



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN**

**ELABORACIÓN DE UN YOGURT BATIDO SIMBIÓTICO,
UTILIZANDO PREBIÓTICOS NATURALES (INULINA),
SINTÉTICOS (POLIDEXTROSA) Y MEZCLA
(NATURAL+SINTÉTICO)**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

INGENIERA EN ALIMENTOS

P R E S E N T A N:

DORANTES ALVARADO TANNIA

PARRALES VARGAS DULCE

**ASESOR: PhD SARA ESTHER VALDÉS MARTÍNEZ
COASESOR: M. en C. MARÍA GUADALUPE AMAYA LEÓN**

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

U.N.A.M.
ASUNTO: VOTO APROBATORIO

M. en C. JORGE ALFREDO CUELLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

ATN: M. EN A. ISMAEL HERNÁNDEZ MAURICIO
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos a comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

Elaboración de un yogurt batido simbiótico, utilizando prebióticos: naturales (inulina), sintéticos (polidextrosa) y mezcla (natural + sintético)

Que presenta la pasante: Tannia Dorantes Alvarado

Con número de cuenta: 304061264 para obtener el Título de: Ingeniera en Alimentos

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 04 de Junio de 2014.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dra. Sara Esther Valdés Martínez	
VOCAL	I.B.Q. Saturnino Maya Ramírez	
SECRETARIO	Dr. Enrique Martínez Manrique	
1er. SUPLENTE	I.A. Alberto Solís Díaz	
2do. SUPLENTE	I.A. Zaira Berenice Guadarrama Álvarez	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

HMI/lac



**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES**

U. N. A. M.
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
ASUNTO: VOTO APROBATORIO

**M. en C. JORGE ALFREDO CUELLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE**

**ATN: M. EN A. ISMAEL HERNÁNDEZ MAURICIO
Jefe del Departamento de Exámenes Profesionales de la FES Cuautitlán.**

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos a comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

Elaboración de un yogurt batido simbiótico, utilizando prebióticos: naturales (Inulina), sintéticos (polidextrosa) y mezcla (natural + sintético)

Que presenta la pasante: Dulce Parrales Vargas
Con número de cuenta: 304032547 para obtener el Título de: Ingeniera en Alimentos

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 04 de junio de 2014.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dra. Sara Esther Valdés Martínez	
VOCAL	I.B.Q. Saturnino Maya Ramírez	
SECRETARIO	Dr. Enrique Martínez Manrique	
1er. SUPLENTE	LA. Alberto Solís Díaz	
2do. SUPLENTE	LA. Zaira Berenice Guadarrama Álvarez	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

HMI/sac

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, agradecemos a la Universidad Nacional Autónoma de México, por habernos dado cobijo, siendo el lugar donde conocimos a personas maravillosas que guiaron nuestro camino y en donde adquirimos infinidad de experiencias y lecciones, que contribuyeron en nuestra formación académica y humana.

A nuestra directora de tesis: Dra. Sara Esther Valdés Martínez, quien siempre se encontró dispuesta a ayudarnos y nos abrió las puertas de su laboratorio, ofreciéndonos no solo conocimientos académicos, sino también su tiempo, dedicación, entusiasmo, ética profesional, honestidad y confianza. Agradecemos sus enseñanzas, no solo en el ámbito académico, sino también en cosas de la vida cotidiana.

A nuestra co-asesora: M. en C. María Guadalupe Amaya León, por su paciencia, apoyo y confianza en nosotros y en el proyecto. Gracias por sus consejos.

A nuestros sinodales: IBQ. Saturnino Maya Ramírez, Dr. Enrique Martínez Manrique, I.A. Alberto Solís Díaz, I.A. Zaira Berenice Guadarrama Álvarez, por sus valiosas sugerencias. Gracias por todo el tiempo invertido en la revisión de esta tesis.

A la Dra. Laura Patricia Martínez Padilla, por abrirnos las puertas de su laboratorio LAPRYFAL, para lograr parte de este proyecto. Gracias por su disposición y ayuda desinteresada.

Al Dr. Roberto Cervantes Olivares, de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia UNAM, por la aportación a este proyecto.

A las I.A. Georgina Centeno Gadea y Yenifer Dayan Cortes Ávila, por la valiosa amistad y colaboración tanto en materiales como en conocimientos.

A la Dra. María Eugenia Ramírez Ortiz, por su disposición y generosidad, por estar dispuesta siempre a ayudar.

A la I.A. Ángeles Ruiz Ortiz, por su gran ayuda, valioso apoyo, consejos y horas de espera más amenas. Gracias por tenernos confianza, escucharnos y estar presente a lo largo de este proceso tan importante. Apreciamos y valoramos mucho lo que has hecho por nosotras.

Y a Sergio García, por su apoyo y ayuda en las labores diarias. Muchas gracias por estar siempre al pendiente y contagiarnos con la buena vibra que te caracteriza.

