

300 627
20
24



UNIVERSIDAD LA SALLE

ESCUELA DE QUIMICA
INCORPORADA A LA U.N.A.M.

ELABORACION DE UNA BEBIDA LACTEA
FERMENTADA TIPO YAKULT, EMPLEANDO SUERO
DULCE DESMINERALIZADO

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A

ALMA ROSA RODRIGUEZ BLANCO

DIRECTOR DE TESIS: O.F.B. MARIANO LLERA FANJUL



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.

Al :

Q.F.B. Mariano Llera Fanjul.

Con sincero
agradecimiento por la
dirección de este
trabajo.

RECONOCIMIENTO.

Expreso mi profundo agradecimiento al Laboratorio del Departamento de Graduados e Investigación en Alimentos de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del I.P.N. por la supervisión, ayuda y facilidades que me fueron brindadas para la realización del presente trabajo; así mismo también agradezco a todas aquellas personas que de una forma u otra contribuyeron a la realización del mismo.

Al :

M. en C. Humberto Hernández Sánchez.

Sinceramente y con mi
mayor afecto por sus
orientaciones en la
elaboración de este
trabajo.

I N D I C E :

CAPITULO I: OBJETIVOS.

- OBJETIVO.1
- OBJETIVOS PARTICULARES.1

CAPITULO II: ANTECEDENTES.

2.1 LACTOSUERO.

- 2.1.1 Concepto. Tipos de suero3
- 2.1.2 Composición3
- 2.1.3 Procesamiento del suero.7
- 2.1.4 Utilización del suero en alimentos
de consumo Humano.9

2.2 IMPORTANCIA DE GENERO LACTOBACILLUS EN LOS PRODUCTOS LACTEOS CULTIVADOS.

- 2.2.1 Cambios en los constituyentes de la
leche por los Lactobacillus.14
- 2.2.2 Producción de biomoléculas.15
- 2.2.3 Otras funciones.16

2.3 YAKULT.

- 2.3.1 Concepto.19
- 2.3.2 Composición.19
- 2.3.3 Características del producto20
- 2.3.4 Importancia del Lactobacillus casei
(cepa Shirota) en el Yakult20

2.3.5	Funciones de la cepa Yakult después de llegar al intestino	20
2.3.6	Características de la cepa Yakult.....	22
2.3.7	Proteólisis por <u>L.casei</u>	24
2.3.8	Proceso de elaboración del Yakult.....	24
2.4	JUSTIFICACION.	28
 CAPITULO III: MATERIAL, MATERIA PRIMA, REACTIVOS Y EQUIPO.		
3.1	MATERIAL.	29
3.2	MATERIA PRIMA.	29
3.3	REACTIVOS.	30
3.4	EQUIPO.	31
 CAPITULO IV: METODOLOGIA.		
4.1	ANALISIS QUIMICO Y MICROBIOLOGICO.	
4.1.1	Análisis químico	34
4.1.2	Análisis microbiológico.	37
4.2	CARACTERIZACION DEL YAKULT (PRODUCTO COMERCIAL).	37
4.3	AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DEL <u>L.casei</u> A PARTIR DEL PRODUCTO COMERCIAL. CONSERVACION DE LA CEPA.	
4.3.1	Aislamiento del microorganismo	37
4.3.2	Caracterización de la cepa Yakult.....	38
4.3.3	Conservación de la cepa.	40

4.4	PREPARACION DEL INOCULO.	
4.4.1	Estandarización del caldo-inóculo.....	43
4.4.2	Preparación del inóculo de suero.....	44
4.5	FERMENTACION.	
4.5.1	Análisis bromatológico de materia prima.44
4.5.2	Preparación de mezclas.45
4.5.3	Fermentación.45
4.6	ADICION DE JARABE, SABOR Y COLOR.	
4.6.1	Adición de jarabe y sabor.45.
4.6.2	Adición de color.47
4.7	SELECCION DE MEZCLAS.48
4.8	CAPACIDAD AMORTIGUADORA DE pH.48
4.9	ESTUDIO CINETICO.49
4.10	CARACTERIZACION DEL PRODUCTO OBTENIDO.....	49
4.11	DETERMINACION DE LA VIDA DE ANAQUEL49

CAPITULO V: RESULTADOS Y DISCUSION.

5.1	CARACTERIZACION DEL YAKULT50
5.2	AISLAMIENTO, IDENTIFICACION BIOQUIMICA Y CONSERVACION DE LA CEPA YAKULT.54

5.3	PREPARACION DEL INOCULO.	
5.3.1	Estandarización del caldo-inóculo.....	60
5.3.2	Preparación del inóculo de suero.....	64
5.4	FERMENTACION.66
5.5	ADICION DE JARABE, SABOR Y COLOR.72
5.6	SELECCION DE MEZCLAS.74
5.7	CAPACIDAD AMORTIGUADORA DE pH.76
5.8	ESTUDIO CINETICO.79
5.9	CARACTERIZACION DEL PRODUCTO OBTENIDO.....	87
5.10	VIDA DE ANAQUEL DEL PRODUCTO.89
CAPITULO VI:	CONCLUSIONES92
CAPITULO VII:	BIBLIOGRAFIA95
ANEXOS.	102

INDICE DE CUADROS:

I	Composición del suero dulce y suero ácido.	4
II	Composición mineral mayor del suero dulce y suero ácido.	6
III	Composición mineral traza del suero dulce y suero ácido.	6
IV	Composición del Yakult.	19
V	Propiedades bioquímicas del <u>L.casei</u>	23
VI	Adición de jarabe y sabor.	46
VII	Análisis bromatológico del Yakult comercial	50
VIII	Análisis microbiológico del Yakult.	52
IX	Morfología colonial del <u>L.casei</u> en agar MRS.	55
X	Crecimiento del <u>L.casei</u> en caldo MRS.	55
XI	Caracterización de la cepa Yakult.	57
XII	Estandarización turbidimétrica con cuenta de <u>L.casei</u>	60
XIII	Valores de pH y acidez de las transferencias del inóculo en suero y suero + extracto de levadura.	64
XIV	Comparación del inóculo de suero y suero + E.L.	65
XV	Composición comparativa en base seca de leche descremada y suero entero.	66
XVI	Análisis bromatológico del suero dulce desmineralizado y leche descremada.	68
XVII	Mezclas de suero desmineralizado y leche descremada.	68
XVIII	Fermentación de las mezclas de suero desmineralizado y leche descremada.	70
XIX	Sabor, color y sedimento de las mezclas fermentadas.	71
XX	Formulación de adición de jarabe y mezcla saborizante.	73

XXI	Adición de colorante.73
XXII	Evaluación sensorial de las mezclas.75
XXIII	Composición del Yakult de suero-leche.87
XXIV	Análisis microbiológico del Yakult de suero-leche89

INDICE DE FIGURAS:

1	Proceso de elaboración del Yakult.25
2	Liofilización de la cepa Yakult.41
3	Espectro de absorción: caldo MRS.61
4	Estandarización de inóculo.62
5	Comparación del contenido proteico y mineral de la leche descremada, suero entero y suero desmineralizado.67
6	Curva estándar para determinación de lactosa.69
7	Capacidad amortiguadora de pH.78
8	Estudio cinético: Disminución de pH.80
9	Estudio cinético: Producción de acidez.82
10	Estudio cinético: Consumo de lactosa.84
11	Estudio cinético: Crecimiento de <u>L.casei</u>86
12	Vida de anaquel del Yakult de suero desmineralizado y leche descremada.91

CAPITULO I.

OBJETIVOS.

OBJETIVO :

La Elaboración de una Bebida Láctea Fermentada tipo "Yakult" cuya función es ayudar a la salud intestinal, empleando Suero Dulce Desmineralizado en polvo, que sustituye total o parcialmente a la Leche descremada en polvo en su formulación.

OBJETIVOS

PARTICULARES :

Caracterización química y microbiológica del Yakult comercial.

Aislamiento e identificación del Lactobacillus casei a partir del producto comercial, utilizando un medio selectivo.

Preparación de mezclas de SUERO DULCE DESMINERALIZADO-LECHE DESCREMADA (S.D.D-L.D) que permitan obtener el porcentaje de proteína establecido en el producto comercial.

Elaboración del Yakult a partir de las mezclas de S.D.D.-L.D (fermentación, adición de sabor, jarabe y color).

Selección de las mezclas de S.D.D.-L.D. fermentadas, mediante un método de evaluación sensorial.

Determinación de la capacidad amortiguadora de pH en la mezcla seleccionada.

**Determinación del estudio cinético de la mezcla
seleccionada.**

**Comparación química y microbiológica del producto
obtenido con el producto comercial.**

CAPITULO II.

ANTECEDENTES.

2.1 LACTOSUERO :

2.1.1 Concepto. Tipos de Suero.

El Lactosuero es el líquido sobrante después de remover la caseína y la grasa de la leche [29] y es el subproducto [41] de la fabricación del queso o caseína. Este constituye alrededor de 85-90 % del volumen de leche utilizada en la manufactura del queso y retiene aproximadamente 55 % de los nutrientes contenidos en la leche [32]. Contiene la mayoría de las sales, lactosa, proteínas hidrosolubles [7] y vitaminas de la leche [29]. Existen dos tipos:

a) Suero dulce: Se obtiene por coagulación de la leche con cuajo [19], tiene un pH de 5.9-6.3 [29].

b) Suero ácido: Se obtiene mediante la precipitación de la caseína de la leche por ácido [60]. pH 4.4-4.6. Contiene más ác. láctico, Ca, P y lactosa. Tiene menor aceptación del consumidor por su sabor ácido y salado [29].

2.1.2 Composición.

Esta es variable, debido a que los procedimientos de elaboración del queso y la composición de la leche, no son constantes [38].

Una composición promedio del suero dulce y suero ácido se muestra en el Cuadro I.

Cuadro I. Composición del suero dulce y suero ácido.

COMPONENTE	SUERO DULCE		SUERO ACIDO	
	FLUIDO	POLVO	FLUIDO	POLVO
	----- (%) -----			
Sólidos totales	6.35	96.5	6.5	96.0
Humedad	93.7	3.5	93.5	4.0
Grasa	0.5	0.8	0.04	0.6
Proteína total	0.8	13.1	0.75	12.5
Lactosa	4.85	75.0	4.90	67.4
Cenizas	0.5	7.3	0.8	11.8
Ac láctico	0.05	0.2	0.4	4.2
	----- (ug/100g) -----			
B-vitaminas(51)				
ác. fólico		1.1-9.0		
Biotina		4.0		
Niacina		40-120		
ác. pantoténico		-----		
B ₆		21		
B ₁₂		0.5-2.2		

Fuente: Kosikowski, F.V. (1979). [29].

a) Proteínas: De las proteínas que contiene la leche, son las de mayor valor biológico las que quedan disueltas en el suero [41]. El suero contiene β -lactoglobulina, λ -lactalbúmina, albúmina sérica, seroglobulinas y otras proteínas desnaturalizadas por el calor. El suero dulce contiene también macropéptidos de PM cercano a 8000 que se desdoblán de la k-caseína como paso inicial de la coagulación [58].

β -lactoglobulina: Principal proteína del suero, rica en lisina, leucina, ác. glutámico y ác. aspártico. Contiene cisteína, que interviene en el desarrollo del sabor a cocido de la leche hervida debido a sus grupos sulfhidrilo libres [1][17][58].

Á-lactalbúmina: Proteína rica en triptofano, es la única en la que el ác. aspártico excede al ácido glutámico [1]. Tiene función enzimática debido a que, es un componente coordinado de la lactasa-sintetasa, que cataliza el último paso en la síntesis de la lactosa [58].

álbúmina sérica: Idéntica a la albúmina del suero sanguíneo, con iguales propiedades inmunológicas, contiene un alto número de cisteínas y grupos sulfhidrilo libres [1].

seroglobulinas: Similares a las gamma-globulinas del suero sanguíneo con propiedades de anticuerpos.

fracción proteasa-peptona: La principal es la rama de fosfoglucoproteínas, además de nucleótidos, urea, ács. nucléicos, y aminoácidos libres.[1][17][58]

b) Lactosa: Constituye alrededor del 70% de los sólidos totales del suero [12]. Es un disacárido medianamente dulce, que junto con las sales disueltas da el sabor a la leche descremada.

Es un azúcar reductor compuesto de una molécula de galactosa y una de glucosa unidas por un enlace β -1,4-glicosídico [58]. Sus reacciones dependen de este enlace, del grupo reductor de la glucosa, de los grupos hidroxilo libres y de los enlaces carbono-carbono [57]. Reacciones complejas de la lactosa con la caseína y otras sustancias nitrogenadas, o reacciones de oscurecimiento, contribuyen al color y sabor de los productos lácteos [58].

La enzima lactasa, que se encuentra en bacterias, levaduras y animales, hidroliza la lactosa en glucosa y galactosa. Esta hidrólisis se acompaña de la formación de oligosacáridos, la cual es proporcional a la concentración de lactosa [57]

c) Minerales: Su composición mineral se presenta en el Cuadro II y Cuadro III.

Cuadro II. Composición mineral mayor del suero dulce y suero ácido.

SUERO	Ca	Mg	Na	K	P
	(mg/100g)				
Dulce Fluido	36.5	6.5	45.5	123	43
Dulce Seco	470.0	100.0	750.0	2342	580
Acido Fluido	92.8	9.0	39.8	153	58
Acido Seco	1450.0	143.0	758.0	2340	464

Fuente: Wong, N.P. et al. (1978). [60].

Cuadro III. Composición mineral traza del suero dulce y suero ácido.

SUERO	Zn	Fe	Cu	Mn
	(ug/100g)			
Dulce Fluido	11	89	3.5	0.6
Dulce Seco	193	340	66.0	9.0
Acido Fluido	234	106	6.8	2.8
Acido Seco	4300	550	50.0	15.0

Fuente: Wong, N.P. et al. (1978). [60].

El suero ácido es más rico en Ca y fosfatos que el suero dulce, debido a la acción solvente de los iones hidrógeno sobre el complejo fosfocaseinato de calcio. En cambio, durante la coagulación con cuajo en la manufactura del queso, el Ca es precipitado como un complejo de caseinato de calcio así que en su mayoría, éste ión se encuentra en la cuajada [60].

El contenido de Zn es 20 veces menor en el suero dulce. 88% del Zn está enlazado débilmente al complejo de caseinato y 12% está en solución. Nada está asociado a las proteínas del suero. Durante la precipitación ácida el zinc enlazado cambia a su forma libre [60].

El contenido de Mg es 50% mayor en el suero ácido. El magnesio se encuentra en estado coloidal en menor grado que el calcio, en consecuencia menos Mg está disponible para cambiar a su forma soluble a pH bajo [60].

Los elementos traza, son componentes de las proteínas y las enzimas: Fe, forma parte de la lactoferrina.

Como subproducto, la industria lo elimina:

- Utilizándolo como alimento para ganado, enriquecimiento de suelos, ó
- Descargándolo en agua residuales, alcantarillas y ríos. Rara vez con un tratamiento previo.

Por su alto contenido en materia orgánica, su poder contaminante es muy elevado. La Demanda Biológica de Oxígeno del suero es de 40-50 000 mg O₂/l afectando gravemente la fauna fluvial al ser vertido directamente a los ríos (un río no contaminado tiene 10 mg O₂/l y el descenso a 4 mg/lt supone la muerte de toda su fauna pisícola) [41].

El creciente interés sobre la contaminación y control ambiental ha resultado en presión para los fabricantes de queso para detener la descarga del suero en ríos y aguas residuales, por lo que la industria debe explotar todas las posibilidades de utilizar los sólidos del suero por ejemplo: como fuente de alimentos

2.1.3 Procesamiento del suero.

El suero se somete para su utilización a los siguientes procesos:

a) Concentración: Generalmente se elimina casi la totalidad del agua del suero para obtener el extracto seco por medio de una pre-evaporación en un efecto múltiple, seguida de un secado final

por atomización evitando la desnaturalización de parte de la proteína [41].

b) Fraccionamiento: Se consigue por:

- Procesos de Membrana. Se utilizan membranas selectivas, permeables al paso de un (o un grupo de) componente(s). La fuerza impulsora es la presión [42]. Se opera a presiones mayores que la presión osmótica del material que se procesa [19]. Existen diferentes procesos de membrana:

Ultrafiltración.- Se utilizan presiones de 3-5 atms. Retiene sustancias de peso molecular (PM) elevado y permite el paso de las de PM medio o bajo. Se obtienen un concentrado de proteínas y un permeado (disolución que atraviesa la membrana) constituido por una disolución de lactosa, sales minerales y ácido láctico prácticamente exento de proteínas [42]. Se obtienen concentrados que contienen 50-80 % de proteína de suero [19].

Osmosis inversa.- Requiere 30-50 atm y de membranas más cerradas que retienen todos los constituyentes, menos las sales solubles [19]. Se obtiene un concentrado de proteínas y lactosa que guardan la misma relación que en el suero bruto; obteniéndose sueros desmineralizados. Puede utilizarse como complemento de la ultrafiltración [42].

Electrodialisis.- Se utilizan membranas selectivas a la carga eléctrica de los componentes, las membranas catiónicas permiten el paso de iones cargados positivamente rechazando los iones negativos. La separación se logra alternando membranas aniónicas y catiónicas en un baño con electrodos en los extremos y haciendo pasar una corriente continua que hace migrar

los iones, creando cámaras de concentración y de desmineralización. Se obtiene un concentrado de sales y un producto desmineralizado parcialmente [42].

- Hidrólisis de la lactosa. Produce monosacáridos más solubles y dulces: glucosa y galactosa. Hay dos tipos:

Hidrólisis enzimática.- Se consigue añadiendo directamente la enzima (de mayor costo) o inmovilizando ésta en un soporte sólido insoluble. Influyen las concentraciones de lactosa, galactosa y minerales, pH y temperatura. La hidrólisis enzimática es apropiada para suero bruto y permeados de ultrafiltración. Se recomienda previa desmineralización [12]. Se obtiene un producto más dulce, útil en productos a niveles más altos sin causar cristalización de la lactosa y sensación arenosa en el producto [19].

Hidrólisis ácida.- Por medio de resinas de intercambio catiónico en forma de hidrógeno, que cataliza la hidrólisis a temperaturas elevadas [12]. La hidrólisis ácida es adecuada sólo para soluciones libres de proteína.

2.1.4 Utilización del suero en alimentos de consumo humano.

Algunos alimentos suplementados con suero dulce o sus derivados son:

- Helados.-El suero parcialmente hidrolizado y desmineralizado sustituye parcialmente (hasta 25% sin alterar su sabor, textura o punto de fusión) a la leche descremada en polvo [29][43].

- Pan y Productos. Horneados.- El producto final tiene aroma y sabor pronunciados, valor nutritivo mayor y mejor calidad de almacenamiento [34].

- Leche fortificada.- El suero desmineralizado en polvo se mezcla con la leche y se secan dando un producto alto en calidad de proteínas séricas y bajo en sodio. [29].

