólicamente activas. Además las bebidas obtenidas fueron sensorialmente agradables para los consumidores. Sin embargo la bebida elaborada en leche UHT fue la más favorecida tanto en las características fisicoquímicas como en las sensoriales.
- ▶ La bebida elaborada con el dispositivo mezcla *Lb. acidophilus/ L. lactis ssp. lactis* posee mejores características de pH, acidez y viscosidad en comparación con una bebida elaborada solo con *L. lactis ssp. lactis*. Así mismo los consumidores encontraron diferencia significativa entre ambas bebidas, obteniendo una mayor preferencia la bebida elaborada solo con *L. lactis ssp. lactis*. Sin embargo, la bebida elaborada con el dispositivo mezcla *Lb. acidophilus/ L. lactis ssp. lactis* tiene mayores beneficios sobre la salud del consumidor debido al probiótico, esta característica se podría anteponer ante la preferencia del consumidor.

- ▶ Se encontró que el dispositivo con *Lb. acidophilus* y *L. lactis ssp. lactis*, almacenado a 4°C tiene una vida de anaquel de 6 meses, a este tiempo las bacterias se encuentran vivas y metabólicamente activas por lo que no afecta las características de pH, acidez y viscosidad del producto final, así mismo los consumidores no encontraron diferencia significativa entre una bebida elaborada con un dispositivo de 1 día de almacenamiento y una de 6 meses.
- ▶ El dispositivo elaborado con *Lb. acidophilus* y *L. lactis ssp. lactis* inmovilizado en un soporte de celulosa es una alternativa a la elaboración de leches fermentadas, con este dispositivo cualquier persona podría elaborar el producto, ya que al aplicarlo en leche se obtiene una bebida tipo yogur y de esta manera se garantiza que las bacterias lácticas se encuentran vivas y metabólicamente activas por lo que son capaces de ejercer sus efectos benéficos sobre la salud del consumidor.



## 7. BIBLIOGRAFÍA.

---

- Amiot, J., 1991. *Ciencia y Tecnología de la leche: Principios y Aplicaciones*. ACRIBA Zaragoza España. Pp. 20-37
- Angelova, M.B., Pashova, S.B., Slokoska, K.S., 2000. *Comparison of antioxidant enzyme biosynthesis by free and immobilized Aspergillus niger cells*. *Enzyme Microbiology Technology*. 26: 544–549.
- Astiasaran, I. Martínez, J.A., 2000. *Alimentos, composición y propiedades. Leche y Derivados*. Editorial Mc Hill. Pp. 69-72.
- Ávila, S., 2010. *Producción de Leche con Ganado bovino 2ª Ed.* Manual Moderno. Ciudad de México. Pp. 142-155.
- Badui, S., 2006. Leche. En: Badui, S. *Química de los alimentos, 4ª Ed.*, Ciudad de México, Pearson Educación, S.A. de C.V. Capitulo 12: 603-625
- Belitz, H.D., 2004. *Química de Alimentos*. 3ª Ed. ACRIBIA. Zaragoza España. Pp. 547-563
- Bizani, D., Motta, A., Morrissy, A., Terra, R., Souto, A. & Brandelli, A., 2005. *Antibacterial activity of cerein 8A, a bacteriocin-like peptide produced by Bacillus cereus*, *Intern. Microbiol.* 8:125-131.
- Chibata, I., 1978. *Immobilized enzymes: research and development*. Tokyo: Ed. Kodansha. 5:88-90.
- Cintas, L. M., Casaus, M.P., Herranz, C., Nes, I. F. & Hernandez, P. E., 2001. *Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria*. *F. Scn, Tech. Inter.*, 74, 281-305.