DEDICATORIAS

A mis papás por estar siempre presentes y nunca dejarme sola, ustedes son parte muy importante en la realización de este sueño. Gracias por todo, sin su ejemplo, enseñanzas y ayuda, no lo hubiera conseguido.

A mis hermanas, por creer en mí y estar conmigo aún en los momentos difíciles, animándome siempre a continuar y a no darme por vencida.

A mi abue, que aunque ya no está con nosotros, marcó mi vida con su ejemplo y ganas de luchar.

A Dulce, por compartir conmigo esta experiencia y ser para mí un gran apoyo. Gracias por nunca darte por vencida y confiar en mí.

A Cianny, Erika, Gina y Alberto, por su amistad y complicidad. Les agradezco por permitirme formar parte de sus vidas y compartir tantas historias y aventuras juntos.

Pero sobre todo a Dios por darme la fuerza, claridad y paciencia que me ayudaron a perseverar en el cumplimiento de esta meta.

Tannia Dorantes

DEDICATORIAS

A mis padres: Mirna Vargas y Maximino Parrales, por haberme dado vida, amor, cariño y comprensión. Les dedico todo mi esfuerzo, en reconocimiento a todo el sacrificio que han hecho por mí. Les estaré infinitamente agradecida por todas enseñanzas, consejos y apoyo, que me han brindado durante toda mi vida. Los Amo, son los mejores papás del mundo.

A mis hermanos: Raúl y Marlene, por todo el cariño y apoyo que siempre me han brindado, por estar siempre pendiente de mí y por ser mi inspiración de crecer. Gracias por darme un abrazo y animarme en los momentos tristes.

A mis abuelitos: Dionisia Sandoval y Felipe Vargas, por darme la fuerza para continuar mis proyectos, por el gran ejemplo de vida que me han dado, y su fuerza para superar los obstáculos. Abuelito, te quiero mucho; abuelita, te llevo en mi corazón.

A mi tía, Margarita Vargas, por su apoyo incondicional, generosidad e inspiración. Gracias por estar siempre dispuesta a ayudar. 4's

A mi compañera de tesis: Tannia Dorantes, gracias por cumplir este sueño juntas, por la honestidad, apoyo y confianza. Vamos por más equipo.

A esas personitas especiales, que siempre han estado conmigo, en las buenas y en las malas, sin duda los mejores tres mosqueteros: Marisol Gutiérrez y Carlos Pastrana. Gracias por apoyarme en este proceso.

A Gina Centeno, Yenifer Cortes, Luz Rojas, Ricardo Real, Said Rabago, Alberto Zuñiga, Yazmín López, Claudia García, Idalia Gutiérrez, Patricia Galván, Dalia Alegría, Mariela López, Giovanni Domínguez y Karen Shantal, por ser esa parte divertida de la Uni, por sus palabras en esos momentos difícil y por las risas en los mejores momentos.

Y sin especialmente a Dios, por darme los dones para cumplir con este proyecto y por todas las bendiciones recibidas.

Dulce Parrales

*“Todo niño viene al mundo con cierto sentido del amor,
pero depende de los padres, de los amigos,
que este amor salve o condene.”*

Graham Greene

INDICE DE CONTENIDO

	PÁGINA
INDICE DE CONTENIDO	VII
INDICE DE TABLAS	X
INDICE DE FIGURAS	XI
RESUMEN	XII
INTRODUCCIÓN	1
Objetivos	2
CAPITULO 1 ANTECEDENTES	
1.1 Definición de alimento	3
1.2 Alimentos de uso específico para la salud	3
1.2.1 Clasificación de alimentos para la salud	3
1.2.2 Alimentos funcionales	4
1.2.2.1 Clasificación de alimentos funcionales (AF)	4
1.2.3 Simbiótico	5
1.2.3.1 Probiótico	6
1.2.3.2 Prebiótico	7
1.3 Yogurt	7
1.3.1 Origen del yogurt	7
1.4 Composición del yogurt	8
1.5 Clasificación del yogurt	8
1.6 Evaluación sensorial	8
1.6.1 Tipos de prueba en la evaluación sensorial	9
1.7 Evaluación de la viscosidad	10
CAPITULO 2 MATERIAS PRIMAS	
2.1 Leche	11
2.2 Leche en polvo	11
2.3 Fermento o starter	11
2.3.1 Bacterias ácido lácticas	12
2.3.2 Función de los probióticos	13
2.3.2.1 Degradación de la lactosa	13
2.3.2.2 Reducción de diarreas por rotavirus	13
2.3.2.3 Enfermedades en el colon	13
2.3.2.4 Cáncer de vejiga	14
2.3.2.5 Reducción del colesterol	14
2.3.2.6 Inhibición de los microorganismos patógenos	15
2.3.2.7 Mejora la salud mental (depresión y ansiedad)	15
2.3.3 <i>Streptococcus thermophilus</i>	16
2.3.4 <i>Lactobacillus delbruekii ssp. Bulgaricus</i>	16
2.3.5 <i>Lactobacillus lactis</i>	17
2.4.1 Inulina	18
2.4.1.1 Extracción de la inulina	18
2.4.1.1.1 Método 1	18
2.4.1.1.2 Método 2	19
2.4.1.1.3 Método 3	19