- Bebidas refrescantes.- El proceso general involucra la mezcla del suero con jugos de frutas (naranja, piña, limón, uva) principalmente. También pueden adicionarse azúcar, minerales, vitaminas o estabilizadores. Finalmente el producto es tratado térmicamente. El alimento envasado puede tener una vida de anaquel de 1-6 meses. El suero puede requerir uno o más tratamientos antes de ser mezclado, como: deodorización; ultrafiltración (para eliminar las proteínas u obtener concentrados proteicos); hidrólisis de lactosa (que da un producto más dulce) y acidificación por fermentación con un cultivo iniciador. Ejemplos de estas bebidas son: O-way, Freshi, Lactofruit, Nature's Wonder', y otros [23][32][33].

- Bebidas nutritivas proteicas.- basadas en la mezcla de frijol de soya procesada por calor, con suero dulce parcialmente hidrolizado, y sabores de piña o fresa [29][33].

Ejemplos de alimentos que pueden suplementarse con suero ácido o sus derivados son:

- Quesos.- El suero se usa como coagulante ácido para elaborar quesos precipitados por calor y ácido a partir de leche entera; da una cuajada suave [29].

- Productos horneados.- Como en la elaboración de pan, bisques, y galletas que adquieren un color superficial dorado durante el horneado. [29]

- Bebidas de frutas.- El suero ácido puede suplementar jugos de frutas como naranja, piña y otros cítricos, sin embargo, su desarrollo no ha sido completo a causa de sabores desagradables: de suero y salado del producto, usando suero desmineralizado se sobrelleva esta dificultad. Las bebidas de suero dulce y sabores cítricos tienen preferencia a las de suero ácido [23][29][32].

Para alimentos fermentados a partir de suero o sus fracciones, su uso como sustrato está limitado a aquellas fermentaciones que emplean microorganismos capaces de utilizar la lactosa, principal fuente de carbono en el suero. También contiene varias sales y es deficiente en compuestos de nitrógeno inorgánico que deben añadirse [38].

- Proteína unicelular, alcohol, vinagre.- La proteína unicelular de levadura se obtiene por la fermentación de concentrados de suero deproteinizado y desmineralizado, por las levaduras Kluyveromyces fragilis, Torula cremoris, y Candida pseudotropicalis [12]. Como subproducto se obtiene alcohol etílico, que industrialmente se utiliza para obtener vinagre [29] o mezclado con gasolina [12].

- Acido láctico.- Se usa Lactobacillus bulgaricus sólo o combinado con Mycoderma sp. o se usa L.acidophilus y una variedad de L.delbrueckii para fermentar la lactosa. Se obtiene como lactato de calcio que se convierte en ácido libre. [38]

- Bebidas Fermentadas.-

Bebidas alcohólicas :

Tipo Vino.- El proceso de elaboración se basa en la fermentación de concentrados de suero o permeados de suero ácido altos en lactosa (18-25 %) o adicionados de sacarosa, por medio de una levadura que fermente

lactosa. Un buen sustrato se obtiene deproteinizando y desmineralizando el suero. El producto final tiene 10 % alcohol v/v o más, es amarillo claro, de sabor agradable, y de bouquet libre de sabor a "suero" y buen cuerpo [23][29][30][33].

Tipo cerveza.- El suero contiene materiales similares a los coloides del mosto de cerveza, tiene la capacidad de ligar ácido carbónico y alto contenido de sales. Algunos constituyentes desarrollan sabores tipo caramelo después de calentamiento prolongado bajo presión, que son similares al sabor y olor de la malta curada. La lactosa no afecta el sabor [23][38].

Conteniendo proteínas.- Una bebida tipo Kumiss se prepara mezclando leche, suero y lactosa, se inocula con levadura de Kumiss, L.acidophilus y L.bulgaricus. La fermentación láctica y alcohólica da un producto espumoso conteniendo ácido láctico, alcohol y CO₂ [23][38].

Bebidas No alcohólicas:

Algunas bebidas como Rivella, Big M, Parag y otros se basan en la fermentación de suero pasteurizado, deproteinado y filtrado previamente, con bacterias ácido lácticas con o sin levaduras, al que se le adiciona jarabe y fruta o sabores y se pasteurizan nuevamente [23][33][34][36][38].

Prokhlada se elabora de suero de "tvorog" deproteinado y pasteurizado, fermentado con un cultivo de L.bulgaricus, L.acidophilus y Kluyveromyces lactis, se adiciona jarabe de azúcar o de fruta y azúcar quemada (para dar un color café-dorado) [18][32].

Bebida tipo Kefir: Una mezcla de 67 % suero dulce desmineralizado y 33 % leche entera, pasteurizada, se inocula con un cultivo de bacterias lácticas y levaduras tipo Kefir dando buen sabor y viscosidad, con sedimentación mínima que se corrige añadiendo goma vegetal como estabilizante. Se debe utilizar suero desmineralizado para no aumentar el contenido de sales minerales. El costo del suero es mucho menor que el de la leche [22].

Una mezcla de suero ácido y suero dulce de pH 4.8 - 5.5 a la que se adiciona un hidrocoloide (0.3 - 1 %), se trata moderadamente con calor, se enfría e inocula con 2.5 % de un cultivo de Bifidobacterium (10^9 ufc/ml). Se puede adicionar sabor [34].

Parag.- Es una bebida de una mezcla de suero clarificado y concentrado, con suero de manteca, pasteurizada, que se inocula con L.acidophilus y Streptococcus thermophilus, se clarifica y se le adicionan jarabe de azúcar, sabor de piña, colorante y finalmente se repasteuriza [34]

Productos fermentados tipo yogurth.- Se obtienen empleando mezclas de leche entera en polvo, suero desmineralizado, gelatina sin sabor y cultivos lácticos activos de L.bulgaricus, L.acidophilus y S.thermophilus. Una mezcla 50-50% es aceptable adicionando color y sabor artificial [14][23].

2.2 IMPORTANCIA DEL GENERO LACTOBACILLUS EN LOS PRODUCTOS LACTEOS CULTIVADOS:

2.2.1 Cambios en los constituyentes de la leche por los Lactobacillus.

Durante el crecimiento de los Lactobacilos en la leche se modifican sus constituyentes:

a) Proteínas: Estas son hidrolizadas por enzimas específicas en péptidos y aminoácidos (a.a) libres. El metabolismo de estos a.a produce NH_3 , ácidos orgánicos y una pequeña cantidad de ácidos grasos, que contribuyen al balance completo del aroma y sabor del producto. Las proteínas parcialmente degradadas son digeridas y absorbidas más fácilmente [2].

El género Lactobacillus muestra mayor actividad proteolítica que el género Streptococcus. Y aún, el L.acidophilus no es tan activo como L.casei o L.bulgaricus en la formación de a.a libres. Además L.casei produce niveles de nitrógeno no proteico (NNP) relativamente altos [2].

b) Grasa: La actividad lipolítica se debe a enzimas intracelulares que liberan ácidos grasos, mejorando la digestibilidad de la grasa de leche comparada con otras grasas animales. Los lactobacilos exhiben menor actividad lipolítica que los estreptococos [2].

c) Lactosa: Es convertida en ácido láctico por la enzima Lactato Deshidrogenasa (LDH) de las bacterias ácido lácticas [2], éste contribuye al sabor de los productos lácteos fermentados y a su preservación puesto que al acidificarlos previene el desarrollo de bacterias putrefactivas y patógenas [2][61].

molecular (PM), de pK bajo y son elaborados sólo cuando estos microorganismos (m.o) se desarrollan en leche [28][51]. Cada cepa varía en su capacidad para producirlos y las condiciones ambientales (pH, T) influyen en la cantidad producida. Muestran actividad inhibitoria contra Salmonella, Shigella, Staphylococcus, Proteus, Klebsiella, Pseudomonas, E.coli enteropatógena, algunos bacilos y Vibrio [27][50].

b) B-Vitaminas: El contenido de vitaminas B de los productos lácteos fermentados depende del contenido de vit.B de la leche empleada en su elaboración (varía con la estación, estado de lactación, etc.), de los procedimientos del proceso, tipo de inóculo microbiano, condiciones de incubación (medio, temperatura, etc.) [51]. Los productos cultivados contienen niveles más altos de vitaminas B que los productos acidificados directamente [28][51].

c) Enzimas: Las células microbianas contienen lactasa que puede ayudar a hidrolizar la lactosa en el intestino delgado [28]. Los productos lácteos fermentados (como el yogurt) contienen grandes cantidades de m.o, que contribuyen con proteína unicelular y enzimas constituyentes al perfil nutricional del producto [51].

d) Acidos Orgánicos: Acidos Láctico y Acético principalmente Reducen el pH del medio, lo cual potencia la actividad de estos ácidos (las formas no disociadas son más destructivas) [50] e inhibe el crecimiento de patógenos y m.o. que causan descomposición [51][54]. Los ácidos orgánicos son más tóxicos (preservativos) que los ácidos inorgánicos a pH bajo [27].

2.2.3 Otras funciones.

a) Reducción del potencial Red-ox: Los ácidos volátiles son especialmente antimicrobianos en potenciales red-ox bajos, los

cuales son mantenidos el intestino con ayuda de las bacterias ácido lácticas [50].

b) Acciones antagonistas: Estas se asocian con los productos finales mayores: Ácidos láctico y acético y H_2O_2 [27]. El H_2O_2 inhibe varios m.o. como Salmonella y Staphylococcus. La actividad antagónica de estos compuestos disminuye por infección del cultivo con bacteriófagos [53].

c) Disociación de sales biliares: Los ácidos biliares no conjugados (o libres) son más inhibitorios que las formas conjugadas. Cuando las bacterias intestinales deconjugan las sales biliares, las bacterias susceptibles son inhibidas [54]. Así los lactobacilos liberan ácidos biliares libres en el tracto intestinal, influyendo en el balance de las bacterias presentes [50].

d) Supresión de compuestos carcinógenos: La producción de compuestos carcinogénicos y/o co-carcinogénicos depende de la dieta, que a su vez afecta la composición de la flora intestinal, de los sustratos utilizables por ésta, y de secreciones intestinales [54]. Las bacterias intestinales enzimáticamente pueden hidrolizar los glucurónidos del hígado (mecanismo de detoxificación) o reducir compuestos azo y nitrogenados aromáticos produciendo compuestos carcinógenos. En Humanos la actividad β -glucuronidasa debida a algunas especies de lactobacilos y a la microflora es muy pequeña. La ingesta de L.acidophilus reduce los niveles de las enzimas azo y nitroreductasas en animales con dieta alta en carnes, también degrada nitrosaminas [50].

En países con menor incidencia de cáncer el número de bacteroides en muestras fecales era menor y el de enterococos y lactobacilos mayor [54].

En ratones con células tumorales de ascitis, alimentados con yogurt se vió una disminución del número total de células tumorales y del contenido de DNA del fluido ascítico [28]. Alimentando con leche, lactosa o ácido láctico no hay efecto inhibitorio. Con yogurt concentrado, la inhibición aumenta. El uso de las fracciones sólida y sobrenadante por separado, reveló que la propiedad inhibitoria está asociada a la fracción sólida. El L.bulgaricus parece ser más inhibitorio que S.thermophilus [51].

e) Efecto hipocolesterolémico: Una ingesta alta de lactobacilos en leche fermentada proporciona factores que deterioran la síntesis de colesterol, disminuyendo su contenido en el suero sanguíneo [54]. Estos son: ácido hidroximetilglutárico y ácido orótico, que probablemente inhiben una enzima limitante de la velocidad en la biosíntesis del colesterol [2]. Estos factores se encuentran en leche no fermentada en menor concentración [51].

f) Competencia con otras bacterias: Los lactobacilos compiten por los nutrimentos y ocupan sitios como colonizadores del intestino haciéndolos inaccesibles para otros m.o. [50], ayudando a mantener o restaurar un balance adecuado entre los habitantes normales del tracto intestinal [54].

Por las propiedades anteriores, los productos lácteos fermentados conteniendo cultivos de lactobacilos se usan exitosamente en el tratamiento de gastroenteritis, problemas de diarrea, infecciones de la piel y estomatitis herpética y aftosa [51].

2.3 YAKULT :

2.3.1 Concepto.

"Yakult" es una bebida láctea fermentada originaria del Japón [55], elaborada de leche descremada fermentada conteniendo un cultivo vivo de la bacteria ácido láctica, Lactobacillus casei (cepa Shirota), la cual puede sobrevivir en el tracto intestinal humano [61]; junto con agentes edulcorantes tales como azúcar, glucosa o jarabe de almidón. El sabor final se consigue añadiendo jugos de frutas o esencias de sabor (limón y naranja) [35].

Recientemente se han utilizado jugos de vegetales, tales como: tomate, zanahoria, apio y otros, para dar un producto de sabor con una imagen totalmente diferente [55].

2.3.2 Composición.

El Cuadro IV hace una comparación entre el Yakult y la leche cruda [55].

Cuadro IV. Composición del Yakult.

CONSTITUYENTES (%)	PRODUCTO	
	YAKULT	LECHE CRUDA
GRASA	1.1	3.6
PROTEINA	1.2	3.2
LACTOSA	1.1	4.5
OTROS AZUCARES	14.1	
CENIZAS	0.34	0.7
MICROORGANISMO	<u>Lactobacillus casei</u>	

Fuente: Yakult Honsha Co. [61].

2.3.3 Características del producto.

El Yakult es una bebida ácida, tiene un sabor de fondo agradable y es apetitoso [54]. Tiene una consistencia delgada y para compensar el aspecto de grumos de leche cuajada, se añade sacarosa, mejorando sus propiedades organolépticas [55].

Su color ligeramente café, indica que la base leche/azúcar ha sido sujeta a una alta temperatura (pasteurización [61]), antes de enfriar y fermentar [55]. Este color resulta de la reacción entre los aminoácidos de la leche descremada y el azúcar, llamada reacción de Maillard o reacción amino-carbonilo [61].

2.3.4 Importancia del L.casei (cepa Shirota) en el Yakult.

El producto contiene la cepa Shirota o Yakult, que contribuye al sabor de la bebida y mantiene la salud intestinal previniendo enfermedades [61]. Esta cepa parece comportarse en el intestino humano de manera similar a L.acidophilus y Bifidobacterium. El Yakult se considera producto terapéutico debido al alto número de L.casei [55], más de 100 millones de células se mantienen activas en un mililitro de Yakult [61].

Estas bacterias ácido lácticas son termófilas [55], resistentes a los jugos gástricos y jugos biliares, los cuales son bactericidas de muchos m.o. que invaden el tracto intestinal; por lo tanto llegan al intestino vivas [61].

2.3.5 Funciones de la cepa Yakult después de llegar al intestino.

Para evaluar las funciones de la cepa Yakult se realizaron investigaciones básicas y clínicas que produjeron los siguientes resultados:

a) El suministro de la cepa Yakult mantiene o incrementa el nivel de bifidobacterias, otro miembro benéfico de las bacterias intestinales [61].

b) Algunas bacterias nocivas de la flora intestinal producen sustancias perjudiciales (indol, escatol, fenoles, p-cresol y NH_3) de las proteínas, a.a. o urea. Estas sustancias causantes de enfermedades se consideran como índices del estado de fermentación putrefactiva en el intestino. Después de un suministro constante, disminuyen los niveles de estas sustancias, lo que sugiere que la cepa Yakult suprime la fermentación putrefactiva en el intestino [61].

c) Se ha encontrado que la cepa Yakult y algunas bacterias del intestino absorben carcinógenos natos de los alimentos, como la amina heterocíclica Trp-p-2 y suprime la mutagenicidad por medio de algún mecanismo desconocido, diferente al enlazamiento [61].

d) Efecto antitumoral en Sarcoma 180 implantado en ratones. También estimula la actividad antitumorica en macrófagos [61].

e) Efecto protector en infecciones:

- Estimula resistencia a la infección por Pseudomonas aeruginosa.
- Protección contra infecciones de listeria sistémica. [61]

f) El consumo de grandes cantidades de Yakult aumentan el número de L.casei y disminuye el de E.coli en heces de humanos [35].

g) Efectos Clínicos: Su efecto no se restringe a síntomas derivados de males gastrointestinales, se extiende a aquellos de otras enfermedades, tales como:

- Eficiencia curativa de 80-100 % :

Enfermedades del estómago.

Enfermedades gastrointestinales.

Enfermedades intestinales.
Enfermedad SMON.
Enfermedades circulatorias.
Constipación.
Diarrea.

- Eficiencia curativa menor a 80 % :

Enfermedades pulmonares.
Enfermedades pancreáticas.
Poliomielitis.
Enfermedades hepáticas.

Una flora intestinal saludable está bien balanceada con bacterias benéficas y nocivas. La diarrea es causada por la alteración de ésta, debido a factores como: antibióticos, intoxicación alimentaria, mala digestión, embriaguez, alergias, infecciones bacterianas (tifoidea, cólera, shigelosis o helmintiasis) [61].

La lactasa de la cepa Yakult hidroliza la lactosa de la leche descremada en galactosa y glucosa, por lo que el Yakult se recomienda para personas con intolerancia a la lactosa [61].

Las funciones de la cepa Yakult en el intestino son:

- a) Normalizar el balance de la flora intestinal [61].
- b) Estimular el movimiento intestinal produciendo ácidos orgánicos como el ác. láctico [61].
- c) Reducir la producción de gas intestinal [54].
- d) Actividad antagónica contra patógenos intestinales [54].
- e) Reducir las sustancias nocivas producidas por bacterias putrefactivas [61].

No produce dextrana, causante mayor de la caries dental [61]

2.3.6 Características de la cepa Yakult.

El L. casei cepa Shirota, es una bacteria homofermentativa que produce principalmente ác. láctico durante la fermentación

del azúcar [59]. El cultivo produce además constituyentes menores como ác. cítrico, succínico, málico, acético, acetaldehído, diacetilo y acetona [35].

a) Morfología: Bacteria Gram positiva, con forma de bastones rectos aislados o dispuestos en cadena, 0.6-0.7 um de ancho y 1.5-5.0 um de longitud. No forma endosporas, flagelos o cápsula. [61].

b) Crecimiento: Anaerobio facultativo. Crece a temperaturas entre 15-41°C y a pH superior a 3.5. Optimamente crece a 37°C y a pH 6.8. El ác. láctico formado consta de 65 % de L(+) y 35 % de forma DL [61].

c) Propiedades bioquímicas: Las propiedades bioquímicas del L.casei cepa Shirota se muestran en el Cuadro V.

Cuadro V. Propiedades bioquímicas del L.casei.

Coagulación de leche	+	Formación de NH ₃	-		
Producción de catalasa	-	formación de pigmento	-		
Licuefacción de gelatina	-	Prueba del indol	-		
Reducción de nitrato	-	Utilización de citrato	-		
Producción de H ₂ S	-	Prueba del rojo de metilo	-		
Utilización de urea	-	Reacción Voges-Proskauer	-		
Fermentación de Carbohidratos:					
Fructosa	+	Sorbitol	+	Manosa	+
Inositol	-	Glucosa	+	Manitol	+
Galactosa	+	Xilosa	-	Arabinosa	-
Sacarosa	+	Lactosa	+	Maltosa	+
Rafinosa	-	Salicina	+	Dulcitol	-
Trehalosa	+	Melibiosa	-	Celobiosa	+
Esculina	+	Melezitosa	+	Ramnosa	-
Inulina	-				

Fuente: Winslow, et al. 1974. [59].
Yakult Honsha, Co. [61].