- Coconnier M.H., Bernet M.F., Kerneis S., Chauviere G., Fourniat J. y Servin A.L., 1993. *Inhibition of adhesion of enteroinvasive pathogens to human intestinal Caco-2 cell by Lactobacillus acidophilus strain LB decreases bacterial invasion*. FEMS Microbiology Letters. 110: 299-306.
- Cohen, Y., 2001. *Biofiltration - the treatment of fluids by microorganisms immobilized into the filter bedding material: a review*. Bioresource Technology. 77: 257-274.
- Collado M.C., Meriluoto J. y Salminen S., 2007. *Role of commercial probiotic strains against human pathogen adhesion to intestinal mucus*. Letters in Applied Microbiology. 45: 454-460.
- Cotter, P. D., Hill, C. & Ross, R. P., 2005. *Bacteriocins: developing innate immunity for food*, Nat. Rev. Microbiol., 3, 777-788.
- Couto, S., Toca, J., 2006. *Industrial and biotechnological application of laccases: A review*. Biotechnology advances, 24: 500-513.
- Daeschel, M.A., 1989. *Antimicrobial substances from lactic acid bacteria for use as food preservatives*. Food Technol., 43: 164-167.
- De la Cruz, D.A., 2013. *Dispositivo de Bacterias Lácticas Inmovilizadas en un Soporte de Células para la Producción de una Bebida Tipo Yogur*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. UNAM
- Duran-Páramo, E., et al., 2000. *Appl. Biochem. Biotechnol.* Instituto Politécnico Nacional. Departamento de Bioproceso. 84-86.

- Early, R., 1998. *Tecnología de los Productos Lácteos*. ACRIBIA Zaragoza, España. Pp. 127-151.
- FAO/OMS. 2001. *Probióticos en los alimentos Propiedades saludables y nutricionales y directrices para la evaluación 85. Consulta de Expertos FAO/OMS sobre Evaluación de las Propiedades Saludables y Nutricionales de Probióticos en los Alimentos, incluidas de la Leche en Polvo con Bacterias Vivas del Ácido Láctico*.
- Felley C.P., Corthesy-Theulaz I., Rivero J.L., Sipponene P., Kaufmann B.P., Wiesel P.H., Brassart D., Pfeifer A., Blum A.L., y Michetti P., 2001. *Favorable effect of acidified milk (LC-1) on Helicobacter gastritis in man*. European Journal of Gastroenterology and Hepatology. 13(1):25-29.
- Fennema. O., 2010. *Química de los Alimentos*, 3ª Ed., ACRIBA Zaragoza España. Capítulo 14: 101-129.
- García, M., Quintero, R. López M., 2004. *Biología Alimentaria*. Productos Lácteos, Editorial Limusa S.A. de C. V. Grupo Noriega Editores. México. Pp. 163-174.
- Garzón-Jiménez, C., y Barragán-Huerta, B.E., 2008. *Inmovilización Microbiana: Técnicas y usos en el Tratamiento de Residuos Tóxicos*. Revista Sistemas Ambientales, Vol. 2 Universidad Javeriana, Bogotá Colombia. Pp. 23-29.
- Gasque, R., 2008. *Enciclopedia Bovina*, Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Capítulo 11 Pp. 417-425.

- Gentry, T.J., Josephson, K.L., y Pepper, I.L., 2004. *Functional establishment of introduced chlorobenzoate degraders following bioaugmentation with newly activated soil*. Biodegradation. Pp.15-67.
- Goldhaber, S., 1982. “*Tecnología para la producción y conservación de algunos microorganismos de interés láctológico*” Tesis maestría. Universidad Iberoamericana.
- Isolauri E., Siitas Y., Kankaanpää P., Arvilommi H., Salminen S., 2001. *Probiotics: effects on immunity*. American Journal of Clinical Nutrition. 58-6.
- Karel, S., Libicki, S., Robertson, C. (1985). *The immobilization of whole cells engineering principles*. Chemical Engineering Science. 40, 1321–1354.
- Keating P. y Gaona H., 1999. *Introducción a la Lactología*, 2ª Ed. Limusa. Ciudad de México. Pp. 115-153.
- Lazarova, V., Manem, J., 1995. *Biofilm characterization and activity analysis in water and wastewater treatment*. Water Research. 29(10): 2227-2245.
- Leveau, J.Y., 2000. *Microbiología Industrial*. ACRIBIA. Zaragoza España. Pp. 167-311.
- Lindgren, S.E. y Dobrogosz, W.J., 1990. “*Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations*”. FEMS Microbiol. Rev., 87: 149-164.
- Maldonado, R. y Llanças, L., 2007. *Efecto de la incorporación de nisina sobre la supervivencia del Staphylococcus aureus en queso de mano*, Rev. Sociedad Venezolana de microbiología. Pp. 147- 163.