2.4.1.1.4 Método 4	19
2.4.1.2 Función de la inulina	20
2.4.2 Polidextrosa	20
2.4.2.1 Obtención de la polidextrosa	20
2.4.2.2 Función de la polidextrosa	20
2.5 Edulcorante	21
2.5.1 Clasificación de los edulcorantes	21
2.5.2 <i>Stevia rebaudiana</i>	21
2.5.2.1 Obtención del <i>Stevia</i>	22
2.5.2.2 Función de la <i>Stevia</i>	23
2.5.2.2.1 Disminución del apetito	23
2.5.2.2.2 <i>Diabetes mellitus</i>	23
CAPITULO 3 METODOLOGÍA	
3.1 Metodología de la elaboración del yogurt	24
3.2 Preparación de la muestra	24
3.3 Evaluación sensorial	25
3.4 Evaluación de la viscosidad	27
3.5 Evaluación de la propiedades físico-químicas	27
3.6 Calidad microbiológica	27
3.7 Monitoreo de la fermentación	28
3.7 Evaluación de la vida de anaquel	29
3.9 Inhibición	29
3.9.1 Simulación gastrointestinal (<i>in-vitro</i>)	29
3.9.2 Almacenamiento comercial	30
3.9.3 Identificación de microorganismos	30
3.10 Aceptación del yogurt simbiótico por el consumidor	30
CAPITULO 4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
4.1 Evaluación sensorial	32
4.2 Evaluación de la viscosidad	37
4.3 Evaluación de las propiedades físico-químicas	41
4.3.1 pH	41
4.3.2 Acidez	41
4.3.3 Humedad	42
4.3.4 Proteína	42
4.3.5 Grasa	42
4.3.6 Carbohidratos	43
4.3.7 Fibra dietética	44
4.3.8 Cenizas	45
4.3.9 Sólidos no grasos lácteos	45
4.4 AQP	46
4.5 Calidad microbiológica	47
4.6 Monitoreo de la fermentación	48
4.7 Evaluación de la vida de anaquel	50
4.8 Inhibición <i>Escherichia coli</i>	54

4.9 Tinción de Gram	56
4.10 Costos	57
4.11 Selección del yogurt con base en sus propiedades	59
4.12 Aceptación del yogurt simbiótico seleccionado (mezcla: 40% inulina - 60% povidexrosa)	60
Conclusiones	62
Recomendaciones	64
Bibliografía citada	65
Anexo A	69
Anexo B	80

INDICE DE TABLAS

TABLA	DESCRIPCIÓN	PÁGINA
1	Descripción de los tipos de alimentos de uso específico para la salud	4
2	Clasificación de alimentos funcionales	4
2.1	Clasificación de alimentos funcionales	5
3	Tipos de prueba y su aplicación en el análisis sensorial	9
4	Características de algunas bacterias de cultivo importantes	12
5	Tipos de edulcorantes	21
6	Porcentajes de adición de prebióticos	25
7	Métodos de análisis propiedades fisicoquímicas y AQP	27
8	Pruebas para calidad microbiológica	28
9	Formulación base sin edulcorante	32
10	Resultados de la prueba sensorial para edulcorante	32
11	Formulaciones con adición de inulina	33
12	Resultados de la prueba sensorial para selección de Inulina	33
13	Formulaciones con adición de Polidextrosa	34
14	Resultados de la prueba sensorial para la selección de Polidextrosa	34
15	Formulaciones adicionada con mezcla de prebióticos	35
16	Resultados de la prueba sensorial, selección de la mezcla de prebióticos	36
17	Formulaciones seleccionadas	36
18	Viscosidad inicial y final promedio, por sistema.	40
19	Acidez	42
20	Humedad	42
21	Proteína	43
22	Grasa	43
23	Carbohidratos Directos	44
24	Carbohidratos Totales	44
25	Fibra Dietetica	44
26	Cenizas	45
27	Sólidos no grasos lácteos.	45
28	Análisis Químico Proximal	46
29	ANOVA Análisis químico proximal.	46
30	ANOVA Análisis químico proximal, con la base.	47
31	Calidad microbiológica	47
32	Costo de ingredientes según la presentación comercial.	58
33	Costos en base a materias primas por 125ml de formulación	58
34	Costos en base a servicios de producción (m.n.)	58
35	Costos de los servicios de producción por día de elaboración (m.n)	59
36	Costo del producto final en base: materias primas y servicios	59
37	Selección de muestra	59