2.3.7 Proteólisis por L.casei [37].

Las proteinasas aisladas de lisados celulares de L.casei muestran actividad máxima a 15-38°C y a un pH cerca de la neutralidad. Se atribuye máxima actividad a pH 7 a una peptidasa y una actividad máxima en el rango de pH 5.5-6.5 a una proteinasa.

Las desaminasas estereoespecíficas en L.casei causan desaminación de serina a pH 5.4 y 8.1, y asparagina y treonina a pH 8.1. Dos desaminasas parecen estar involucradas. Así la desaminación de DL serina procede igualmente a 52°C y pH 7, y a 46°C y pH 4.6.

2.3.8 Proceso de elaboración del Yakult.

Los detalles de su manufactura no están disponibles fácilmente fuera del Japón [55]. En la Fig.1 se muestra un diagrama [61] de su elaboración.

Se menciona [56] que el medio del tanque de fermentación tiene pH 6.5, conteniendo principalmente leche descremada (15%) y extracto de Chlorella (0.4%). La acidez titulable alcanza un máximo dentro de los 3 o 4 días a 37°C, con un pH de cerca de 3.6.

Sin embargo el desarrollo de la fermentación puede verse afectado por la presencia de bacteriófagos, como el PL-1, que ataca únicamente al L.casei cepa Shirota. Este fago es bastante sensible a la radiación ultravioleta o al calentamiento (a 60°C, 5 min). El fago es inestable, diluido en agua deionizada o buffer de fosfatos. La adición de cationes divalentes como Mg⁺² o Mn⁺² (10⁻³M) a los buffers, protegen al fago de la inactivación [56].

Este virus es inactivado abajo de pH 4 y arriba de pH 10. El rango en que el fago es estable, casi coincide con el del L.casei cepa Shirota. No hay crecimiento del fago a pH 7.6 aún después de 5 h de incubación. Todos los desinfectantes y antisépticos

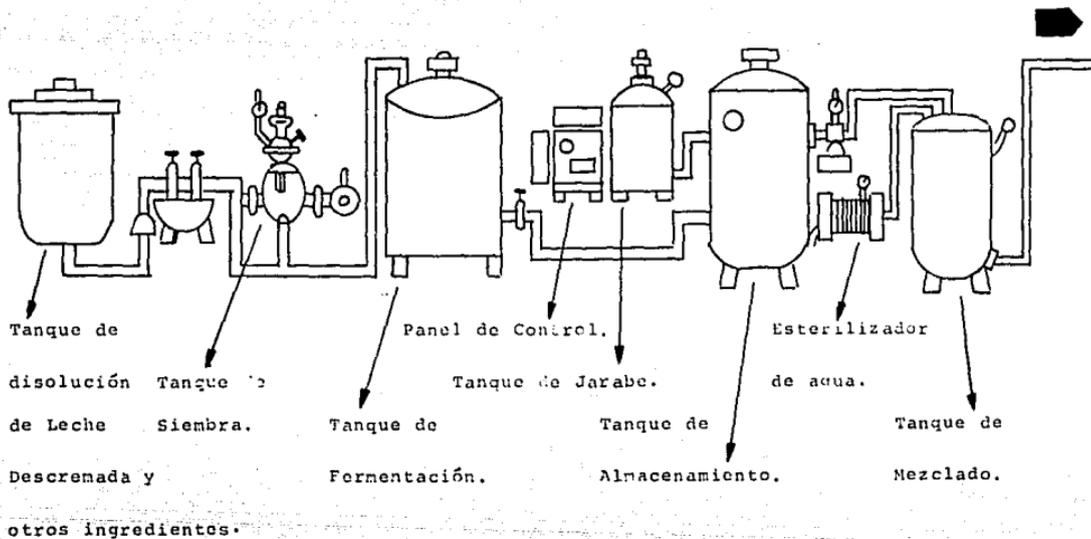


Fig.1. Proceso de elaboración del Yakult.

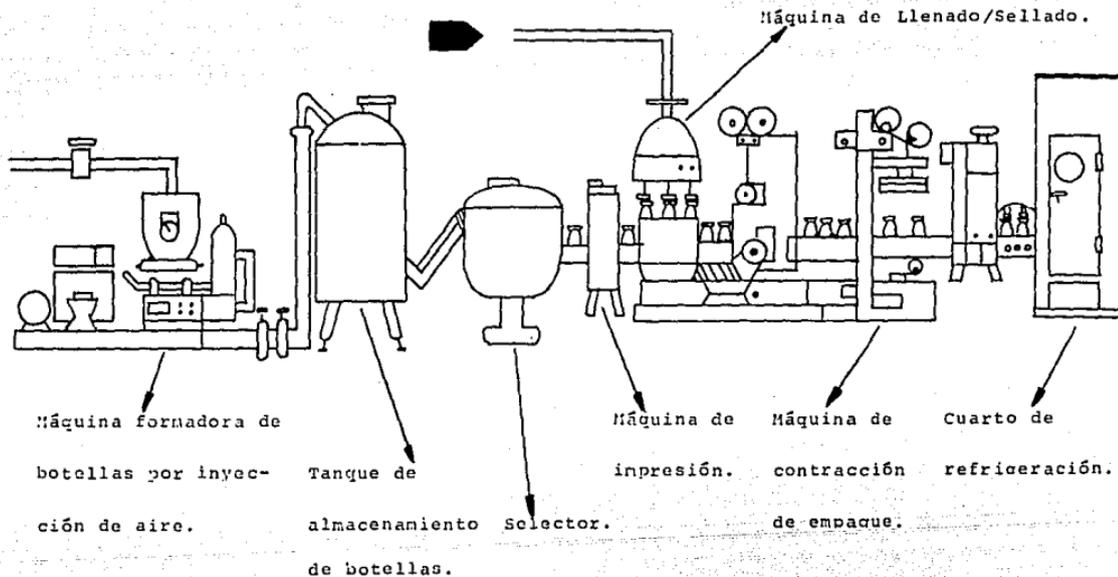


Fig.1. Proceso de elaboración del Yakult (continuación).

resultan letales para las células libres de fago a concentraciones que afectan el crecimiento bacteriano [56].

El crecimiento de las células fago-infectadas en ausencia de CaCl_2 añadido es el mismo que el control. Las concentraciones de ión calcio suficientes para que el cultivo consiga su lisis en el tiempo más corto fue cerca de 5 mM. El ión manganeso acelera el crecimiento de las células huésped [56].

Los fagos PL-1 y J1 requieren más iones calcio que las concentraciones necesarias para el crecimiento de la bacteria huésped. Por lo tanto, la eliminación del ión calcio con quelantes específicos puede contrarrestar la propagación del fago [56].

El crecimiento del *L.casei* puede ser estimulado por un péptido producido por *S.lactis*. Este es un péptido pequeño de 4500 daltons, dializable y parcialmente inactivado por calor. Da pruebas negativas para ácidos nucleicos, fósforo, glucosamina y carbohidratos. Se encontraron 16 a.a en hidrolizados del péptido, conteniendo serina, prolina, glicina, alanina, leucina y ác. glutámico en grandes cantidades; no contiene a.a. azufrados. El péptido por sí mismo es necesario y no sus a.a. componentes. Precipita con etanol [9].

2.4.0 JUSTIFICACION:

Debido a los grandes volúmenes de lactosuero que se obtienen en la manufactura del queso y a su elevado poder contaminante, es importante encontrar más formas de utilizar el lactosuero o sus fracciones con el fin de reducir la contaminación ambiental que provoca su descarga.

El lactosuero puede emplearse en la formulación de diferentes productos alimenticios de consumo humano como bebidas nutritivas, productos fermentados y otros ya mencionados.

La utilización del lactosuero para producir bebidas lácteas fermentadas requiere de procesamientos previos como concentración, desmineralización e hidrólisis, aún con ésto, el empleo del Lactosuero en sus diferentes presentaciones es más económico que la leche entera o descremada en polvo. Además, el aporte nutricional de parte de sus proteínas es superior.

Es importante el desarrollo de productos lácteos fermentados que ofrecen diferentes beneficios al Hombre como, la conservación de éstos, la concentración de los principales nutrientes de la leche y la producción de micronutrientes indispensables en la dieta.

El consumo de bebidas lácteas fermentadas como el Yakult, promueven principalmente la salud intestinal debido a la ingesta de un alto número de bacterias ácido-lácticas capaces de llegar al intestino, manteniendo así un balance adecuado en la flora bacteriana intestinal, además de los beneficios debidos a sus productos metabólicos.

C A P I T U L O I I I .

MATERIAL, MATERIA PRIMA, REACTIVOS Y EQUIPO.

3.1 MATERIAL:

- Material de vidrio para Laboratorio.
- Butirómetros de Gerber-Sichler para leche descremada (Tapones automáticos y ajustadores de tapones) con escala de 0-1%, precisión 0.1.
- Filtros de membrana : Millipore. Tipo GS, tamaño de poro 0.22 μ m.
- Placas de Hemaglutinación Nunclon, Delta.
- Ampolletas de Liofilización Labconco.
- Viales de Vidrio de 5 ml de capacidad.

3.2 MATERIA PRIMA :

- Leche Descremada en polvo, de marca Sveltes, Nestlé S.A.
- Suero Dulce Desmineralizado de Leche en polvo, proporcionado por Wyeth Laboratories Inc.
- Sacarosa comercial.
- Color Caramelo, Colomex DF, de Arancia Comercial S.A de C.V. cuyas especificaciones son:

Colorante natural obtenido del tratamiento térmico controlado de carbohidratos de grado alimenticio.

Es un colorante líquido, de tono negro-rojizo, de doble fuerza tintórea. Tiene como propiedades:

Alta solubilidad en agua y mezclas de alcohol-agua.

Compatibilidad con taninos.

Compatibilidad con coloides naturales en presencia de ácido.

Aplicaciones.- Bebidas y Refrescos (de cola, manzana, uva, jugos y café); panificación (pan, pasteles,

galletas); postres (helados, gelatina); confitería (dulces, extendedores de cocoa, mieles); Aderezos (salsas, proteínas vegetales texturizadas e hidrolizadas); condimentos. [48]

- Esencias artificiales líquidas:

Sabor Limón: Marca Deiman S.A de C.V. Aditivo alimentario. Contiene Agua, 3.4% aceite esencial de limón, alcohol etílico, saborizantes artificiales. Dosis recomendada por el proveedor: 10 ml por Kg o l de producto.

Sabor Naranja: Marca Deiman S.A de C.V. Aditivo alimentario. Contiene Agua, 1.4% aceite esencial de naranja, alcohol etílico, saborizantes artificiales. Dosis recomendada: 10 ml por Kg o l de producto.

3.3 REACTIVOS :

Todos los reactivos utilizados son de grado analítico, a partir de los cuales se prepararon las soluciones requeridas para cada determinación.

Para el análisis microbiológico, los medios a utilizar son:

- Agar para Métodos Estándard (Bioxon de México, S.A de C.V.).
- Agar de Bilis y Rojo violeta (Bioxon de México, S.A de C.V.).
- Agar de Papa y Dextrosa (Bioxon de México S.A de C.V.).
- Agar bacteriológico (Bioxon de México S.A de C.V.).

- Agar de Man, Rogosa y Sharpe (MRS).

Preparación [8][45]:

Peptona de Caseína	10.00	g/l.
Extracto de Carne	10.00	g/l.
Extracto de Levadura	5.00	g/l.
Glucosa	50.00	g/l.
Tween 80	1.00	ml/l.
Fosfato dibásico de potasio	2.00	g/l.
Acetato de Sodio Trihidratado	5.00	g/l.
Citrato de Triamonio	2.00	g/l.
Sulfato de Magnesio heptahidratado	0.20	g/l.
Sulfato de Manganeso tetrahidratado	0.05	g/l.
Agar bacteriológico	20.00	g/l.

Disolver los ingredientes con calentamiento suave, ajustar el pH a 6.5 y esterilizar a 15psig, 15 min. Para agar añadir 20 g, antes de ajustar el pH.

3.4 EQUIPO:

- Balanza analítica: Sartorius-Werke. GMBH Göttingen. Modelo 2432. 200 gr máximo.
- Balanza Granataria: Brainweigh B. Ohaus Scale Corp. Modelo 1500 D. Intervalo 150/1500 g
- Cámara de Refrigeración: Incubator Hotpack. Hotpack Corporation. Modelo 317530. Intervalo de Temperatura : -20°C a -50°C. Intervalo de Humedad relativa: 10-50% y 40-100%.

- Centrífuga de Gerber: Centrífuga Original Gerber.M-80-A. Para 12 butirómetros, con freno eléctrico. Sin tacómetro. Número de revoluciones constante para la determinación de materia grasa según normas internacionales ISO.
- Centrífuga: Super speed Refrigerated centrifuge. Dupont Instruments. Sorvall RC5.
- Cuenta colonias: Craft. Modelo Hecho en México.
- Espectrofotómetro: Bausch & Lomb.Spectronic 20.Con intervalo de longitud de onda de 325-975 nm.
- Espectrofotómetro de Reflectancia: Agtron Magnuson Engineers, Inc. Modelo M-400-A.
- Estufa: Precision Scientific group. GCA Corporation. Modelo 19. Hasta 200 °C.
- Horno: Riossa. Modelo HS. Intervalo de temperatura de 25-300 °C.
- Incubadora: Lab-line Instruments, Inc. VIP CO². Incubator 417.
- Incubadora: New Brunswick Scientific Co., Inc. Ambiente y agitación controlada.
- Liofilizadora : Vir Tis, Co. Modelo 6205-4000.
- Microscopio: Leitz Wetzlar. Dialux 815676.
- Mufla: Lindberg. Tipo caja. Modelo 51848. Intervalo de temperatura de 100-1100 °C.

- Olla de Presión : Industrias Steele de México. Con manómetro graduado de 0-20 lb/Plg² de presión.
- Potenciómetro Digital : Corning. Modelo 125.
- Refractómetro: Erma Optical Works Ltd. Modelo 16171.
- Sistema Tecator Kjeltex: Tecator Ltd. Sistema de digestión 12, modelo 1009. Unidad de destilación, modelo 1002.

CAPITULO IV.

METODOLOGIA.

4.1 ANALISIS QUIMICO Y MICROBIOLOGICO

4.1.1 Análisis Químico.

a) Acidez, para el producto comercial.- por titulación con NaOH 0.1 N [46].

b) Azúcares Totales, por inversión de una solución prueba con ácido, seguida de neutralización y titulación por el método de Lane y Eynon [13] [47], para el Yakult.

c) Cenizas, por evaporación de la muestra a sequedad y calcinación de ésta en la mufla a no más de 550 °C hasta obtener cenizas libres de carbono según A.O.A.C. 16.035 [5], en el caso del producto comercial.

Para la leche descremada y el suero desmineralizado se determinaron por carbonización y calcinación de la muestra en la mufla según A.O.A.C. 16.178 [5].

d) Grasa, por el método de Gerber utilizando Butirómetros de Gerber-Sichler para leche descremada en el caso de muestras de Yakult. Y para la leche descremada y el suero, sobre una solución de la muestra en polvo [13] [46].

e) Lactosa : Para muestras de Yakult se determinó como Azúcares reductores, por reducción de Cobre según Lane y Eynon sobre una solución obtenida por clarificación con los reactivos de ferrocianuro de zinc de Carrez [13] [47].

Para leche descremada y suero desmineralizado se analizó por medio del método colorimétrico para carbohidratos totales por reacción de fenol [15], previa eliminación de las proteínas de la muestra según el método de Nickerson et al [40].

Estimación de Lactosa.

Preparación de reactivos:

Reactivo de acetato de Zinc-Acido fosfotúngstico: Disolver 25 g de acetato de zinc y 12.5 g de ácido fosfotúngstico en agua. Añadir 20 ml de ácido acético glacial y diluir hasta 100 ml. (ZAPT) [40].

Reactivo de fenol: Disolver 5 g de fenol grado reactivo en 100 ml de agua destilada. Tener cuidado con este reactivo ya que causa quemaduras en piel y ojos. No pipetear con la boca [15].

Acido sulfúrico concentrado grado reactivo [15].

Lactosa estándar: Disolver 100 mg de lactosa en 100 ml de una solución 0.15 % m/v de ácido benzoico, el cual se añade como conservador. Almacenar a 5°C. Esta solución es estable por varios meses. Diluir 1:10 en agua destilada antes de usar para dar una solución conteniendo 100 ug/ml. Preparar estándares de 10 a 100 ug/ml de la solución diluída [15].

Preparación de la muestra:[40]

- A 8 ml de la muestra problema añada 1 ml del reactivo ZAPT. Diluya a 10 ml, mezcle y después de 10 min, filtre (Whatman No.1).
- A 0.5 ml de filtrado añada 0.5 ml de NaOH 1N, diluir a 10 ml y filtrar (Whatman No.1).
- Diluir 5 ml del filtrado a 10 ml que son la muestra.
- Hacer diluciones de la muestra, las necesarias para que queden en el intervalo de la curva estándar.

Procedimiento:[15]

- Pipetear 1 ml de la muestra preparada, preparar un testigo reactivo con 1 ml de agua destilada y una corrida estándar de lactosa de 10-100 ug/ml.
- Añada 1 ml del reactivo de fenol, mezcle rápida y completamente.
- Añada 5 ml de H_2SO_4 concentrado, mezcle rápidamente y deje reposar 10 min. (Nota: la adición de H_2SO_4 a soluciones acuosas causa calentamiento y ocasionalmente ebullición. Esta solución causa severas quemaduras cuando tiene contacto con la piel y los ojos, se recomienda usar lentes de protección. No pipetear con la boca)
- Colocar los tubos en un baño de agua a 25 °C, 15 min.
- Leer absorbancia para cada tubo a 488 nm contra el testigo preparado.
 - Determinar la concentración de lactosa en la muestra de la curva estándar preparada por la gráfica de absorbancia de los estándares contra la concentración de lactosa.

f) pH, para el Yakult se determinó potenciométricamente siguiendo la técnica descrita en [46].

g) Proteína, para cualquier muestra se analizó determinando el contenido de Nitrógeno por el método de Kjeldahl utilizando el sistema Tecator Kjeltec y calculando el contenido proteico con el factor 6.38, empleado para productos lácteos [5][13] .

h) Sólidos Totales: Para el producto comercial, se determinó mediante evaporación parcial de la muestra en un baño

de vapor y posterior desecación en estufa durante 3 h a 98 °C según A.O.A.C. 16.032 [5].

La determinación de éstos en la leche descremada y el suero se obtuvo por desecación de la muestra a 102°C, 2 h hasta peso constante [13].

4.1.2 Análisis Microbiológico.

Este se realizó para el Yakult comercial únicamente.