- Mandigan M., Martinko J., Parker J., 2004. *Biología de los Microorganismos*. 10ª Ed. Pearson Prentice Hall. Madrid. España. Pp. 138-158
- Metchnikoff, I., 1907. *Lactic acid as inhibiting intestinal putrefaction*. En: Heinemann, W. *The prolongation of life: Optimistic studies*. Butterworth-Heinemann, London. 161-183.
- Morales-García, Y., Duque, E., et al., 2001. *Bacterias Preservadas, una Fuente Importante de Recursos Biotecnológicos*. *BioTecnología*, Vol. 14. No. 2
- Najafpour, R.G., 2007. *Biochemical Engineering and Biotechnology*. Elsevier, Holanda. Pp. 284-289.
- Navarro, J., Durand, G., 1977. *Modification of yeast metabolism by immobilization on to porous glass*. *Journal of Applied Microbiology*. 4:243–254.
- Nazar, J., 2007. *Biofilms bacterianos*. *Revista de otorrinolaringología*. Santiago de Chile 67:61-72.
- NORMA Oficial Mexicana NOM-155-SCFI-2012, Leche-Denominaciones, especificaciones fisicoquímicas, información comercial y métodos de prueba.
- Papagianni, M., Ribosomally., 2003. *Synthesized peptides and antimicrobial properties: Biosynthesis, structure, function, and applications*. *Biotechnol. Adv.*, 21, 465-499.
- Pedrero, D., Pangborn, M., 1989. *Evaluación Sensorial de los Alimentos. Métodos Analíticos*. Alhambra Mexicana. México. Pp. 123-147.

- Pelczar M. J., 1990. Microbiología. 2ª Mc Graw-Hill Edición. México. Pp. 105-110.
- Pérez, M., 2011. *Proceso de Industrialización de la Leche Fluida*. En: el libro Blanco de la leche y los productos lácteos. CANILEC, México, D.F. Capitulo 3. Pp. 44-51.
- Pérez-Gavilán, J., 1984. *Bioquímica y Microbiología de la leche*. Limusa. México, D.F. S.A. Pp. 15-120
- Pérez-Gavilan, J., Macedo L., Ortiz B., 2012. *Dispositivo de Bacterias Lácticas Inmovilizadas en un Soporte de Células 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.
- Polprasert, C., 1989. *Organic Waste Recycling*. Wiley, New York. Bioresource Technology. 77: 257-274
- Ray, B., 2010. *Fundamentos de Microbiología de los Alimentos*. 4ª Ed. McGraw-Hill Interamericana. Ciudad de México Pp. 70-129.
- Romero R. y Mestres, J., 2004. *Productos Lácteos. Tecnología*. Barcelona. Ediciones UPC, S.L. Pp. 117-138.
- Ruíz., J.A. y Ramírez, A.O., 2009. *Elaboración de Yogurt con probióticos (Bifidobacterium spp. y Lactobacillus acidophilus) e inulina*. Universidad Central de Venezuela. Rev. Facultad de Agronomía. 26:223-242.