INDICE DE FIGURAS

IMAGEN	DESCRIPCIÓN	PÁGINA
1	Simbiótico	5
2	Diagrama de flujo extracción de inulina método 1	18
3	Diagrama de flujo extracción de inulina método 2	19
4	Diagrama de flujo extracción de inulina método 3	19
5	Diagrama de flujo para la obtención de edulcorante Stevia	22
6	Diagrama de bloques para la elaboración del yogurt natural batido	24
7	Formato para selección del sistema con inulina ó polidextrosa	26
8	Formato para selección del sistema con mezcla de prebióticos	26
9	Formato de encuesta para evaluación de la aceptación del yogurt	31
10	Resultados de las ponderaciones para endulzante	33
11	Resultado de las ponderaciones para selección de Inulina	34
12	Resultado de las ponderaciones para selección de Polidextrosa	35
13	Resultado de las ponderaciones para selección de la Mezcla	36
14	Viscosidad Vs Tiempo, Polidextrosa	37
15	Viscosidad Vs Tiempo, Inulina.	38
16	Viscosidad Vs Tiempo, Mezcla.	38
17	Viscosidad Vs Tiempo, Base.	39
18	Comparativo viscosidad en función del tiempo, de todas las muestras	39
19	Cajas para Viscosidad inicial, para todos los sistemas.	40
20	Cajas para Viscosidad final, para todos los sistemas.	41
21	Crecimiento de <i>Lactobacillus</i> durante el monitoreo de la fermentación.	49
22	Cajas del crecimiento de <i>Lactobacillus</i> durante la fermentación.	49
23	Crecimiento de <i>Streptococcus</i> durante el monitoreo de la fermentación	50
24	Cajas de crecimiento de <i>Streptococcus</i> durante la fermentación.	50
25	Comportamiento del pH durante la vida de anaquel.	51
26	Vida de anaquel, viabilidad de los <i>Lactobacillus</i>	52
27	Cajas de prebioticos, para <i>Lactobacillus</i> en vida de anaquel	52
28	Vida de anaquel, viabilidad de los <i>Streptococcus</i> .	53
29	Cajas de prebióticos, para <i>Streptococcus</i> de vida de anaquel	53
30	Comparativo de <i>Streptococcus</i> y <i>Lactobacillus</i> , para vida de anaquel.	55
31	Decrecimiento de <i>Escherichia coli</i> .	55
32	Inhibición de <i>E. coli</i> .	55
33	Cajas de Inhibición	56
34	Tinción de Gram <i>Lactobacillus</i>	57
35	Tinción de Gram <i>Streptococcus</i>	57
36	Tinción de Gram <i>E.coli</i>	57
37	Sexo de los consumidores	60
38	Edad de los consumidores	60
39	Consumo de yogurt natural.	61
40	Aceptación del yogurt con mezcla de prebióticos.	61

RESUMEN

A nivel mundial existen productos dirigidos a la salud, el yogurt es el mejor ejemplo de un alimento suplementado con prebióticos empleando una baja temperatura para preservar la viabilidad de los probióticos. Los consumidores de Asia Pacífico y Latinoamérica, son quienes están en primer lugar en el consumo de “Bebidas fermentadas que contienen bacterias provechosas (yogurt, yakult, postres).

Para la elaboración de un yogurt batido natural simbiótico, se utilizó leche entera pasteurizada, leche entera en polvo, stevia, cultivo bacteriano liofilizado de adición directa (*Lactobacillus delbrueckii spp bulgaricus*, *Lactobacillus lactis* y *Streptococcus thermophilus*) marca Danisco y se utilizaron prebióticos de diferente origen: povidexrosa (sintético), inulina (natural)

Se realizaron doce formulaciones, una base, tres de inulina (1g, 2.5g, 4g), tres de povidexrosa (2.5g, 4g, 8g) y cinco mezclas Inulina/Povidexrosa, utilizando 4g como el 100% (70/30, 60/40 50/50, 40/60, 30/70).

Las once formulaciones, fueron evaluadas sensorialmente según el grupo de prebiótico, en una prueba por ordenación aplicada a 20 jueces no entrenados, obteniendo que las formulaciones con 2.5g de inulina, 4g de povidexrosa y mezcla 60%inulina-40%povidexrosa, tienen mayor aceptación.

A las tres muestras con mayor aceptación sensorial, se les realizó un AQP (grasa, proteína, humedad, cenizas, fibra dietaria, carbohidratos), pruebas físicas (acidez titulable y pH) y pruebas microbiológicas (Coliformes Totales, *Salmonella spp*, Mesofilos aerobios, *Staphylococcus aureus*), para garantizar que cumpliera con la normatividad mexicana (NOM-243-SSA1-2010 y NOM-185-SSA1-2002). Encontrándose que todas las muestras cumplen con las especificaciones marcadas.