- a) Cuenta de Bacterias Coliformes en agar Rojo-violeta-bilis, según A.P.H.A. [3].
- b) Cuenta de Hongos y Levaduras en Agar Papa-Dextrosa, según A.P.H.A. [3].
- c) Cuenta viable de Lactobacillus casei utilizando Agar de Man-Rogosa-Sharpe (MRS) [8].
- d) Cuenta de microorganismos Psicrófilos: A.P.H.A. [3].

4.2 CARACTERIZACION DEL YAKULT (PRODUCTO COMERCIAL):

Este consistió de un análisis químico y microbiológico del producto siguiendo las técnicas de los incisos 4.1.1 y 4.1.2

4.3 AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DEL Lactobacillus casei A PARTIR DEL PRODUCTO COMERCIAL. CONSERVACION DE LA CEPA.

4.3.1 Aislamiento del microorganismo.[52]

Del Yakult comercial se hicieron diluciones decimales hasta obtener una de 1:10 000, 1:100 000 y 1:1 000 000, las cuales se sembraron en Agar MRS (recomendado para el crecimiento de Lactobacillus [25] y bacterias ácido lácticas [8]). Las

condiciones de incubación fueron aerobias, a $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$, durante 48 horas.

Una vez que se obtuvieron colonias bien aisladas se observó:

- Morfología colonial.
- Morfología microscópica, utilizando la tinción de Gram.

De una colonia aislada, se tomó una asada que fue sembrada por estria cruzada en una placa de Agar MRS para corroborar pureza y se incubó en las mismas condiciones.

De estas colonias, se sembró una asada para inocular un tubo con caldo nutritivo MRS, incubado en las mismas condiciones; que se utilizó posteriormente para preparar el inóculo para la identificación del microorganismo.

4.3.2 Caracterización de la Cepa Yakult.

Se realizó por medio de métodos miniaturizados para la caracterización de un aislado bacteriano, que utilizan miniplacas o placas de hemaglutinación y minitubos de vidrio [24][25].

Para el examen de Lactobacilos se recomienda preparar el inóculo de cultivos activos en caldo nutritivo MRS. La incubación para todas estas pruebas se hace en condiciones aerobias, a 37°C [25].

a) Pruebas efectuadas en miniplacas:

Actividad Sacarolítica: Se determinó colocando asépticamente, una gota de una solución 0.1 M del carbohidrato, (la cual se ha esterilizado mediante filtración a través de membrana) o de agua estéril (para testigo) en los tubos de la miniplaca, seguida por 4 gotas de caldo basal inoculado (en la proporción de una

gota de cultivo por 5 ml de caldo basal) con un cultivo en fase logarítmica de crecimiento [24][25].

Composición del caldo basal:

Peptona de caseína	1.5 g
Extracto de levadura	0.6 g
Tween 80	0.1 ml
Solución salina*	0.5 ml
Rojo de clorofenol **	0.4 ml
Agua Destilada	80.0 ml
pH	6.6

* (11.5 g $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ y 2.8 g de $MnSO_4 \cdot H_2O$ en 100 ml de agua destilada)

** (Solución acuosa al 1 % m/v)

Esterilización del medio a 15 psig, 20 minutos.

Los cambios de coloración se observaron después de incubar 1, 2 y 7 días.

Otras pruebas: Se determinaron colocando una gota de una suspensión salina del organismo en fase logarítmica (3 gotas de cultivo por 10 ml de solución salina estéril) seguida por 4 gotas de una sustrato concentrado 1.25 X [24][25].

Composición de la Salina:

NaCl	9 g
Agua destilada	1 l.

Sustrato para determinar Hidrólisis de Esculina [25]:

Los ingredientes para 100 ml de caldo MRS, con la glucosa reemplazada por 0.2 g de Esculina. y 0.1 g de Citrato de amonio férrico, se disuelven en 80 ml

de agua destilada. El medio se reparte en volúmenes de 5 ml y se esteriliza a 15 psig, 15 min.

Los tubos inoculados de la miniplaca se examinan después de incubar por 2 y 7 días.

b) Pruebas efectuadas por el método usual: [25]

Utilización de Citrato: Los ingredientes para 100 ml de agar MRS con la glucosa sustituida por una cantidad igual de citrato de sodio y adición de 0.008 g de indicador de azul de bromotimol, se disuelven en 80 ml de agua destilada. El medio se reparte en volúmenes de 5 ml y se esteriliza a 15 psig, 15 min. Se inoculó por picadura y estría con una asada del cultivo activo y se incubó por 7 días. Un cambio de color registra la prueba como positiva.

Crecimiento a 15 y 45 °C: Se inocularon tubos con 10 ml de caldo MRS con una asada del cultivo en fase log, y se incubaron por 14 y 2 días respectivamente.

Coagulación de leche: Se inocularon tubos con 10 ml de leche descremada reconstituida al 10 % m/v, con una gota del cultivo activo. Los tubos se examinaron después de incubarlos 2 días.

4.3.3 Conservación de la cepa.

Se mantuvo de dos maneras:

a) Resiembra en Caldo MRS. [10]: Mantiene el microorganismo en forma activa y realizado en forma adecuada, sin contaminación del cultivo. La cepa se conservó en caldo MRS y se guardó bajo refrigeración. Aunque el cultivo puede sobrevivir 6 meses o más bajo refrigeración, se hicieron transferencias más frecuentes.

Para cada resiembra se inoculó 0.5 % v/v del caldo MRS de la resiembra anterior, se incubó a 35°C, 24 h y se refrigeró a una temperatura inferior a 4°C para preservar su actividad.

b) Liofilización [8][10][16][45]: Mantiene un cultivo de reserva. Para la conservación de la cepa por liofilización se siguió la secuencia mostrada en la Fig.2.

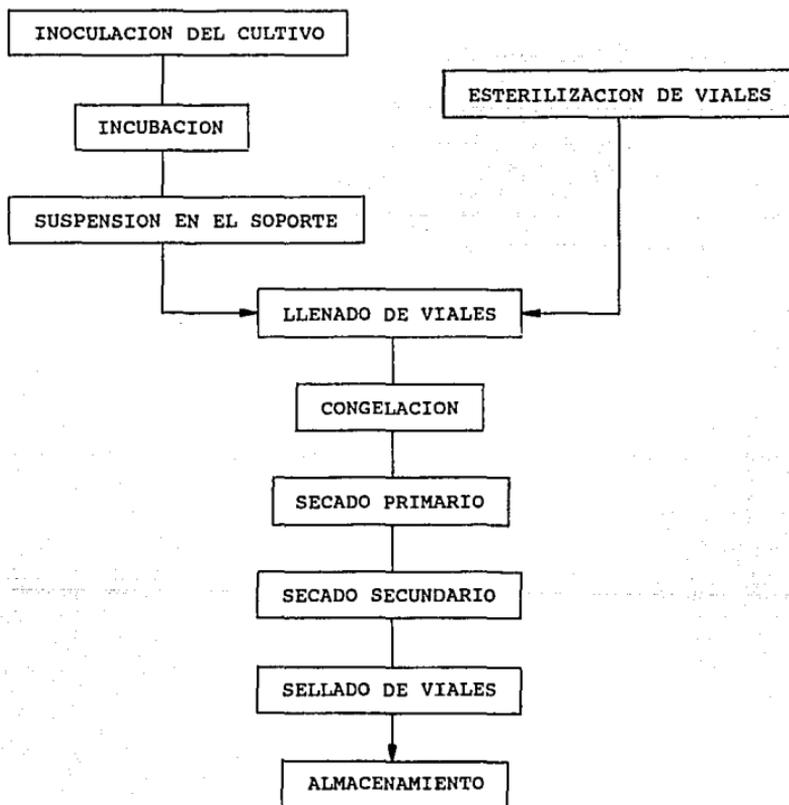


Fig.2. Liofilización de la cepa Yakult.

La inoculación del cultivo se hizo en agar inclinado MRS por asada y se incubó a 35°C, 48 h.

La suspensión del cultivo se efectuó en una pequeña cantidad (5 ml aproximadamente) de leche descremada estéril (como agente protector) reconstituida al 10 % añadida directamente al cultivo para que la concentración microbiana inicial fuera elevada.

En condiciones asépticas se tomaron muestras de 1 ml de esta suspensión y se pasaron a los viales esterilizados (a 15 psig, 15 min) depositando la muestra gota a gota para evitar que roce la pared o que se formen burbujas.

La etapa de congelación se efectuó por inmersión de los viales (con la muestra repartida a lo largo de las paredes de los mismos) en un baño frío formado por una mezcla criogénica de Acetona-Hielo seco que alcanza una temperatura de -20 a -70 °C de modo que el agua sublima al aplicar vacío secándose entonces la muestra.

Durante el secado primario y secundario se mantuvo una presión de 1 mm de Hg. El primer secado duró 5 h aproximadamente, y el secado secundario duró 17 horas hasta que la muestra se observó seca.

La desecación de la muestra terminó cuando la misma tuvo aspecto de polvo seco .

Las ampollitas fueron selladas y almacenadas a baja temperatura. Cuando se requiere, los cultivos son recuperados de las ampollitas por suspensión del liofilizado en una pequeña cantidad de medio de crecimiento y luego se incubaba.

4.4 PREPARACION DEL INOCULO:

4.4.1 Estandarización del Caldo-Inóculo.[10][52]

Del crecimiento obtenido en agar MRS se tomó una asada que sirvió para inocular el microorganismo, en un tubo con caldo nutritivo MRS. Este fue incubado a 35 °C, 2 días en condiciones aerobias.

El crecimiento obtenido en el caldo MRS se traspasó a frascos de centrifugación estériles para obtener un concentrado celular. Las condiciones de trabajo fueron las siguientes:

Tiempo de centrifugación	15	min
Fuerza Centrífuga Relativa	27 506	x g

Después se obtuvo un espectro de absorción del caldo MRS sin crecimiento, midiendo la cantidad de absorción conforme se hizo variar la longitud de onda del rayo incidente en la región visible del espectro (380 - 750 nm) y utilizando como solución de referencia el disolvente, es decir, agua destilada.

Se buscó una longitud de onda donde el caldo MRS tuvo una mínima absorbancia por sí, y por lo tanto una absorbancia máxima debida a la concentración celular.

Considerando que el medio no contiene otras partículas insolubles más que las células, se hicieron diluciones del concentrado celular con caldo MRS (como diluyente) y se obtuvo un intervalo de turbidez que diera determinaciones cuantitativas en el espectrofotómetro. Estas medidas turbidimétricas fueron estandarizadas con una cuenta en placa de L.casei en agar MRS.

En base a la absorbancia y a la cuenta en placa, se buscó una concentración celular de 10^9 ufc/ml.

4.4.2 Preparación del inóculo de Suero. [2][19][22][55].

Se preparó un volumen de Suero Dulce desmineralizado reconstituido al 10 % m/v con agua destilada estéril, que fue pasteurizado en un baño a 92°C durante 15 min agitando constantemente.

También se probó adicionar 0.5 % m/v de extracto de levadura al suero para enriquecerlo, según se recomienda en [55] para cepas difíciles de cultivar.

Se procedió luego a inocular dicho volumen con 0.5 % v/v del caldo MRS cultivado con una carga de 10^9 ufc/ml y se distribuyó por agitación. Este fue incubado a 35°C por 3 días.

Posteriormente se hicieron resiembras sucesivas del cultivo en suero (preparado de la forma anterior), inoculando con un 5 % v/v del pase precedente en la secuencia e incubando a 35°C, 2 días para aumentar la actividad del microorganismo.

Por cada resiembra se hizo una observación microscópica de preparaciones teñidas, para asegurar que el inóculo estuviera libre de contaminación antes de inocular el siguiente.

Antes de utilizar el inóculo para sembrar el medio de fermentación se efectuó una cuenta de L.casei en agar MRS, para asegurar una concentración celular de 10^8 ufc/ml.

4.5 FERMENTACION :

4.5.1 Análisis Bromatológico de Materia Prima (Leche Descremada y Suero Dulce Desmineralizado, ambos en polvo)

Este se realizó siguiendo las técnicas descritas en el inciso 4.1.1 para la leche descremada y el suero desmineralizado.

4.5.2 Preparación de mezclas.

Se hicieron mezclas de leche descremada y Suero Dulce Desmineralizado ambos en polvo, en donde el Suero contribuye con 0, 25, 50, 75 y 100 % del contenido proteico total determinado [22] en el Yakult comercial.

Todas las mezclas en polvo se reconstituyeron en agua destilada estéril (15 psig, 15 min) y se pasteurizaron en un baño a 92°C, agitando constantemente durante 15 min.

4.5.3 Fermentación.

Las mezclas enfriadas a 37°C, fueron inoculadas con 5 % v/v del cultivo activo de L.casei en suero y se incubaron a 37°C por 48 h. Se determinó el pH y la acidez final.

4.6 ADICION DE JARABE, SABOR Y COLOR:

4.6.1 Adición de Jarabe y Sabor.

Se procedió a determinar sensorialmente, la concentración de mezcla saborizante (tomando en cuenta la cantidad recomendada por el proveedor) y la concentración de jarabe de sacarosa [11].

a) Mezcla saborizante: Compuesta por una mezcla de esencias artificiales sabor naranja y limón, por lo que se determinó también la proporción de uno y otro respecto a la cantidad total de saborizante.

b) Jarabe de Sacarosa: 200-240 g de azúcar se disolvieron en 150 ml de agua y se calentó hasta disolución. Esta solución se esterilizó a 15 psig, 15 min, para obtener 71-73 °Bx.

El producto se dividió en porciones iguales de 100 ml, poniéndolo en moldes individuales. Se adicionó a un primer molde 1 % v/v de la mezcla saborizante y 5 % v/v del jarabe de sacarosa que se utilizó como referencia y en base a la degustación de la muestra se probaron adiciones superiores o menores de cada uno, además de variar la proporción de cada sabor en la mezcla saborizante; hasta que alguna de las muestras obtuviera la mejor aceptación de parte del juez.

Las adiciones de sabor y jarabe se hicieron con pipetas graduadas. Después de cada adición se homogenizó la muestra y se procedió a su degustación [11].

Las pruebas de adición de jarabe y saborizante efectuadas se presentan en el Cuadro VI.

Cuadro VI. Adición de jarabe y sabor.

PRUEBA	% V/V JARABE	% V/V · MEZCLA SABORIZANTE	% PROPORCION DE CADA SABOR
1	5.0	1.0	50% Sabor Naranja 50% Sabor Limón
2	10.0	1.0	50% Sabor Naranja 50% Sabor Limón
3	15.0	1.0	50% Sabor Naranja 50% Sabor Limón
4	10.0	1.0	70% Sabor Naranja 30% Sabor Limón
5	10.0	0.6	67% Sabor Naranja 33% Sabor Limón
6	10.0	0.4	75% Sabor Naranja 25% Sabor Limón
7	10.0	0.3	67% Sabor Naranja 33% Sabor Limón

4.6.2 Adición de Color.

a) Determinación del color:

La evaluación del color se hizo con ayuda de un espectrofotómetro de reflectancia que se maneja de la manera siguiente:

- Seleccionar el filtro de color deseado y dejar un tiempo de calentamiento de al menos 30 min. En este caso el filtro azul para productos lácteos.

- Colocar el disco de calibración 00, con la perilla de control de 0 ganancia al mínimo (accionar en sentido contrario a las manecillas del reloj) y ajustar la lectura.

- Colocar el disco de calibración 97 y ajustar con la perilla de estandarización hasta obtener la lectura de 97. Checar la calibración, repitiendo nuevamente los pasos anteriores.

- Colocar la muestra testigo y registrar las lecturas.

- Seleccionar las lecturas que correspondan a la muestra más clara y a la más oscura, y con estas 2 establecer los límites de control para volver a calibrar el aparato con los discos adecuados.

- Colocar la muestra problema y registrar las lecturas.

b) Adición de color: [11]

El colorante se diluyó tomando 1 ml de éste en 250 ml de agua destilada estéril.

En base a la determinación de color en el Yakult comercial y en la mezcla fermentada, se hicieron pruebas de adición de la solución de color sobre volúmenes iguales del producto fermentado

(al que ya se le adicionó el jarabe y el saborizante) por medio de una pipeta graduada, y homogenizando la muestra después de cada adición. Se empezó con dosis pequeñas hasta alcanzar la igualación del color a dosis subsecuentes y mayores.

4.7 SELECCION DE MEZCLAS:

Siguiendo las recomendaciones bibliográficas para hacer una evaluación sensorial [4][6], se seleccionaron las mezclas que tuvieron mayor grado de aceptación en cuanto al sabor del producto utilizando el método de ordenamiento por rangos que a continuación se explica:

Una serie de muestras se presentan a un juez y se le pide que las ordene de acuerdo a su grado de preferencia por el sabor del producto [4]. También se le debe proporcionar un formato de evaluación con el fin de uniformar el modo de evaluar las mezclas (Anexo 1).

Los resultados se estudiaron tabulando los datos de las calificaciones de cada juez y los rangos para cada muestra, y se analizaron según el método descrito en [4][31].

4.8 CAPACIDAD AMORTIGUADORA DE pH:[22]

Se titularon potenciométricamente la mezcla seleccionada y los testigos (100 % contribución proteica de leche y 100 % contribución proteica de suero), los cuales han sido pasteurizados (baño a 92°C, 15 min, con agitación constante) con HCl 0.1 N hasta alcanzar un pH de 3.

4.9 ESTUDIO CINETICO:

La mezcla seleccionada se preparó reconstituyéndola en agua estéril (15 psig, 15 min) y pasteurizándola en baño a 92°C, 15 min con agitación constante. Después de enfriarla a 37°C, se inoculó con 5 % v/v del inóculo de suero que se distribuye por agitación. Luego se incubó a 37°C por 48 h.

Cada 4 h se determinó la acidez y el pH según [46], consumo de lactosa cada 8 h [15][40] y periódicamente se determinó cuenta viable de L.casei en agar MRS con incubación a 35°C, 40 h.

4.10 CARACTERIZACION DEL PRODUCTO OBTENIDO.

Este constió de Análisis Químico y Microbiológico que se efectuó siguiendo las técnicas propuestas en los incisos 4.1.1 y 4.1.2 para la caracterización del producto comercial.

4.11 DETERMINACION DE LA VIDA DE ANAQUEL

Se almacenaron muestras del Yakult preparado a partir de suero demineralizado-leche descremada en refrigeración, a temperatura de 5°C por 20 días. Durante este tiempo se efectuó una inspección sensorial del producto, se determinó el pH y la acidez del mismo, así como una cuenta viable de L.casei en agar MRS aproximadamente cada tercer día.

C A P I T U L O V.

R E S U L T A D O S Y D I S C U S I O N .

5.1 CARACTERIZACION DEL YAKULT:

Los resultados del análisis químico realizado al producto comercial se presentan en el Cuadro VII, los cuales se expresan en base húmeda y base seca, comparándose a su vez con la composición del producto encontrada en la bibliografía [55].

Cuadro VII. Análisis químico del Yakult comercial.