- Salminen S., Von Wright A., Morelli L., Marteau P., Brassart D., De Vos W.M, Fonden R., Saxelin M., Collins K., Mogensen G., Birkeland S.E. y Mattila-Sandholm T., 1998. *Demonstration of safety of probiotics- a review*. International Journal of Food Microbiology. 44 (1-2): 93-106.
- Sangronis, E., Garcia, J., 2007. *Efecto de la adición de nisina en los parámetros físicos, químicos y sensoriales del queso "telita"*. An. Venez. de Nutrición., 20 (1),12-16.
- Simova, E., Beshkova, D., Najdenski, H., Frengova, G., Simov Z., Tsvetkova, I., 2006. *Antimicrobialproducing lactic acid bacteria isolated from traditional Bulgarian milk products:Inhibitory properties and in situ bacteriocinogenic activity*, In: Proceedings of the IUFOST, 13th World Congress Food Sci Technol "Food is life", 17-21.
- Stormo KE y Crawford RL, 1992. *Preparation of encapsulated microbial cell for environmental applications*. Applied and Environmental Microbiology 58: 727-730.
- Tamime, A. Y., Robinson, R.K., 1991. *Yogur. Ciencia y Tecnología*. ACRIBIA Zaragoza España. Pp. 223-249.
- Tórtora, G., Funke, R., Case, C., 2007. *Introducción a la microbiología*, 9ª Edición. Editorial Panamericana. Buenos Aires. Pp. 89-95
- Varnam A., 1995. *Leches y Productos Lácteos: Tecnología, química y microbiología*. ACRIBIA. Zaragoza España. Pp. 365-39.
- Veisseyre, R., 1972. *Lactología Técnica: composición, recogida, tratamiento y transformación de la leche*. 2ª Ed. ACRIBIA. Zaragoza, España. Pp. 217-219.

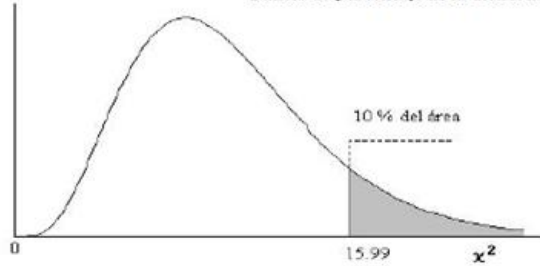
- Villegas, A., Hernández, N., y Hernández, M., 2012. *Evaluación de la Calidad Fisicoquímica y Sensorial de una Leche Probiótica Fermentada con Lactobacillus acidophilus*. Universidad de Chapingo. Ingeniería Agrícola y Biosistemas. 4(2): 69-75.
- Walstra, P., Geurts, T., Noomen, A., et al., 2001. *Ciencia de la Leche y Tecnología de los Productos Lácteos*. ACRIBIA. Zaragoza España. Pp. 151-543.
- Zhang, Y., Ma, Y., Yang, F. Zhang, Ch, 2009. *Continuous acetone-butanol-ethanol production by corn stalk immobilized cells*. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology 36, 1117-1121.
- Disponible en:  
<http://eleconomista.com.mx/industrias/2014/07/02/mexicanos-consumen-mas-leche-que-resto-latinoamericanos>  
[Último acceso el 12 de enero de 2016)



# 8. ANEXO

## TABLA DISTRIBUCIÓN $\chi^2$

Puntos de porcentaie de la distribución  $\chi^2$



Ejemplo:

Para  $\phi = 10$  grados de libertad

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

$\frac{\pi}{\phi}$	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	$\frac{\pi}{\phi}$
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
$Z_{\alpha}$	-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	$Z_{\alpha}$

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

**Tabla. Diferencia de sumatoria ordinal absoluta crítica de “todos los tratamientos” Comparación al nivel de significancia del 1%**

<i>Jueces</i>	<i>Número de muestras</i>									
	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

*Continúa*

TABLA *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

*Fuente:* Newell G.J., MacFarlane J. D., Expanded tables for multiple comparison procedures in the analysis of ranked data. *J. Food Sci.* 52(6) 1721-1725, 1987.