También, se les determinó su viscosidad e índice de consistencia, obteniendo que el sistema adicionado con povidexrosa, es el que presenta mayor viscosidad (0.9597Pa.s) y el de inulina menor (0.6821 Pa.s), de manera inversa para el índice de consistencia (0.9432 y 0.2375 Pa·sⁿ respectivamente).

Se monitoreó de la fermentación, haciendo siembras en placa cada hora en agar MRS y M17, obteniendo que la inulina se aprovecha mejor en esta etapa. El seguimiento de la vida de anaquel, de las mismas, las cuales se monitorearon por 32 días; durante este tiempo las muestras se mantuvieron en refrigeración (5°C), obteniendo un conteo mínimo de bacterias ácido lácticas de 10⁸ UFC/mL y un máximo de 10¹⁰ UFC/mL y las muestras no presentaron cambios en sus propiedades físicas.

También, se realizó un retro microbiano, contaminando las muestras con 10⁸ UFC/mL de *Escherichiacoli*, aislada de un caso clínico, realizando siembras en placa cada 2 días, en agar bilis rojo-violeta, para determinar el tiempo de inhibición, obteniendo que la muestra con mezcla de prebióticos logro inhibiera en 12 días, mientras que inulina y povidexrosa lo logran hasta el día 14.

Finalmente se realizó una prueba de aceptación comercial, en la que se obtuvo que el 64% de los panelistas aprobaron el sistema con mezcla de prebióticos (60% inulina-40% povidexrosa).

INTRODUCCIÓN

El ritmo de vida actual ha provocado un cambio en los hábitos alimenticios y del tipo de productos que se consume; esto ha incrementado en el hombre, la presencia de trastornos digestivos en la población como: digestión lenta, estreñimiento, inflamación, dolor estomacal y gases. Al existir desajustes en la digestión muchos de los nutrientes de los alimentos se pierden y no son aprovechados por el cuerpo. Además, el metabolismo al ser más lento, permite la asimilación de mayores cantidades de grasas. (1)

En la actualidad se han desarrollado nuevos conceptos de nutrición, lo que ha conducido a la elaboración de nuevos alimentos, entre los que destacan los alimentos funcionales (AF), que son todos aquellos que algunos de sus componentes afectan funciones del organismo de manera específica y positiva, promoviendo un efecto fisiológico o psicológico más allá de su valor nutritivo tradicional. Dicho efecto puede ser contribuir al mantenimiento de la salud y bienestar, a la disminución del riesgo de enfermar, o ambas cosas (2).

La transformación de un alimento en «funcional» puede realizarse:

- Eliminando algún componente nocivo (alérgeno, grasa saturada)
- Fortificándolo con sustancias benéficas (cereales con minerales y vitaminas, pan con fibra, leche con calcio)
- Adicionando un elemento no presente de forma habitual en el mismo (aceite con antioxidantes)
- Sustituyendo un compuesto perjudicial por otro deseable (grasas por inulina, leche descremada con ácidos grasos omega 3)
- Optimizando la biodisponibilidad/estabilidad. (3).

Un ejemplo de alimento funcional es el yogurt simbiótico, el cual ya contiene las bacterias ácido lácticas, que son los probióticos y una fibra dietética adicionada, conocida como prebióticos.

Está comprobado que, al combinar un probiótico con un prebiótico, estos actúan de forma sinérgica dando origen a los alimentos simbióticos que se encuentran dentro de los alimentos funcionales, éstos son capaces de regular la función intestinal, tanto en adultos como en niños, siempre y cuando se consuman regularmente y en las dosis apropiadas para cada organismo. Sin embargo, se debe desterrar la idea de que este tipo de alimentos van a modificar por “arte de magia” todos los errores dietéticos cometidos, tanto por exceso como por defecto, haciendo especial hincapié en la necesidad de combinarlos con una dieta equilibrada, variada y moderada. (4).

El interés en el desarrollo de productos lácteos fermentados con propiedades simbióticas por excelencia ha crecido en los últimos años, siendo el yogurt simbiótico un alimento funcional que combina lactobacilos vivos y elementos estimulantes de la reproducción de las bacterias benéficas del organismo humano, especialmente en el colon. Para formular un producto simbiótico es necesario determinar la compatibilidad de manera que la cepa probiótica pueda utilizar el prebiótico como sustrato y favorecer su crecimiento selectivo.

OBJETIVOS

Con base en lo anterior los objetivos del presente trabajo son:

Objetivo General

Elaborar yogurts con *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus lactis* y *Streptococcus thermophilus* como probióticos y tres prebióticos distintos (inulina, polidextrosa y mezcla) con la finalidad de determinar cuál presenta mayor simbiosis, así como las mejores características físico-químicas, microbiológicas, sensoriales y de viscosidad.