COMPO - NENTE (%)	C O M P O S I C I O N				
	EXPERIM. B.HUMEDA	EXPERIM. B.SECA	TEORICO B.HUMEDA	TEORICO B.SECA	TEORICO COMERCIAL B.SECA
HUMEDAD	82.805	0.00	82.16	0.00	0.00
PROTEINA	1.190	6.92	1.20	6.72	7.13
GRASA	0.075	0.44	1.10 *	6.17	0.59
LACTOSA	1.240	7.21	1.10	6.17	6.53
OTROS					
AZUCARES	14.360	83.51	14.10	79.04	83.73
CENIZAS	0.330	1.92	0.34	1.90	2.02

Los resultados obtenidos son el promedio de dos determinaciones efectuadas por triplicado, cada una se efectuó sobre una mezcla de tres envases del producto que tienen diferente fecha de caducidad.

Los valores obtenidos, de humedad, proteína, lactosa (considerado como sacarosa) y cenizas coinciden con los valores esperados; excepto para la determinación de grasa (*), ya que comercialmente el producto registra en la etiqueta que contiene menos de 0.1 % de grasa, por lo que su composición en base seca teórica aparece en la columna titulada : "teórico comercial".

También se determinaron el pH y la acidez del producto:

pH	3.66
Acidez	0.55 ‰

Los contenidos de lactosa, acidez y el pH varían con el grado de fermentación que tiene [2], ya que los Lactobacilos convierten la lactosa principalmente en ácido láctico y otros, causando un descenso del pH del medio. Esto depende también de las condiciones de almacenamiento en que se conserva el producto en el comercio [55].

El pH del producto es importante por varias razones:

- Es el principal parámetro que se aprecia sensorialmente.
- En base a éste se determina el tiempo que debe durar la fermentación, ya que la incubación debe terminarse a un pH más alto para permitir su posterior acidificación durante la refrigeración [55].
- Para que los microorganismos del Yakult se mantengan activos es importante el mantenimiento de un pH alto, por lo que el control del tiempo y la temperatura son críticos [55].

También la acidez influye, ya que el ácido acumulado restringe el crecimiento del microorganismo [19].

Ya que el Yakult puede ser un buen sustrato para los microorganismos por la cantidad de azúcares que contiene, es muy susceptible de contaminarse y con ello de ser descompuesto por la acción de éstos.

El análisis microbiológico del producto comercial da los resultados que se presentan en el Cuadro VIII.

No existe Norma Oficial del Yakult por lo que se consideró la NOM. F-444-83 vigente para el Yogurt como referencia para comparar el análisis microbiológico.

Cuadro VIII. Análisis microbiológico del Yakult.

TIPO DE M.O.	UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS/ML	
	EXPERIMENTAL	NORMA OFICIAL DEL YOGURT
CUENTA BACTERIANA TOTAL	8.98×10^7	
LEVADURAS	7.95×10^5	1×10^1
HONGOS	5.83×10^3	1×10^1
M.O. PSICROFILICOS	3.90×10^5	
BACTERIAS COLIFORMES	0.00	1×10^1
<u>Lactobacillus casei</u>	5.95×10^7	

La cuenta bacteriana total (CBT) no indica el tipo de microorganismos que se desarrollan en este medio, por lo que se efectuaron cuentas en otros medios y condiciones que permiten el crecimiento de éstos permitiendo diferenciarlos en: L.casei, bacterias coliformes, hongos y levaduras y microorganismos psicofílicos [46].

El resultado de la cuenta bacteriana total incluye a todos estos microorganismos, la diferencia entre la CBT y la de L.casei (3.03×10^7 ufc/ml) indica el número de microorganismos que llegan al producto durante el proceso de elaboración, envasado y almacenamiento del producto.

Estas pruebas ayudan a determinar las condiciones sanitarias en que se trabaja durante la elaboración del producto [46]. El tipo y grado de contaminación que presente un producto lo altera rápidamente y modifica sus características, por lo que se hace más difícil su conservación

Debido a que este producto se conserva en refrigeración debe verificarse el número de microorganismos psicrófilos presentes. De algunas colonias de esta determinación se hizo una observación microscópica y se encontró que se trataba de levaduras.

La cuenta de bacterias coliformes negativa indica que no existió contaminación de este tipo, después de la pasteurización del medio de fermentación o por la adición de los demás ingredientes [46].

Los resultados que se observan en el Cuadro anterior muestran que el producto presenta una elevada contaminación por hongos y levaduras, que influyen también en la composición del producto ya que sus componentes pueden ser utilizados por éstos.

El número y tipo de microorganismos contaminantes son importantes ya que uno de los problemas de estas bacterias en especial, es que no son competitivas en presencia de otros microorganismos [55].

Para determinar la cuenta viable de L. casei se utilizó un medio selectivo MRS, que se recomienda para el crecimiento de Lactobacilos debido a la acción estimulante del citrato, acetato, tween 80 y Mn^{+2} en el medio [45][52].

Yakult Honsha, Co. [61], reporta que el producto contiene más de 1×10^8 unidades formadoras de colonias (ufc) por ml activas, según lo reportado en [55], un producto terapéutico debe proporcionar entre 10^5 y 10^8 ufc/ml. Por lo que experimentalmente el producto no cumple con la primera información, habiéndose perdido aproximadamente 59.5 % de la carga aunque queda dentro del intervalo establecido para cualquier producto terapéutico.

El número de L.casei activos presentes en el producto depende de la cantidad de sustrato disponible (principalmente lactosa), del pH del medio, de la cantidad de ácido láctico presente y de la temperatura de conservación. Por lo tanto al disminuir la cantidad de nutrientes disponibles, el pH y al aumentar la acidez, el número de microorganismos viables se reduce.

5.2 AISLAMIENTO, IDENTIFICACION BIOQUIMICA Y CONSERVACION DE LA CEPA YAKULT.

Debido a que el producto comercial contiene otros microorganismos además del L.casei, único microorganismo productor del Yakult, fue necesario aislarlo utilizando un medio selectivo para bacterias ácido-lácticas como el MRS que contiene acetato como agente selectivo [20] y que permite separarlo de hongos y levaduras por diferencias en el crecimiento [8]. Da un buen crecimiento en 40 h y además se puede observar contraste del microorganismo con el medio, lo que facilita su cuenta en placa.

De las diluciones efectuadas al Yakult, sembradas en agar MRS se observaron colonias aisladas, incluidas en el agar. Estas colonias al desarrollarse y si se encuentran cerca de la superficie del agar lo atraviesan dando colonias superficiales y otras que se observan entre el fondo de la caja petri y el agar.

De cada una se efectuó una observación microscópica teñida por la técnica de Gram para confirmar su morfología microscópica.

En los tres se observaron microorganismos Gram positivos, bacilos cortos que se encuentran en su mayor parte en cadenas y escasamente aislados [61].

La morfología colonial que se observó se presenta en el Cuadro IX.

Cuadro IX. Morfología Colonial del L.casei en agar MRS.

CARACTERISTICA	COLONIA SUPERFICIAL	COLONIA INCLUIDA
FORMA	Circular	Circular
COLOR	Blanco	Blanco
BORDE	Entero	Ligeramente ondulado
SUPERFICIE	Lisa	
ASPECTO	Húmedo	Húmedo
ELEVACION	Convexa	Fusiforme
LUZ TRANSMITIDA	Opaca	Opaca
LUZ REFLEJADA	Brillante	Brillante
CONSISTENCIA	Mucoide	Mucoide
OLOR	Ausente	Ausente
TAMAÑO	2 -- 5 mm	

De una colonia aislada se sembró una placa de MRS por estría cruzada para corroborar la pureza del microorganismo y se observó su morfología microscópica para confirmar sus características; luego se inoculó en caldo MRS. Después de incubado se volvió a inocular en caldo nutritivo obteniéndose un mayor crecimiento, esto ayudó a aumentar la actividad del microorganismo [2]. El crecimiento observado en el caldo tiene las características señaladas en el Cuadro X.

Cuadro X. Crecimiento del L.casei en caldo MRS.

Cantidad de crecimiento:	Moderado.
Crecimiento superficial:	Ausente.
Turbidez:	Va en gradientes de concentración siendo más denso en el fondo.
Depósito:	Blanco, floculento que se desintegra por agitación.

La cantidad de crecimiento obtenido aumentó con las transferencias, conservando las mismas características de crecimiento superficial, turbidez y depósito.

Una vez aislado el microorganismo, se procedió a su identificación mediante pruebas bioquímicas.

Para llevar a cabo la identificación bioquímica del microorganismo se verificó la pureza de éste mediante la observación de la morfología microscópica del caldo con crecimiento que se utilizó como inóculo.

En la práctica se encontraron ventajas en el empleo de los métodos miniaturizados con respecto a los métodos convencionales y de acuerdo con [24][25][45]:

---Para los métodos miniaturizados se emplean placas de hemaglutinación que constan de 96 pozos de 0.25 ml de capacidad en lugar de tubos de vidrio con capacidad de 25 ml. Esto presenta una ventaja en cuanto a la disminución del equipo, la cantidad de medios empleados y la cantidad de inóculo necesaria para efectuar las pruebas .

---El empleo de medios líquidos reduce el tiempo de reacción de las pruebas así como el tiempo de lectura de las mismas.

---La disposición de los pozos en las miniplacas permite efectuar un mayor número de pruebas simultáneamente y realizarlas por duplicado o triplicado.

A pesar de las ventajas que ofrece, hay algunas desventajas al efectuar las pruebas:

---No todas las pruebas se pueden realizar en las miniplacas como son: la producción de gas a partir de glucosa, y el crecimiento a 15 y 45°C .

---También se presentan algunos problemas de contaminación, debido probablemente a que no se conservara una distancia adecuada entre cada pozo de prueba, a un volumen excesivo de medio o a que la posición de la placa durante la incubación no fuera la correcta.

Debido a que sólo se disponía de una jeringa para hacer pasar la solución de azúcar a través del filtro de membrana, la primera debe lavarse con agua estéril repetidas ocasiones para eliminar cualquier residuo del carbohidrato anterior que pudiese haber quedado y que contamine el siguiente, alterando las lecturas.

Cuadro XI. Caracterización de la cepa Yakult.

PRUEBAS BIOQUIMICAS EN CARBOHIDRATOS		
	EXPERIMENTAL	TEORICO
ARABINOSA	-	-
CELOBIOSA	+	+
GALACTOSA	+	+
GLUCOSA	+	+
LACTOSA	+	+
MALTOSA	+	+
MANITOL	+	+
MELEZITOSA	+	+
MELIBIOSA	-	-
RAFINOSA	-	-
RAMNOSA	-	-
RIBOSA	-	+
SACAROSA	+	+
SORBITOL	+	+
TREHALOSA	+	+
XILOSA	-	-

PRUEBAS BIOQUIMICAS COMPLEMENTARIAS		
	EXPERIMENTAL	TEORICO
HIDROLISIS DE ESCULINA	+	+
UTILIZACION DE CITRATO	-	-
CRECIMIENTO A 15°C	+	+
CRECIMIENTO A 45°C	+	+
COAGULACION DE LA LECHE	+	+

Los resultados de las pruebas bioquímicas realizadas, se muestran en el Cuadro XI comparados con lo reportado en [59][61].

Los resultados positivos para la fermentación de carbohidratos se consideran como tal, cuando el color del medio rojo (respecto al testigo de agua) cambia a amarillo. Para la hidrólisis de Esculina una lectura positiva se obtiene cuando el medio se torna negro. Un cambio del color azul del indicador azul de bromotimol indica lectura positiva para la utilización de citrato [24][25].

El microorganismo examinado muestra que es capaz de utilizar los carbohidratos mencionados en el Cuadro anterior aunque no todas las lecturas se obtuvieron al mismo tiempo:

Las lecturas para Celobiosa, Galactosa, Lactosa, Manitol, Ribosa y Trehalosa fueron positivas al primer día de incubar las pruebas. Para Sorbitol la lectura fue positiva al tercer día de incubación. Maltosa, Melezitoza y Sacarosa dieron lectura positiva al quinto día de incubación. Todos los demás carbohidratos que se probaron, se confirmaron según lo reportado [61] como negativos hasta el último día de incubación indicado para estas pruebas (7 días).

Las pruebas bioquímicas complementarias que se hicieron como: la Hidrólisis de Esculina, fue positiva al primer día de

incubación; las pruebas de crecimiento: a 45°C y a 15°C fueron positivas después de incubar las muestras 2 y 7 días respectivamente. La lectura negativa para utilización de citrato se obtuvo hasta el último día de incubación indicado para esta prueba (7 días).

Con respecto a la conservación de la cepa, ésta se mantuvo principalmente por resiembra en caldo nutritivo MRS ya que se encontraron las siguientes ventajas en su uso como método de conservación:

Permite que la transferencia y verificación de pureza del cultivo sean fáciles ya que sólo se tuvo que mantener una cepa (cultivo simple) y con ayuda de observaciones microscópicas se corroboró su pureza.

Además permite una rápida disponibilidad del cultivo ya que al renovar el medio de cultivo se eliminan las células viejas y las muertas, manteniendo al cultivo en forma activa.

En condiciones asépticas estrictas es posible mantener el cultivo sin contaminaciones.

Aunque este método no se recomienda totalmente en la literatura debido a que las resiembras sucesivas producen variaciones [16][45] se dice que éstas, quedan dentro de un intervalo aceptable [52].

El método de liofilización para conservación del cultivo se efectuó para mantener una reserva de éste, con características estables y sin contaminación. Este proceso duró 22 horas aproximadamente.

Al final del secado primario se observó que la muestra se despegó de la pared del vial y ascendió un poco, la muestra se

siguió secando hasta que se observaba seca. Los viales se almacenaron en refrigeración.

5.3 PREPARACION DEL INOCULO.

5.3.1 Estandarización del Caldo-Inóculo.

Para la estandarización turbidimétrica del inóculo, se encontró que a 635 nm, éste tiene su mínima absorbancia de acuerdo con la Fig. 3.

La cuenta viable de L.casei para determinar el número de células en las diluciones que dieron lectura se presenta en el Cuadro XII.

Cuadro XII. Estandarización turbidimétrica con cuenta de L.casei.

DILUCION DEL INOCULO	ABSORBANCIA	UFC DE <u>L.casei</u> /ml
0.100	0.600	3.54×10^8
0.050	0.315	1.77×10^8
0.025	0.170	8.85×10^7
0.018	0.115	6.44×10^7
0.010	0.060	3.54×10^7
0.001	0.005	3.54×10^6

Con estos resultados se trazó una curva estándar de absorbancia contra ufc/ml. Fig. 4.

Los cultivos a utilizar, deben estar en forma activa para que la determinación turbidimétrica se deba al alto número de células viables presentes .

ESPECTRO DE ABSORCIÓN: CALDO MRS

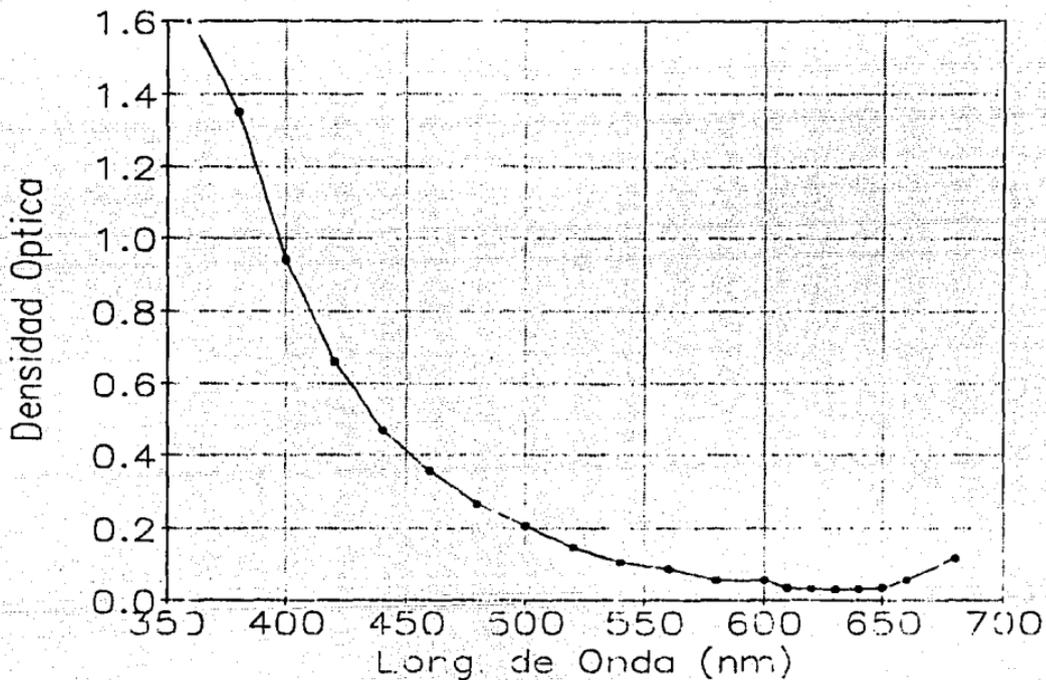


Fig.3. Espectro de absorción: caldo M.R.S.

ESTANDARIZACION DE INOCULO

Longitud de Onda = 635 nm.

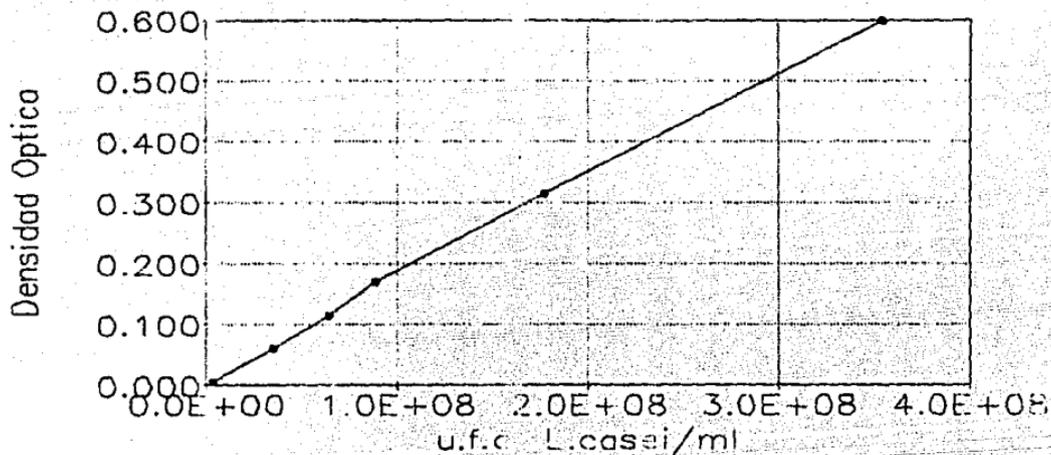


Fig.4. Estándarización de inóculo.

Con esta curva estándar es más fácil y rápido hacer determinaciones posteriores, convirtiendo las lecturas de absorbancia a número de unidades formadoras de colonias por ml, permitiendo obtener concentraciones específicas del microorganismo.

5.3.2 Preparación del inóculo de suero.

Las condiciones de pasteurización de las mezclas (baño a 92°C, 15 min, agitación constante) se determinaron experimentalmente para evitar contaminación por bacterias, hongos y levaduras provenientes del suero en polvo.