Objetivos Particulares

1. Elaborar yogurts variando el prebiótico adicionado y su concentración (inulina, polidextrosa o mezcla) para estandarizar las tres formulaciones que presenten las mejores características sensoriales (una por cada tipo de prebiótico).
2. Determinar el análisis químico proximal, la viscosidad y la calidad microbiológica de las tres diferentes formulaciones de yogurts con base en la legislación vigente (NOM-185-SSA1-2002).
3. Evaluar los tres diferentes yogurts por medio de cultivos y conteos microbiológicos, para determinar cuál presenta mayor simbiosis.
4. Evaluar el efecto inhibitorio que ejercen los cultivos lácticos, presentes en yogurt enriquecido con diferentes prebióticos, sobre concentraciones conocidas de *E.coli*.
5. Evaluar el nivel de aceptación del yogurt con jueces consumidores no entrenados, por medio de una escala hedónica verbal de siete puntos.

CAPITULO I ANTECEDENTES

1.1 DEFINICIÓN DE ALIMENTO

Un alimento es la materia prima que utiliza el organismo para extraer nutrientes y energía, ya sea de origen animal o vegetal (5); proporciona aquellas estructuras químicas (nutrientes) que son necesarias para que el organismo vivo se desarrolle, de modo adecuado, todas sus actividades y funciones biológicas. De esta manera, tendrá la posibilidad de mantenerse dentro de un estado de salud conveniente. (6)

Los nutrientes se clasifican según su composición química en orgánicos e inorgánicos. Entre los orgánicos, se incluyen los carbohidratos, las grasas, las proteínas y las vitaminas. Los comúnmente llamados minerales constituyen los nutrientes inorgánicos. (5)

Todos los alimentos son saludables cuando forman parte de una dieta equilibrada, siempre y cuando cumplan con los requisitos básicos de seguridad y con las excepciones de alimentos que pueden presentar alérgenos para personas con alergias específicas o intolerancia a algún componente específico (lactosa o gluten). (7)

1.2 ALIMENTOS DE USO ESPECÍFICO PARA LA SALUD

Un alimento de uso específico para la salud debe considerar a todos aquellos productos alimenticios que ofrecen algún componente con una actividad positivamente favorable en el ámbito de la prevención de enfermedades crónicas. Es decir, ésta denominación corresponde a los alimentos en cuya composición intervienen sustancias que, una vez consumidas, desarrollan una actividad preventiva frente a ciertas enfermedades. (8)

1.2.1 CLASIFICACIÓN DE ALIMENTOS PARA LA SALUD

En la segunda mitad del siglo XX surgieron los conceptos Alimentos funcionales y nutraceuticos, que pertenecen a la categoría de los alimentos de uso específico para la salud. Existe en la población una importante confusión de conceptos. No se distingue con claridad entre funcionales, nutraceuticos, dietéticos y complementos. Se emplean términos como <<alimentos fortificados>> y <<alimentos enriquecidos>> para la descripción de categorías, cuando se trata más bien de conceptos que definen características de su elaboración.(7)

El término nutraceutico combina la idea de un nutriente con la de producto farmacéutico con la intención de denominar genéricamente a los productos alimentarios que poseen cierta capacidad curativa. Hoy en día el nutraceutico no es un término regulado como tal y se utiliza indistintamente para denominar cualquier tipo de alimento de uso específico para la salud. Por ello no es tratado como una categoría individual. (9).

En la Tabla 1, se muestran los tipos de alimentos reconocidos en la normatividad legal internacional que describen las características de las categorías de productos alimentarios con propiedades benéficas para la salud. El etiquetado y la comercialización de estos tres tipos de alimentos están regulados por normas específicas.(7)

Tabla 1. Descripción de los tipos de alimentos de uso específico para la salud (9)

Complementos Alimenticios	Productos alimenticios cuyo fin es complementar la dieta normal y consistentes en fuentes concentradas de nutrientes o de otras sustancias que tengan un efecto nutricional o fisiológico, en forma simple o combinada, comercializados en forma dosificada, es decir, cápsulas, pastillas, tabletas, píldoras y otras formas similares que deben tomarse en pequeñas cantidades unitarias.
Dietéticos	Son productos destinados a una alimentación especial para determinadas situaciones fisiológicas y para usos médicos.
Alimentos funcionales	Alimentos a los que se han adicionado uno o varios ingredientes bioactivos, no contenidos de forma natural en el alimento en cuestión (o contenidos en muy baja cantidad), que poseen una determinada actividad biológica capaz de afectar de modo positivo al desarrollo de los mecanismos biológicos corporales relacionados con ciertas enfermedades, fundamentalmente cardiovasculares, inflamatorias, neurodegenerativas y tumorales.

1.2.2 ALIMENTOS FUNCIONALES

Como anteriormente se definió un Alimento Funcional

“Un alimento puede considerarse funcional si se demuestra que, además de sus efectos nutritivos, afecta beneficiosamente a una o más funciones del organismo humano de modo que mejora el estado de salud y reduce el riesgo de contraer enfermedad”. (10)

Los alimentos funcionales son el tipo de alimentos de uso específico para la salud con mayor importancia en la actualidad.