Además se observó que la temperatura y el tiempo prolongado, proporcionaban estabilidad a las partículas del suero (no se presentó sedimentación por más de 3 semanas de almacenamiento en refrigeración) y producían un cambio favorable en su color: pasando de amarillo verdoso ligeramente translúcido a un color amarillo claro opaco.

Las transferencias del inóculo tienen como fin, que el microorganismo se adapte al suero, un medio de crecimiento con menor riqueza en nutrientes que el MRS. En éstas se determinaron la acidez y el pH, inicial y final como se muestra en el Cuadro XIII.

Cuadro XIII. Valores de pH y acidez de las transferencias del inóculo en suero y suero + extracto de levadura.

TRANSF	DETERMIN	I N O C U L O		TIEMPO
		SUERO	SUERO+E.L.	
1a.	Acidez (%)	0.034	0.036	0 h
		0.678	0.915	72 h
	pH	6.23	6.22	0 h
		1.94	1.85	72 h
2a.	Acidez (%)	0.034	0.036	0 h
		0.278	0.625	48 h
	pH	6.23	6.21	0 h
		2.53	2.20	48 h

El inóculo de Suero + Extracto de levadura desarrolló mayor acidez y alcanzó un pH inferior al del inóculo de suero, debido a que el extracto de levadura favorece el crecimiento del microorganismo, permitiendo que las bacterias proliferen y produzcan ácido durante la fermentación.

La proporción de inóculo se aumentó a 5 % para disminuir el tiempo de fermentación, asegurar una carga de L.casei elevada [55] y ayudar a evitar infección del cultivo con bacteriófagos [49].

De la última transferencia se examinó la cuenta de L.casei en ambos inóculos para determinar si era necesario adicionar extracto de levadura como factor de crecimiento. El inóculo también se evaluó sensorialmente para verificar si el extracto de levadura modificaba apreciablemente sus características. Los resultados obtenidos están contenidos en el Cuadro XIV.

Cuadro XIV. Comparación del inóculo de Suero y Suero+E.L.

CARACTERISTICA	INOCULO DE SUERO	INOCULO DE SUERO + E.L.
UFC/ml DE <u>L.casei</u>	7.58×10^8	1.1×10^9
OLOR	Normal	Muy fuerte de EL.
COLOR	Amarillo claro	Amarillo
SABOR	Acido agradable	Desagradable, de E.L.

Como se observa, el inóculo de suero contiene 70.45 % de la carga celular presente en el suero + E.L por lo que la diferencia en el crecimiento no es lo suficientemente grande para considerar necesario el extracto de levadura como factor de crecimiento.

En cuanto a sus características sensoriales, el suero no enmascara el sabor y el olor fuerte del extracto de levadura por

lo que no es conveniente por problemas sensoriales, además de su costo adicional.

Cada vez que se preparó inóculo para sembrar el medio de fermentación se mantuvieron las mismas condiciones: se inoculó al 5 % del pase anterior y se incubó a 35°C, 48 h. Y antes de utilizarlo se determinó cuenta viable de L.casei para asegurar una carga de 1×10^8 ufc/ml.

5.4 FERMENTACION.

El empleo de suero dulce desmineralizado (S.D.D.), permite obtener niveles más altos de sustitución de leche descremada por éste [22][43] ya que, comparando la composición de la leche descremada (L.D.) y del suero entero (S.E.) (Cuadro XV) se observa que el último puede sustituir a la leche descremada, puesto que el contenido de grasa y minerales son comparables.

Cuadro XV. Composición comparativa en base seca de L.D y S.E.

COMPONENTE	LECHE DESCREMADA ^a	SUERO ENTERO ^b
% PROTEINA	36.77	13.62
% GRASA	1.01	0.83
% LACTOSA	53.86	77.96
% CENIZAS	8.12	7.59
% LECITINA	0.21	

a) Especificaciones del producto según Sveltes, Nestlé, S.A.
b) Según bibliografía [29].

Sin embargo, el nivel de las proteínas no es comparable, por lo que el suero entero no podría suministrar el 100 % del nivel proteico (Mezcla) en el producto sin que exista un aumento considerable en la cantidad de cenizas (Fig.5) con los

COMPOSICION COMPARATIVA

Leche descrem, Suero ent. y Suero desm

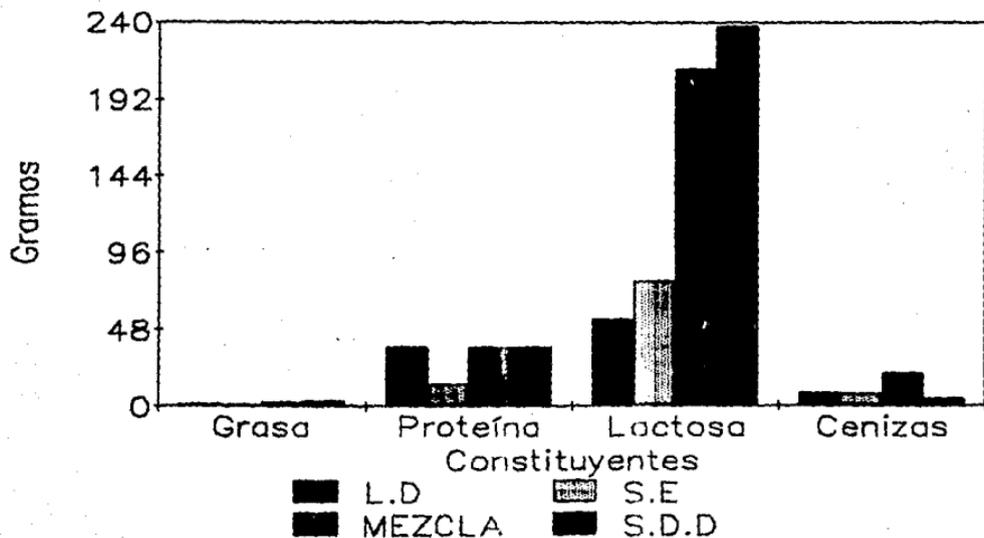


Fig.5. Comparación del contenido proteico y mineral de la leche descremada, suero entero y suero desmineralizado.

consecuentes problemas en la fermentación [29][38].

El análisis bromatológico efectuado experimentalmente, del Suero desmineralizado y la leche descremada, ambos en polvo, utilizados en esta investigación, expresado en base húmeda y base seca, se observa en el Cuadro XVI.

Cuadro XVI. Análisis bromatológico del suero dulce desmineralizado y leche descremada.

COMPONENTE (%)	SUERO DESMINERALIZADO		LECHE DESCREMADA	
	B.HUMEDA	B.SECA	B.HUMEDA	B.SECA
GRASA	1.00	1.05	1.15	1.21
PROTEINA	12.37	13.05	33.17	34.89
LACTOSA	79.84	84.23	52.86	55.60
CENIZAS	1.58	1.67	7.89	8.30
HUMEDAD	5.21		4.93	

Para el análisis espectrofotométrico de lactosa [15], la curva estándar obtenida se presenta en la Fig.6

En base al contenido proteico (Cuadro XVI) se prepararon mezclas de leche descremada y suero desmineralizado en diferentes proporciones (Cuadro XVII) que al reconstituirse se ajusten al 1.19 % de proteína determinado en el producto comercial [22].

Cuadro IX. Mezclas de suero desmineralizado y leche descremada.

MEZCLA	% CONT.PROT. DE SUERO	% CONT.PROT. DE LECHE	g/100ml SUERO	g/100ml LECHE
	1	0	100	0.00
2	25	75	2.40	2.69
3	50	50	4.81	1.79
4	75	25	7.21	0.90
5	100	0	9.62	0.00

CURVA ESTANDAR PARA LACTOSA

Longitud de Onda = 488 nm

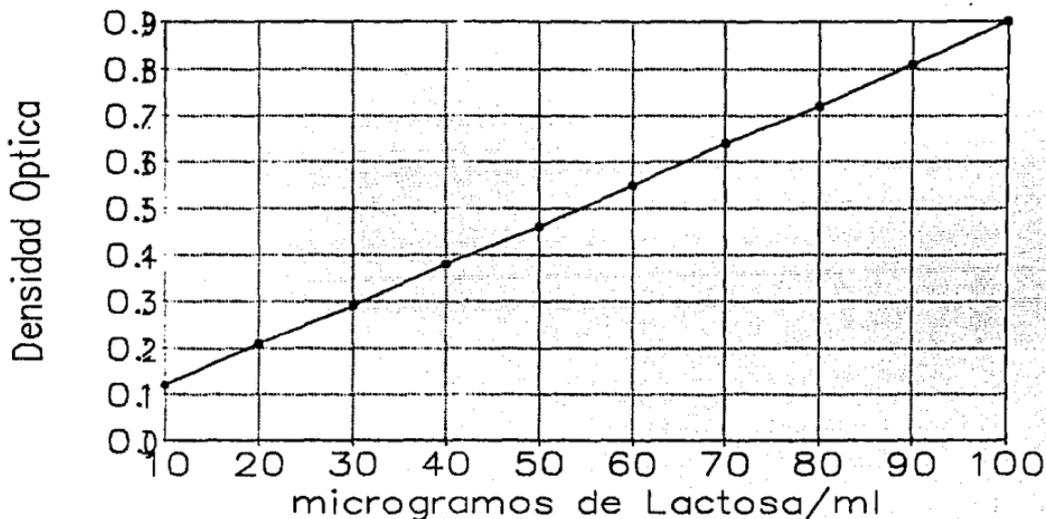


Fig.6. Curva estándar para determinación de lactosa.

Las mezclas de leche y suero, pasteurizadas (en baño a 92°C, 15 min) y enfriadas a 37°C se inocularon al 5 % v/v con el inóculo de suero que proporcionó una carga de 1×10^8 ufc/ml (determinado por cuenta viable en MRS). Después se incubaron 48 h a 37°C con el objeto de comparar el proceso fermentativo de las mezclas, determinando los valores de pH y acidez, iniciales y finales.

Los resultados que se presentan en el Cuadro XVIII, son el promedio de 2 fermentaciones con determinaciones hechas por triplicado.

Cuadro XVIII. Fermentación de las mezclas de suero desmineralizado y leche descremada.

MEZCLA	% CONTRIBUCION PROTEICA DE SUERO	pH INICIAL	ACIDEZ INICIAL %	pH FINAL	ACIDEZ FINAL %
1	0	6.74	0.042	4.67	0.235
2	25	6.69	0.036	4.02	0.393
3	50	6.61	0.034	3.77	0.412
4	75	6.57	0.029	3.99	0.327
5	100	6.48	0.029	3.98	0.300

Temperatura de incubación :37°C.
tiempo de incubación: 48 h.

Los valores de pH son más altos a un mayor contenido de leche en la mezcla. Esto se explica por el contenido de caseínas en la leche, que actúan como componentes con acción amortiguadora que resisten los cambios de pH.

Sin embargo , el valor del pH no es suficiente para predecir la respuesta microbiana, ni permite conocer el cambio en la acidez titulable.

La acidez inicial de las mezclas disminuye conforme aumenta el porcentaje de suero en la misma, debido a que la valoración acidimétrica es una medida indirecta de la riqueza en caseína y fosfatos presentes en la mezcla [1].

Después de la fermentación, la acidez final en las mezclas 0, 25 y 50 % de contribución proteica de suero es mayor al aumentar la cantidad de suero. Esto se explica por el incremento del contenido de lactosa en el medio de fermentación, que estimula la producción de ácido por los microorganismos del cultivo iniciador.

En las mezclas de 75 y 100 % de contribución proteica de suero se observa que la acidez titulable disminuye, esto indica que la capacidad amortiguadora o buffer de la leche permite que las bacterias lácticas se desarrollen y produzcan más ácido a lo largo del proceso fermentativo, antes de que se detenga la multiplicación. En cambio, en el suero se producen pequeñas cantidades de ácido por la rápida disminución del pH que inhibe su desarrollo.

Al final de la fermentación se evaluaron el sabor, color y grado de sedimentación de las mezclas (Cuadro XIX).

Cuadro XIX. Sabor, color y sedimento de las mezclas fermentadas.

¿ SUERO EN LA MEZCLA	SABOR	COLOR	SEDIMENTACION
0	Insípido	Blanco verdoso	muy desuerado:+5
25	Muy ácido	Blanco verdoso	desuerado:+4
50	Acido	Cremoso	poco desuerado:+2
75	ligeramente dulce	Cremoso	ligeramente desuerado:+1
100	moderadamente dulce	Cremoso, ligeramente café.	desuerado:+3

La mezcla de 100 % leche fue la que presentó mayor sedimentación, se observó que las partículas estaban muy retraídas y no se homogeneizaban al agitar, asentándose casi de inmediato.

La mezcla de 25 % suero también presentó problemas similares pero en menor grado.

Para las mezclas de 50, 75 y 100 % suero, las partículas son más finas y se dispersan uniformemente sin asentarse, especialmente para las mezclas de 50 y 75 % suero.

Las diferencias en el color se atribuyeron al tratamiento térmico del suero que favorece reacciones de oscurecimiento, principalmente de tipo reacción de Maillard, entre las proteínas y la lactosa (presente en grandes cantidades) del suero.

5.5 ADICION DE JARABE, SABOR Y COLOR.

Respecto a la adición del jarabe y mezcla saborizante a la mezcla fermentada, la prueba de referencia carecía de dulzor y el aumento a 10 % de jarabe fue aceptable, para una cantidad mayor de jarabe el producto quedaba muy dulce.

Al mantener constante la cantidad de saborizante añadido y variar la proporción de cada sabor en la mezcla saborizante, se observó preferencia para un porcentaje mayor del sabor naranja en la mezcla saborizante. Luego se disminuyó la cantidad de adición de saborizante a la mezcla fermentada para reducir costos sin menoscabar las propiedades sensoriales del producto. La prueba de adición que se eligió, se presenta en el Cuadro XX.

Esta evaluación fue realizada por el Asesor y la Tesista.

Cuadro XX. Formulación de adición de jarabe y mezcla saborizante.

Jarabe de sacarosa	10.0 %
Mezcla saborizante	0.4 %
Sabor naranja	0.3 %
Sabor Limón	0.1 %

En cuanto al color, se determinó inicialmente en el Yakult comercial y en la mezcla de suero fermentada (adicionada de jarabe y saborizante). Las lecturas de reflectancia obtenidas fueron de 3.2 y 76.2 respectivamente.

Sobre porciones de 50 ml se ensayaron adiciones crecientes de color, tomando 0.5 ml de la solución de colorante como valor inicial. Los resultados de las adiciones y las lecturas obtenidas se presentan en el (Cuadro XXI).

Cuadro XXI. Adición de colorante.

PRUEBA	VOL. COLOR ADICIONADO	LECTURA OBTENIDA
1	0.5 ml	21.3
2	0.6 ml	16.0
3	0.7 ml	12.0
4	0.8 ml	7.8
5	0.9 ml	4.3
6	0.95ml	3.0
7	1.0 ml	2.2
8	1.1 ml	<0.0

La lectura más cercana a 3.2, es 3.0 que se obtuvo por la adición de 0.95 ml de solución colorante a la mezcla fermentada, sin embargo, se escogió la lectura de 2.2 resultante de la

adición de un mililitro de solución colorante a 50 ml de mezcla fermentada por ser un volumen de más fácil manejo.

La adición de solución colorante determinada fue de 2 ml de solución colorante (1 ml del color concentrado aforado a 250 ml con agua destilada estéril) por cada 100 ml de mezcla fermentada.

5.6 SELECCION DE MEZCLAS.

La selección de las mezclas se basó en una evaluación sensorial por preferencia respecto al sabor de las mismas siguiendo el método de ordenamiento por rangos.

Las mezclas de 25, 50, 75 y 100 % contribución proteica de suero, enfiadas entre 7-10°C se dividieron en porciones de 30-40 ml en envases individuales y fueron evaluadas por 14 jueces no entrenados.

Las calificaciones otorgadas para cada mezcla se encuentran en el Cuadro XXII, considerando el valor de 1 para la mezcla de mayor agrado y de 4 para la de menor agrado.

De los comentarios recibidos, los jueces coinciden en:

- Mezcla de 25% suero.- tiene un sabor desagradable, o parecido a rancio.
- Mezcla de 50% suero.- tiene un sabor demasiado ácido y que se asoció con algo descompuesto.
- Mezcla de 75% suero.- resultó con buen sabor y con tono ácido agradable.
- Mezcla de 100% suero.- muestra buen sabor.

Cuadro XXII. Evaluación sensorial de las mezclas.

JUEZ	CONT. PROT. SUERO	M	U	E	S	T	R	A	S
		25 %	50 %	75 %	100 %				
1		3	4	2	1				
2		4	3	2	1				
3		3	4	2	1				
4		4	3	1	2				
5		4	3	1	2				
6		3	4	1	2				
7		3	4	1	2				
8		3	4	2	1				
9		3	4	1	2				
10		1	4	3	2				
11		3	4	2	1				
12		1	2	4	3				
13		3	1	2	4				
14		2	4	3	1				
-----		-----	-----	-----	-----				
TOTAL		40	48	27	25				

Estos resultados se analizaron según el procedimiento indicado en [4] y [31]. De acuerdo con ésto, el intervalo de las sumas de las evaluaciones para cada muestra son significativamente diferentes con un nivel de 5 % de probabilidad.

En base a las tablas presentadas en [31], se encuentra que para un número de 14 jueces y 4 muestras, el intervalo de las sumas va de 25 a 45, una suma mayor a 45 indica que la muestra tiene menor preferencia y una suma menor a 25 indica que dicha muestra tiene mayor preferencia.

Según lo anterior, la mezcla de 50 % proteína de suero es la de menor agrado.

Para tomar una decisión respecto a las otras tres mezclas, en el procedimiento mostrado en [31], las sumas de las mezclas restantes se analizan del mismo modo anterior, pero considerando 14 jueces y 3 muestras evaluadas. De acuerdo con esto, el intervalo de las sumas debe estar entre 21 y 35. De esta forma la mezcla que contiene 25 % de contribución proteica de suero quedó eliminada.

Las dos mezclas restantes no muestran diferencia significativa. Cualquiera de las dos puede elegirse como la mejor. Aquí hay que considerar que por costo la mezcla de 100 % sería la mejor opción, pero el contenido de lactosa sería más alto (aproximadamente 5 %, determinado en el producto final), por lo que se eligió la mezcla de 75 % contribución proteica de suero.

5.7 CAPACIDAD AMORTIGUADORA DE pH.

Al titular potenciométricamente 150 ml de la mezcla seleccionada de 75% contribución proteica de suero y como testigos: la mezcla que contiene sólo leche descremada y la mezcla que es únicamente suero desmineralizado, las cuales fueron previamente pasteurizadas y enfriadas a temperatura ambiente, se obtuvo la Fig.7 que muestra la caída de pH contra el número de ml de HCl 0.1 N añadidos.

Se observa que la mezcla de 100 % contribución proteica de leche requiere que se le añada mayor cantidad de HCl para que el pH descienda a 3.0, en comparación con las demás en que el pH desciende marcadamente con pequeñas adiciones del ácido.

Esto se explica porque la capacidad amortiguadora de la leche se debe a una serie de componentes que intervienen en la

valoración entre el pH normal de la leche y el pH alcanzado en la titulación [1]. Estos componentes, ácidos o bases débiles son

CAPACIDAD AMORTIGUADORA

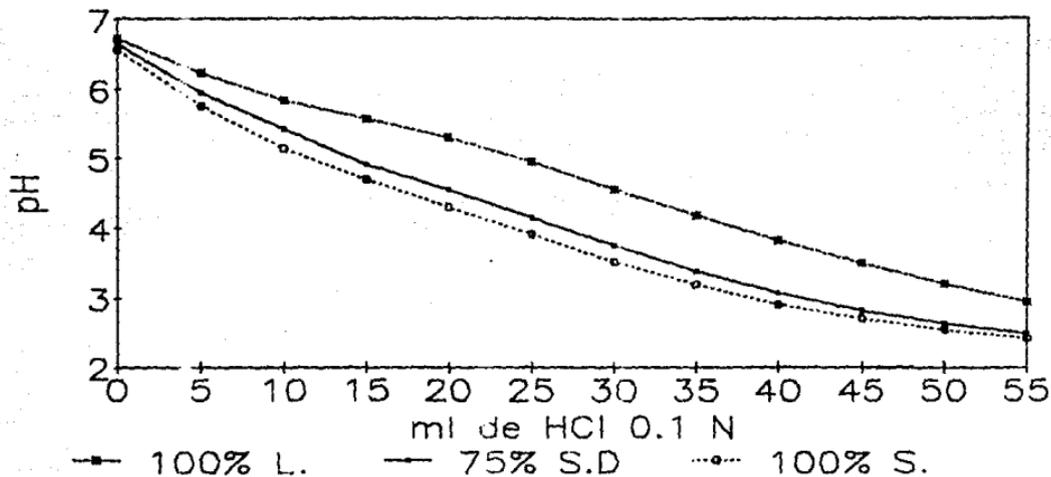


Fig.7. Capacidad amortiguadora de pH.

principalmente: la caseína (principalmente por sus grupos ésteres fosfóricos) y el ácido fosfórico (debido a su función secundaria), también participan, el ácido cítrico y los grupos Á-amino libres. A pH inferior a 4.0, intervienen los ácidos orgánicos presentes [1]. En cambio, el suero contiene pequeñas concentraciones de estos componentes y en consecuencia, su capacidad amortiguadora es muy baja.[22]

Los componentes que tienen capacidad amortiguadora permiten prolongar las fermentaciones ácidas con incremento de los productos y organismos obtenidos.

5.8 ESTUDIO CINETICO.

El estudio cinético fermentativo de la mezcla que contiene 75 % proteína de suero, se obtuvo promediando 4 cinéticas que se hicieron manteniendo las mismas condiciones de: porcentaje de inóculo usado (5 % v/v), carga de L.casei aportada por el inóculo (10 8 ufc/ml), temperatura (37°C) y tiempo de incubación de 48 h.

Los resultados se presentan en Figuras (8, 9, 10 y 11) que muestran los cambios en los parámetros de pH, acidez, lactosa y número de L.casei, respecto al tiempo de fermentación.

Los resultados de la cinética de pH (Fig.8) muestran un pequeño descenso de este valor hasta las 4 h de iniciada la incubación que va de 6.26 a 6.18. Desde este momento y hasta las 28 h, el pH disminuye marcadamente de 6.18 a 4.3, para luego estabilizarse gradualmente hasta el final de la fermentación llegando hasta un valor de 3.86 .

Durante las primeras horas de incubación, la cantidad de ácido láctico que se forma y la disminución de pH son muy pequeñas, porque los microorganismos del cultivo iniciador

ESTA TERCERA NO BEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

DISMINUCION DE pH.

T=37 C, 75% S.D.D. 25% L.D. Inóculo 5%

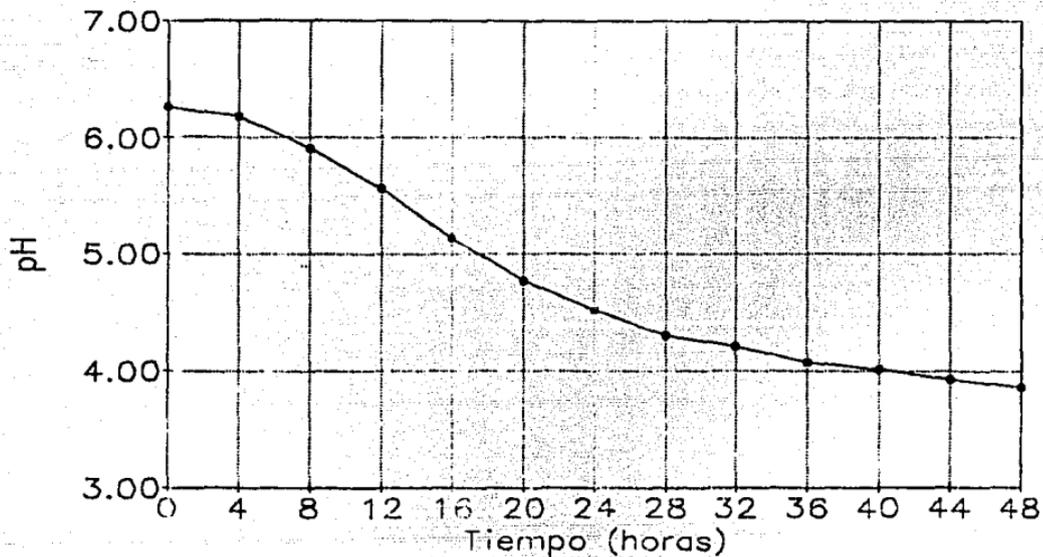


Fig.8. Estudio cinético: Disminución de pH.

añadidos a la mezcla no se encuentran en fase activa de crecimiento y además el número presente es pequeño.

A medida que la población de L.casei aumenta, se observa un incremento en la velocidad de desarrollo de acidez y rápido descenso del pH, para la última parte de la fermentación, el ácido láctico presente y el pH de la mezcla de suero y leche fermentada, restringen el crecimiento de L.casei y por lo tanto el ácido láctico se forma más lentamente y hay poco descenso del pH.

La acidez producida es responsable en gran parte del pH, debido a la escasa capacidad amortiguadora del suero, que es el que predomina en esta mezcla de leche-suero.

Debido a que el pH final del producto en el envase debe ser mayor a 3.7 (porque de otra manera, el número de L.casei viables disminuye rápidamente) se requiere que el período de incubación se detenga al llegar a pH 4.1-4.2. Estos valores coinciden con 32-35 h de iniciada la fermentación.

El pH no afecta únicamente a la velocidad de crecimiento de los microorganismos sino también su supervivencia durante el almacenamiento.

La cinética de producción de acidez (Fig.9) muestra que en las primeras 8 h de incubación, la acidificación del sustrato es pequeña, aumentando de 0.05 a 0.06 %. Luego, la acidificación se intensifica hasta las 40 h de iniciada la fermentación alcanzando 0.29 % de acidez. En las siguientes 8 h, el aumento de acidez es menor, llegando finalmente hasta 0.32 % de ácido láctico.

El aumento de acidez más acentuado tiene lugar después de las 8 h iniciales y hasta las 40 h (Fig.9) después de iniciar la incubación, tiempo durante el cual se produce el mayor crecimiento celular (Fig.11). La producción de ácido láctico

PRODUCCION DE ACIDEZ.

T=37 C, 75% S.D.D. 25% L.D, Inóculo 5%

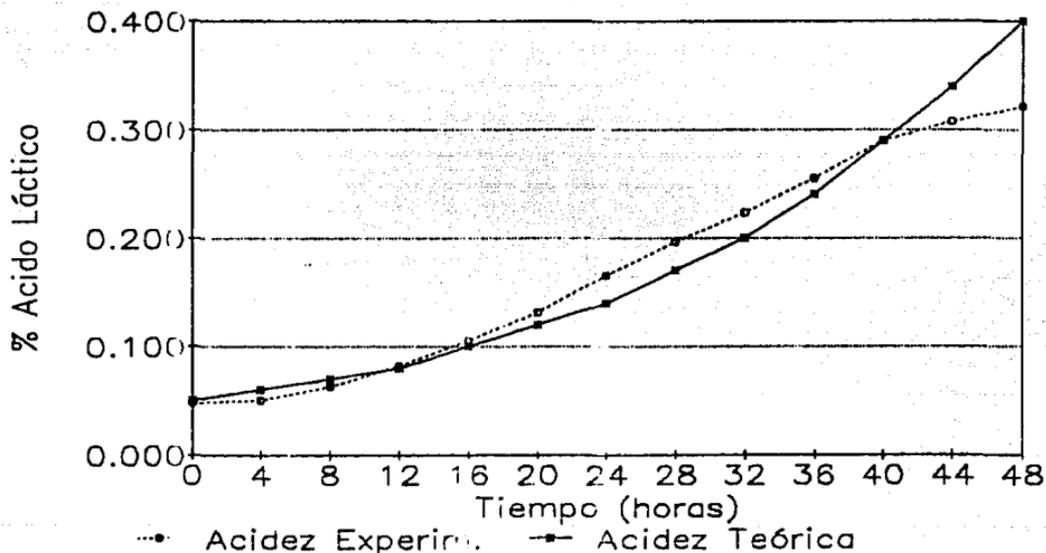
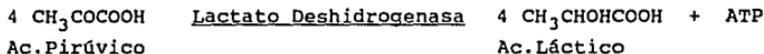
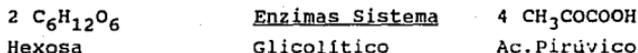


Fig. 9. Estudio cinético: Producción de acidez.

durante la fermentación, se explica de manera similar a la disminución del pH.

En la cinética de consumo de lactosa (Fig.10), se observa una disminución moderada durante las primeras 8 h de la fermentación obteniéndose un consumo de 3.66 % de la lactosa original. A medida que transcurre la fermentación y hasta las 40 h después de iniciada, la disminución en el contenido de lactosa es la más acentuada que se aprecia en el transcurso de ésta: 19.1 %. En esta etapa, la lactosa metabolizada no se convierte completamente en ácido láctico [52] ya que el 1.25 % de la lactosa que se utiliza no origina 1.31 % de ácido láctico, de acuerdo a las siguientes ecuaciones:



El valor de ácido láctico obtenido es de sólo 0.29 %, probablemente la lactosa restante puede encontrarse en forma de glucosa y galactosa o que se hayan formado otros productos derivados de estas últimas.

En las últimas 8 h de la fermentación, el contenido de lactosa disminuye apenas un 0.45 % de la lactosa original, debido principalmente a que en este momento el pH del medio, empieza a influir en la velocidad de crecimiento del microorganismo y por lo tanto, disminuye la velocidad del metabolismo de la lactosa.

La mayor utilización de lactosa coincide con la fase

CONSUMO DE LACTOSA.

T=37C, 75%S.D.D. 25%L.D. Inóculo 5%

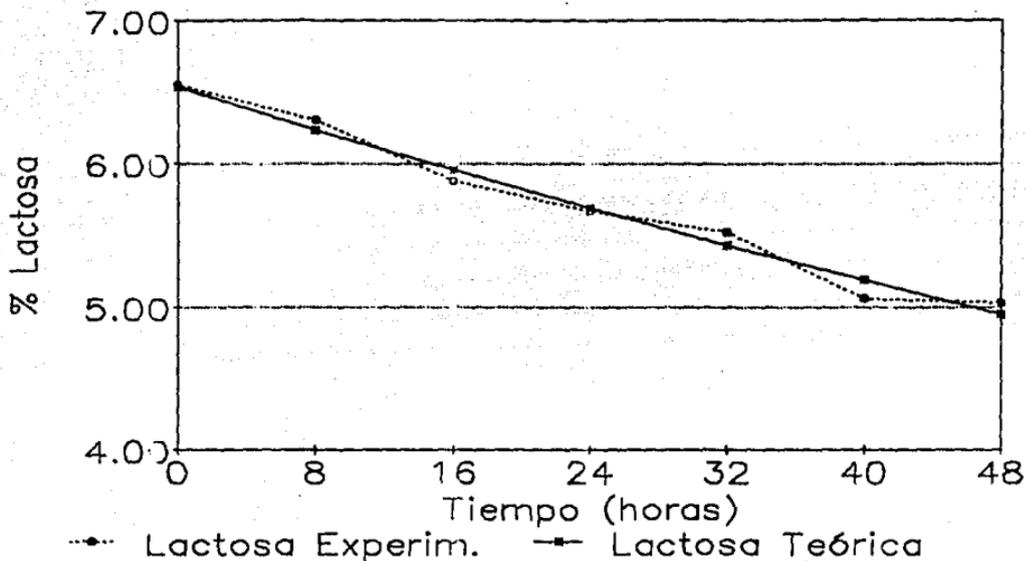


Fig.10. Estudio cinético: Consumo de lactosa.

logarítmica de crecimiento de L.casei como se observa al comparar ambas cinéticas (Fig.10 y 11).

Como se aprecia en la Fig.11, la curva de crecimiento de L.casei durante la fermentación se divide en varias fases:

- Fase lag o de adaptación que va de 0 a 4 h después de iniciar la incubación. El número de microorganismos en el medio fluctúa entre 3×10^6 y 3.77×10^6 ufc/ml respectivamente.

- Fase exponencial de crecimiento desde las 4 h hasta las 32 h de fermentación, en ésta el crecimiento que se obtiene es máximo y constante [8]. Se observa la mayor utilización de sustrato, formación de productos y generación de microorganismos de 3.77×10^6 a 1.066×10^8 ufc/ml.

- Fase de aceleración negativa: de 32 a 46 h en que decrece la velocidad de crecimiento .

- Fase estacionaria: muy breve, prácticamente no existe: de 46-48.5 h.

- Fase de destrucción acelerada: de 48.5 h en adelante.

CRECIMIENTO DE *L.casei*

T=37 C, 75% S.D.D. 25% L.D, Inóculo 5%

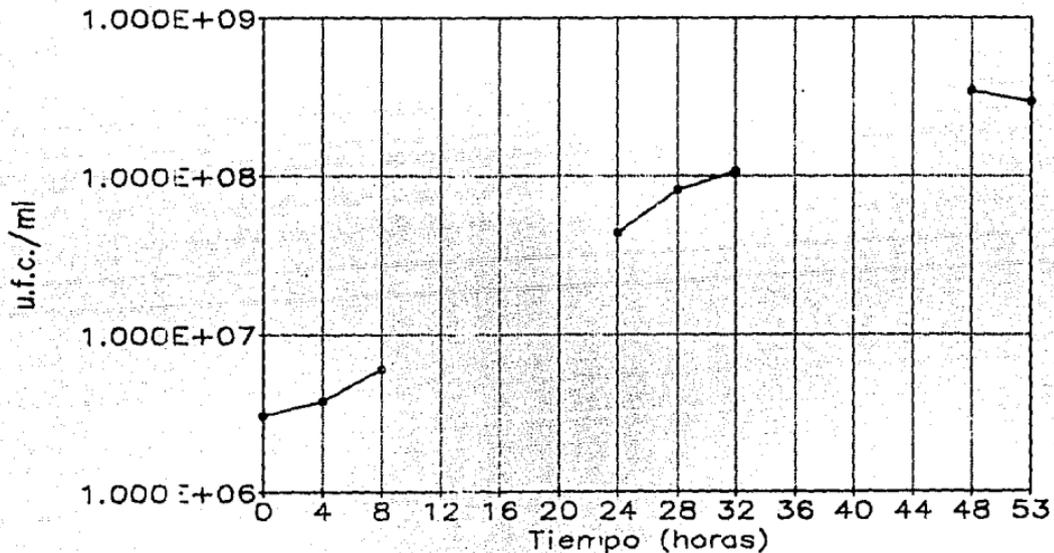


Fig.11. Estudio cinético: Crecimiento de L.casei.

5.9 CARACTERIZACION DEL PRODUCTO OBTENIDO.

El análisis químico del Yakult a partir de suero-leche, en base húmeda y base seca, se muestra en el Cuadro XXIII, comparado con la composición teórica del producto comercial.

Cuadro XXIII. Composición del Yakult de suero-leche.

COMPONENTE (%)	C O M P O S I C I O N			
	YAKULT SUERO-LECHE		YAKULT TEORICO COM.	
	B.HUMEDA	B.SECA	B.HUMEDA	B.SECA
HUMEDAD	86.13	0.00	83.16	0.00
PROTEINA	1.22	8.80	1.20	7.13
GRASA	0.06	0.43	0.10	0.59
LACTOSA	3.47	25.02	1.10	6.53
OTROS AZUCARES	8.19	59.05	14.10	83.73
CENIZAS	0.20	1.44	0.34	2.02
ACIDEZ	0.49			
pH	3.82			

Se promediaron los resultados obtenidos de determinaciones efectuadas por triplicado.

Para las determinaciones de pH, acidez, y lactosa, los valores obtenidos varían con el tiempo de almacenamiento. Los datos incluidos en el Cuadro XXIII se consideraron al séptimo día del estudio de vida de anaquel.

Al comparar ambos productos se encuentra que el contenido de lactosa es más elevado en el Yakult de suero-leche por lo que este producto no puede recomendarse para personas que presentan intolerancia a la lactosa. Se requieren niveles inferiores al 2 %

de lactosa para que no se produzcan síntomas de intolerancia en personas susceptibles [52].

La cantidad de cenizas es menor, debido a que el suero por estar desmineralizado, contiene únicamente el 20 % de las cenizas de la leche descremada.

La diferencia en la concentración de "otros azúcares" se debe a que la cantidad de sacarosa que se añadió al producto se determinó sensorialmente como se explicó en el punto 5.5 y en consecuencia, los sólidos totales disminuyen.

El pH bajo y la acidez del producto contribuyen a su conservación, lo hacen microbiológicamente estable, evitan el desarrollo de bacterias proteolíticas y ácido no-tolerantes. Estos valores no se pudieron comparar con el producto comercial porque varían con el tiempo y condiciones de almacenamiento del producto, y se desconoce dicha información.

Respecto al análisis microbiológico del producto obtenido, ya que no existe norma oficial de calidad para éste, nuevamente se comparó con la NOM-444-1983 para el yogurt.

Las cuentas microbiológicas obtenidas están contenidas en el Cuadro XXIV.

Como el número de microorganismos en el producto es un índice de las precauciones higiénicas y de su manipulación durante su producción, se puede valorar su calidad sanitaria. Por lo que, dada la ausencia de microorganismos contaminantes en el Yakult de Suero-Leche, el producto obtenido es de alta calidad sanitaria, además, no hay otros microorganismos que compitan con L.casei que puedan dar lugar a defectos en el producto.

Cuadro XV. Análisis microbiológico del Yakult de suero-leche.

TIPO DE M.O.	UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS/ML	
	YAKULT SUERO-LECHE	NORMA OFICIAL DEL YOGURT
LEVADURAS	0	1×10^1
HONGOS	0	1×10^1
M.O. PSICROFILICOS	0	
BACTERIAS COLIFORMES	0	1×10^1
<u>Lactobacillus casei</u>	1.12×10^8	2×10^6 a

a) Expresado como Cuenta total de bacterias lácticas en NOM.