1.2.2.1 CLASIFICACIÓN DE ALIMENTOS FUNCIONALES (AF)

Lo más habitual es que los AF contengan un único tipo de ingredientes bioactivos y de ahí que se denominen según sea dicho ingrediente, pudiéndose establecer la siguiente clasificación (ver tabla 2) (11).

Tabla 2. Clasificación de alimentos funcionales (11)

TIPO DE ALIMENTO	CONTIENE
Alimentos probióticos	Microorganismos viables que ejercen efectos positivos para la salud. Generalmente son mezclas de <i>lactobacillus</i> y Bifidobacterias.
Alimentos prebióticos o con fibra	Carbohidratos no digeribles que ejercen efectos de estimulación positiva de determinados grupos de bacterias del colon.
Alimentos simbióticos	Probióticos y prebióticos en una combinación sinérgica.
Alimentos funcionales con proteína	Proteínas lácteas o de soya entre las que se encuentran. Inmunoglobulinas, lactoferrina, lactoperoxidasa.

Tabla 2.1. Clasificación de alimentos funcionales. (11)

TIPO DE ALIMENTO	CONTIENE
Alimentos funcionales con péptidos	Algunas secuencias de proteínas poseen efectos particulares cuando son liberadas mediante hidrólisis. Los fragmentos obtenidos se denominan péptidos bioactivos cuando se ha identificado alguna actividad biológica. El efecto más conocido de los péptidos bioactivos es su carácter antihipersensitivo.
Alimentos con lípidos funcionales	Contienen lípidos que reducen el riesgo cardiovascular por la regulación de perfil lipídico sanguíneo y la reducción de los niveles de colesterol (omega- 3, esteroles, glicéridos modificados, ácidos grasos de cadena corta, etc.)
Alimentos con antioxidantes	Contienen generalmente compuestos fenólicos de origen natural con efectos diversos saludables basados en el mecanismo de neutralización de radicales libres.

1.2.3 SIMBIÓTICO

Simbiótico es el término ideado para designar el tratamiento combinado con bacterias (bioactivas y específicas) y prebióticos (específicos) con habilidad para estimular el crecimiento de cierta bacteria endógena y promover benéficamente la salud por acción sinérgica.

Una condición para tales efectos, es que las bacterias usadas tengan una documentada habilidad para metabolizar simultáneamente los prebióticos suplementarios.

En la figura 1, se muestra el proceso de modificación de flora intestinal, al consumir alimentos simbióticos.

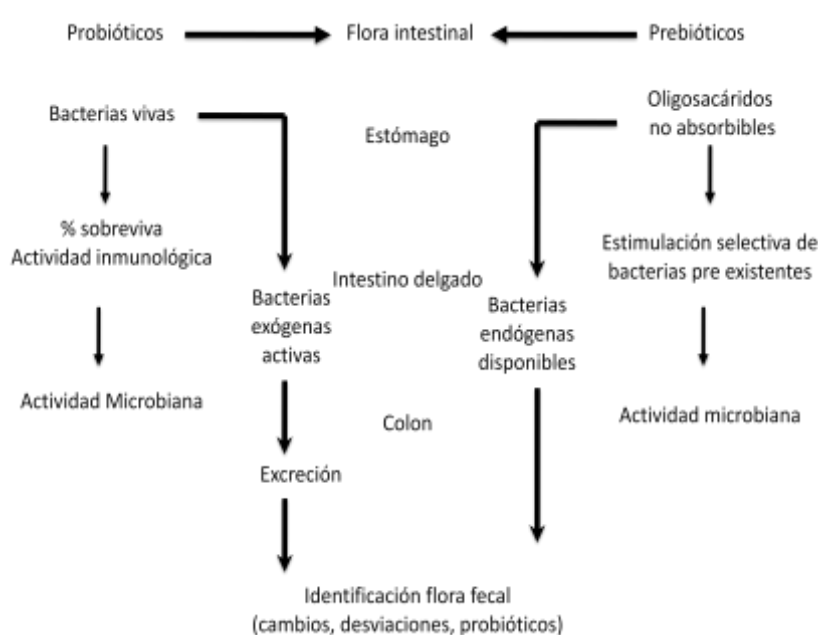


Figura 1. Simbiótico (12)

En los últimos años se están ofertando comercialmente combinaciones de probióticos y prebióticos, con diferentes tipos de formulaciones, por ejemplo:

- Probióticos con una simple cepa
- Probióticos multicepas
- Simbióticos con cepa única / fibra única
- Simbióticos con cepa única / multifibra
- Simbióticos multicepa / fibra única
- Simbióticos multicepa / multifibra
- Reemplazo total de flora a partir de flora de individuos sanos.(12)

1.2.3.1 PROBIÓTICO

Según Gibson y Roberfroid definen probiótico como:

“Un microorganismo vivo que se introduce en la dieta, y que tras ser ingerido en cantidad suficiente ejerce un efecto positivo en la salud, más allá de los efectos nutricionales tradicionales”. (13)