La cuenta viable de L.casei se efectuó a los 20 días de la vida de anaquel para compararlo con las referencias [55] y [61].

Según Tamine A.Y y Robinson R.K. [55], un producto terapéutico debe contener entre 10^5 y 10^8 ufc/ml viables, por lo que el Yakult obtenido a partir de suero-leche es terapéutico. Yakult Honsha, Co. [61], reporta que el producto contiene más de 10^8 ufc/ml activas, el producto obtenido cumple con dicha información.

5.10 VIDA DE ANAQUEL DEL PRODUCTO:

El estudio de vida de anaquel del producto se hizo para determinar su estabilidad al almacenarlo a 5°C por un periodo de 20 días.

Las determinaciones que se hicieron para estimar la vida de anaquel del producto fueron: pH, acidez y cuenta viable de L.casei, además de observaciones sensoriales.

Los alimentos perecederos como el Yakult se conservan en refrigeración durante un tiempo limitado, observándose poco cambio en sus propiedades.

Durante el almacenamiento, se observan (Fig.12), un leve incremento en la acidez y un descenso tanto del pH como de la cuenta viable de L.casei ya que a esta temperatura, los cambios enzimáticos microbianos no se evitan por completo sino que se retardan considerablemente, por lo que la producción de ácido láctico continúa lentamente. Aun cuando se incrementa la acidez del medio, es posible retener la carga de L.casei estipulada (10^8 ufc/ml) por el tiempo que dure la vida de anaquel.

En cuanto a las características sensoriales, no se detectaron modificaciones durante el estudio, como presencia de olores desagradables, cambio de color o alteración apreciable del sabor.

De acuerdo a la referencia [55], se considera que una bebida terapéutica debe presentar un mínimo de 10^5 ufc/ml, en una porción de 100 g al final de 14 días de almacenamiento, por lo que es muy importante el mantenimiento del pH y el control de la temperatura.

El producto comercial proporcionaba 4.1×10^6 ufc/ml promedio al cabo de estas condiciones.

En la Fig.12, se observa que el producto a los 14 días tiene un pH de 3.7 y a los 20 días de 3.68, quedando al pH determinado en el producto comercial de 3.66.

Además, se conserva una carga de L.casei poco mayor a 10^8 ufc/ml activas, al cumplir 20 días de almacenamiento del producto. Por lo tanto éste puede ofrecer una vida de anaquel de 20 días sin que cambien apreciablemente sus propiedades.

VIDA DE ANAQUEL

T=5 C, t=20 días, 75% S.D.D., 25% L.D.

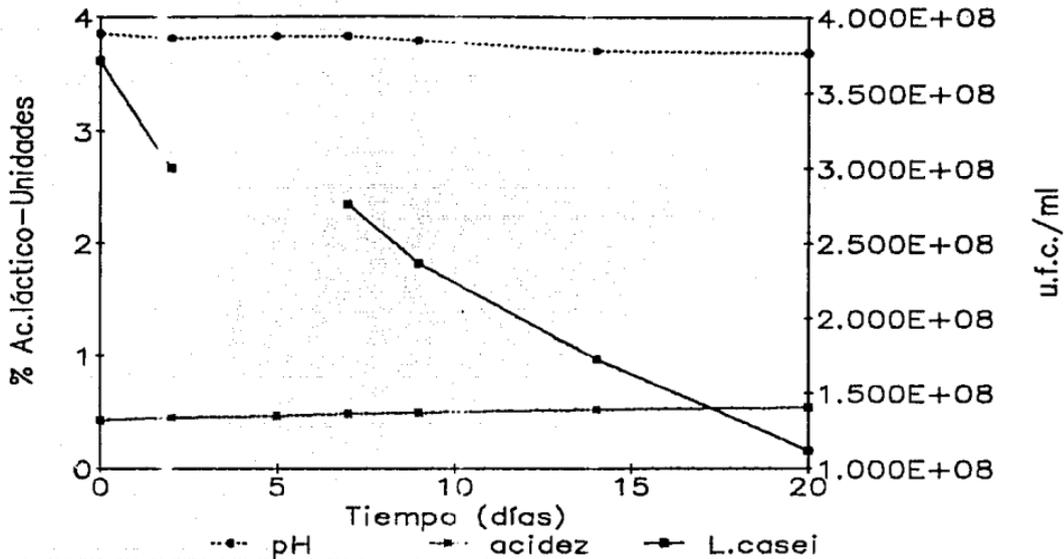


Fig.12. Vida de anaquel del Yakult de suero desmineralizado y leche descremada.

CAPITULO VI.

CONCLUSIONES.

Considerando el material y las condiciones utilizadas en el presente trabajo, se concluye lo siguiente:

El medio MRS permite aislar el Lactobacillus casei del producto comercial, ya que es selectivo para bacterias ácido lácticas. La identidad del microorganismo aislado se comprobó mediante pruebas bioquímicas, cuyos resultados coinciden con las de otros investigadores.

El cultivo de L.casei en caldo MRS, mantenido en condiciones asépticas, conserva al cultivo activo, además permite facilidad de transferencia y verificación de pureza.

El método de liofilización permite conservar la cepa sin necesidad de transferencias y sin cambios en sus características.

El inóculo debe tener una carga de 10^8 ufc/ml de L.casei para que no se prolongue el tiempo de fermentación y se asegure una cuenta de L.casei elevada en el producto final.

Se requiere Suero Dulce Desmineralizado para evitar sabor salado, precipitación de minerales en el producto e interferencias en el crecimiento de los microorganismos durante el desarrollo de la fermentación.

Las mezclas de 75 y 100 % de contribución proteica de suero son las que tuvieron mayor aceptación, la última presenta mayor grado de sedimentación y contenido de lactosa más alto. Por lo tanto, es posible sustituir 75 % de la proteína de la leche

descremada por proteína proveniente del suero, obteniéndose las cualidades más adecuadas para este producto.

Las cualidades del producto final son : buen olor y sabor, tono ácido agradable, textura y color, similares a las del producto comercial de acuerdo a la evaluación sensorial del producto.

El producto obtenido a partir de SUERO DULCE DESMINERALIZADO-LECHE DESCREMADA (S.D.D.-L.D.), tiene mayor nivel nutricional, debido a la calidad de las proteínas del suero; y terapéutico por el número de L.casei viables que junto con el ácido láctico, inhiben bacterias patógenas y ayudan al buen funcionamiento del tracto intestinal.

Debido a la ausencia de microorganismos contaminantes, el producto elaborado en las condiciones de este trabajo, tiene alta calidad sanitaria, pudiendo ofrecer una vida de anaquel de 20 días sin que se alteraran apreciablemente sus propiedades, manteniéndolo a 5°C.

En la elaboración del Yakult de S.D.D.-L.D. en el laboratorio, son importantes:

La esterilización del agua (que se utiliza para reconstitución de la mezcla en polvo y para dilución del colorante) y del jarabe de sacarosa.

La pasteurización de la mezcla de S.D.D.-L.D. reconstituida en baño a 92°C, 15 min, con agitación constante.

Esterilización del material empleado.
Limpieza del sitio de elaboración.
Limpieza del operario.

Todas estas medidas son necesarias para mantener la calidad sanitaria del producto.

Para prolongar la vida de anaquel del Yakult de S.D.D.-L.D. debe hacerse un estudio de su conservación a temperaturas por debajo de los 5°C (a la cual se realizó esta investigación), cuidando que se mantenga la cuenta viable de L.casei de 10^8 ufc/ml de producto.

CAPITULO VII.

BIBLIOGRAFIA.

- 1.-Alais Charles. 1986. "Ciencia de la Leche". Edit Continental. México.
- 2.-Amer M.A, Lammerdin A.M. 1983. Health Maintenance Benefits of Cultured Dairy Products. Cult. Dairy Prod. J. 18 (2):6
- 3.-American Public Healt Association. 1974. "Standard methods for The Examination of Dairy Products". U.S.A.
- 4.-American Society for Testing and Materials. 1977. "Manual on Sensory Testing Methods". Edit. A.S.T.M. U.S.A.
- 5.-Association of Official Analytical Chemist. 1975. "Official Methods of Analysis". Washington.
- 6.-Balboa A.L. y Cruz R.R. 1977. Preparación y Aplicación de Material audiovisual y Elaboración de Apuntes como Auxiliares en la Enseñanza Teórica del curso Desarrollo de Alimentos. Tesis. Q.F.B. UNAM. México.
- 7.-Bell R.W. y Whittier E.O. 1974. Composition of Milk Products. En Fundamentals of Dairy Chemistry. 2 ed. Edit. por Webb B.H., Johnson A.H. Avi Pub. Co.Inc. Westport.
- 8.-Benno K. 1984. "Cultivo de Microorganismos para la producción de Alimentos. Obtención. Aplicaciones e Investigación". Edit. Acribia. España.
- 9.-Branen A.L. y Keenan T.W. 1970. Identification of a Stimulant for Lactobacillus casei Produced by Streptococcus lactis. Appl. Microbiol. 20 (5):757

- 10.-Casida L.E. 1968 . "Industrial Microbiology". Edit. Wiley. U.S.A.
- 11.-Cuervo C.A. y Velazquez M.O. 1975. "Elaboración y Aplicación de Material audiovisual para la Demostración de prácticas de Laboratorio de Desarrollo de Alimentos". Tesis. Q.F.B. UNAM. México.
- 12.-Delaney R.A.M. 1981. Recent Developments in the Utilization of Whey. Cult. Dairy Prod.J. 16(2):11
- 13.-Egan H.; Kirk R.S.; Sawyer R. 1987. "Análisis Químico de Alimentos de Pearson". Edit CECSA. México.
- 14.-Gastélum M.G.; Gómez M.G.; Flores L.; Corral S. y Escobedo M. 1987. Elaboración de Productos Fermentados tipo Yogurth empleando mezclas de leche entera en polvo y Suero Dulce Desmineralizado. Tecnologia de Alimentos. ATAM. 22(5):18.
- 15.-Gerhardt P.; Murray R.G.E.; Costilow R.N.; Nester W.E.; Wood W.A.; Kney N.R.; Phillips G.B. 1981. "Manual of Methods for General Bacteriology". Edit. por American Society for Microbiology. U.S.A.
- 16.-Giono C.S. y Castro E.G. 1989. "Memorias: II Seminario. Situación y Perspectivas de las colecciones Microbianas en México". Depto. Microbiología. ENCB. IPN.
- 17.-Gordon W.G. y Kalan E.B. 1974. Proteins of Milk. En Fundamentals of Dairy Chemistry. 2 ed. Edit. por Webb B.H., Johnson A.H. Avi Pub. Co Inc. Westport.
- 18.-Gushchina I.M; Nikulina A. 1979. Technology of the manufacture of sour Whey Beverage Prokhlada. En Dairy Science Abstracs. 41:7507.

- 19.-Harper W.J. 1976. General Processes for Manufactured Products. En Dairy Technology and Engineering. Edit. Avi Pub. Co.Inc. Westport.
- 20.-Harrigan H.F.; Mc. Cance M.E. 1966. "Laboratory Methods in Microbiology". Edit. Academic Press. United Kindom.
- 21.-Hedrick et al. 1981. Dairy Products Industry in 2006. J.Dairy Sci. 64:963.
- 22.-Hernández Sánchez H. y Kosikowski F.V. 1986. Elaboración de bebidas tipo Kefir empleando mezclas de Suero Dulce Desmineralizado". Tecnologia de Alimentos. ATAM. 21(5):9.
- 23.-Holsinger V.H.; Posati L.P.; De Vilbiss E.D. 1975. Whey Beverages: A review. J.Dairy Sci. 57:849.
- 24.- Jayne-Williams D.J. 1975. Miniaturized Methods for the Characterization of Bacterial Isolates. J.appl.Bact. 38:305-309.
- 25.-Jayne-Williams D.J. 1976. The Application of Miniaturized Methods for the Characterization of Various Organims Isolated from the Animal Gut. J.appl.Bact. 40:189-200.
- 26.-Jelen P.; Currie R. y Kadis W. 1987. Compositional Analysis of Commercial Whey Drinks. J.Dairy Sci. 70:892.
- 27.-Klaenhammer T.R. 1982. Microbiological Considerations in Selection and prepatration of Lactobacillus Strains for Use as Dietary Adjuncts. J.Dairy Sci. 65:1339.
- 28.-Kilara A. y Shahani K.M. 1978. Lactic Fermentations of Dairy Foods and their Biological Significance. J.Dairy Sci. 61:1793.

- 29.-Kosikowski F.V. 1979. Whey Utilization and Whey Products. J.Dairy Sci. 62:1149.
- 30.-Kosikowski F.V. y Wzorek W. 1977. Whey Wine from Concentrates of Reconstituted Acid Whey Powder. J.Dairy Sci. 60:1982.
- 31.-Kramer A. 1960. A rapid Method for determining Significance of Differences from Rank Sums. Food Technol. 14(11):576.
- 32.-Lang F. y Lang A. 1979. Whey for the Production of Soft Drinks and Alcoholic Beverages. The Milk Industry. 81(11):30.
- 33.-Mann E.J. 1985. Lactic beverages part 2. Dairy Ind.Int. 50(3):15.
- 34.-Mann E.J. 1988. Whey Utilization part 2. Dairy Ind.Int. 53(1):6.
- 35.-Manus L.J. 1979. Liquid Cultured Dairy Products. Cult.Dairy Prod.J. 14(1):9.
- 36.-Marhounhova E.; Mergl M. 1981. Flavoured Whey Beverages. D.S.A. 1981. 43:5028.
- 37.-Marth EH. 1974. Fermentations. En Fundamentals of Dairy Chemistry. 2 ed. Edit. por Webb B.H., Johnson A.H. Avi Pub.Co.Inc. Westport.
- 38.-Marth EH. 1970. Fermentations Products from Whey. En By-Products from Milk. 2a ed. Edit. por Webb B.H. y Whittier E.O. Avi Pub.Co.Inc. Westport

- 39.-Nahaisi M.H y Robinson R.K. 1985. Acidophilus drinks: The potential for developing Countries. Dairy Ind. Int. 50 (12):16.
- 40.-Nickerson T.A.; Vujicic I.P. y Lin Y. 1976. Colorimetric Estimation of Lactose and its Hidrolytic Products. J.Dairy Sci. 59:386
- 41.-Nieto F.J. 1975. Sueros de quesería I. Industrias Lácteas. 24(5):37
- 42.-Nieto F.J. 1975. Sueros de quesería II. Industrias Lácteas. 24(6):22
- 43.-Nijpels H.H. 1981. Reemplazo de Leche descremada y Azúcar en el Helado, por Suero parcialmente hidrolizado y desmineralizado. Industrias Lácteas. 30(1):30.
- 44.-Peppler y Pepppler. 1979. "Microbial Technology". Vol.I. Edit. Academic Press. London.
- 45.-Pereda A.A.L. 1989. "Identificación de Bacterias Lácticas de Interés Industrial, mediante Micrométodos y comparación de diferentes soportes para su liofilización". Tesis. Q.B.P. IPN. México.
- 46.-Ramos Córdova M. 1976. "Manual de métodos de Análisis de Leche y Laticinios".
- 47.-Ranganna S. 1986. "Handbook of Analysis and Quality control for Fruit and Vegetable fruits". Edit. Tata. Mc.Graw Hill. Publishing Co. Ltd. India.
- 48.-Rosenstein E. 1989. "Diccionario de Especialidades para la Industria Alimentaria. Materias primas, Maquinaria,

Control de Calidad y Empaques". Edit. P.L.M., S.A. de C.V. México.

- 49.-Sandine W.E. 1977. New Techniques in Handling Lactic Cultures to Enhance their Performance. J.Dairy Sci. 60:822.
- 50.-Sandine W.E. 1979. Roles of Lactobacillus in the Intestinal Tract. J.Food Prot. 42(3):259.
- 51.-Shanani K.M. y Chandan R. 1979. Nutritional and Healthful Aspects of Cultured and Culture-containing Dairy Foods. J.Dairy Sci. 62:1685.
- 52.-Solorza F.J. 1987. "Obtención de una bebida Fermentada tipo Yogurt a partir de un concentrado Lácteo obtenido por Ultrafiltración". Tesis Maestría en Ciencias. ENCB. IPN.
- 53.-Speck M.L. 1972. Control of Food-Borne Pathogens by Starter Cultures. J.Dairy Sci. 55:1019.
- 54.-Speck M.L. 1976. Interactions among Lactobacilli and Man. J.Dairy Sci. 59:338.
- 55.-Tamime A.Y. y Robinson R.K. 1988. Fermented milks and their future trends. Part II. Technological aspects. J.Dairy Res. 55:281.
- 56.-Watanabe K.; Takesue S.; Jin-Nai K. y Yoshikawa T. 1970. Bacteriophage active against the Lactic Acid Beverage-Producing Bacterium Lactobacillus casei. Appl.Microbiol. 20(3):409.
- 57.-Webb B.H.y Johnson A.H. Lactose. En Fundamentals of Dairy Chemistry.2 ed. Edit. por Webb B.H., Johnson A.H. Avi Pub. Co.Inc. Westport.

- 58.-Webb B.H. 1970. The Byproducts of Milk. En By-Products from Milk. 2a ed. Edit. por Webb B.H. y Whittier E.O. Avi Pub.Co.Inc. Westport.
- 59.-Winslow. 1974. "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology". 8a.ed. Edit. Williams and Wilkins Co. Baltimore.
- 60.-Wong N.P.; La Croix D.E.; Mc. Donough F.E. 1978. Minerals in Whey and Whey Fractions . J.Dairy Sci. 61:1700.
- 61.-Yakult Honsha Co., Ltd. Yakult-Fermented milk Drink to Promote Health. Yakult Honsha Co., Ltd., 1-19 Higashi-Shinbashi 1-Chome, Minato-Ku, Tokyo, 105, Japan.

A N E X O S .

Anexo 1. Formato de evaluación sensorial.

NOMBRE _____	FECHA _____
PRODUCTO A EVALUAR _____	
I N S T R U C C I O N E S	
A continuación se presentan 4 muestras: * \$ & ^	
a) Ordénelas de acuerdo a su preferencia en sabor, considerando el valor de (1) para la muestra de más agrado y el valor de (4) para la muestra de menor agrado.	
b) Evite dar una misma calificación para muestras diferentes	
c) Utilice un poco de agua para enjuagarse la boca antes y después de la degustación.	
d) No emita ningún comentario respecto a la muestra para evitar influenciar a otros jueces.	
e) Agradecemos cualquier comentario respecto a la calificación general de las muestras.	
M U E S T R A S	
* \$ & ^	
CALIFICACION	_____
COMENTARIOS	_____

OPYOSET

Tesis en 24 horas

LIBROS, FOLLETOS Y MECANOGRAFIA EN IBM
MAQUILA EN OFFSET, MASTERS
CALIDAD, CUMPLIMIENTO Y PRECIO

Agustín Quijano Pérez

Cuba 99 Desp. 22
México, D. F. 06010

Tel. 518-4038