Para que un microorganismo pueda realizar esta función de protección tiene que cumplir los postulados de Huchetson:

- Ser habitante normal del intestino
- Ser capaz de sobrevivir y metabolizar en el ambiente intestinal
- Tener un tiempo corto de reproducción
- Ser capaz de producir compuestos antimicrobianos
- Ser estable durante el proceso de producción, comercialización y distribución.
- Tener la capacidad de ejercer un efecto benéfico en el huésped
- No patógeno
- No tóxico

Las bacterias que habitan en el intestino del hombre, producen sustancias tanto benéficas como dañinas al huésped; adicionalmente, las toxinas bacterianas y los componentes celulares producidos por algunas especies de bacterias, modifican sus respuestas inmunológicas, promoviendo o inhibiendo dichas funciones. La flora benéfica protege el tracto intestinal de la proliferación o infección por bacterias patógenas, mientras que algunas cepas manifiestan patogenicidad solo cuando la resistencia del huésped se ve disminuida o sus defensas bajan.

Los Lactobacilos y bifidobacterias potencian la inmunidad, favorecen el equilibrio de la microflora colónica, incrementan la biodisponibilidad de ciertos nutrientes, mejoran el tránsito y la motilidad intestinal, estimulan la proliferación celular y permiten la elaboración de ciertos productos fermentados beneficiosos. (3)

Algunos de los microorganismos usados como probióticos humanos son los siguientes: *Lactobacillus acidophilus*, *L. plantarum*, *L. casei*, *L. casei spp. hamnosus*, *L. delbrueckii spp bulgaricus*, *L. fermentum*, *L. reuteri*, *Lactococcus lactis spp lactis*, *Lactococcus lactis spp. cremoris*, *Bifidobacterium bifidum*, *B. infantis*, *B. adolescentis*, *B. longum*, *B. breve*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, entre otros. (14)

1.2.3.2 PREBIÓTICO

Un prebiótico se define como “un ingrediente alimenticio no digerible que produce un efecto beneficioso en el hospedador al estimular el crecimiento selectivo y/o la actividad metabólica de un número limitado de bacterias en el colon” (13)

Entre los efectos de los prebióticos están la estimulación del crecimiento de las bifidobacterias, el aumento del agua y del peso de las deposiciones, el aumento de la producción de ácidos grasos de cadena corta mediante su fermentación por la microbiota, el aumento de la absorción de calcio desde el colon. (15)

Los prebióticos más consumidos son los fructooligosacáridos, galactooligosacáridos y el almidón resistente que son compuestos naturales provenientes de vegetales. También existen prebióticos sintéticos como la povidex, que es ampliamente utilizada por las empresas de alimentos.(15)

Según De la Cagigas y Blanco, para que una sustancia (o grupo de sustancias) pueda ser definida como tal debe cumplir los requisitos siguientes:

- Ser de origen vegetal.
- Formar parte de un conjunto muy heterogéneo de moléculas complejas.
- No ser digerida por las enzimas digestivas.
- Ser parcialmente fermentada por las bacterias colónicas.
- Ser osmóticamente activa. (16)

1.3 YOGURT

La NOM 181 define al yogurt como el “producto obtenido de la fermentación de leche, estandarizada o no, por medio de la acción de microorganismos *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus*, y tiene como resultado la reducción de pH”.(17)

De la fermentación del yogurt debe resultar un líquido suave y viscoso, o un gel suave y delicado, de textura firme, uniforme, sin presencia de sinéresis y con sabor característico. (18)

1.3.1 ORIGEN DEL YOGURT

El yogurt tiene presencia mundial desde hace muchos años. Al parecer se originó en Asia y se introdujo a Europa a través de Turquía y Bulgaria. Quien más contribuyó a dar a conocer este producto al mundo occidental fue Ilya Metschnikoff, premio Nobel de medicina en 1908. Metschnikoff estaba convencido de que el consumo de grandes cantidades de este tipo de leche fermentada era responsable de la longevidad de los habitantes de Bulgaria. (19)

En la actualidad, el yogurt puede adquirirse en numerosas tiendas y supermercados, existen diversas marcas, presentaciones y consistencias; los hay naturales o con fruta, para beber o batidos, y de distintos tamaños.

Dependiendo del tipo de yogurt, se acepta la presencia de agregados como frutas, azúcar y miel, así como saborizantes, colorantes y estabilizadores permitidos por la Secretaría

de Salud. Los productos con fruta agregada deben contener al menos 75 por ciento de yogurt. (19)

1.4 COMPOSICIÓN DEL YOGURT

Se compone de vitaminas (riboflavina, niacina, vitaminas B6 y B12), proteínas (son degradadas por proteasas y peptidasas, generando aminoácidos principalmente esenciales), carbohidratos (glucosa, galactosa y en menor proporción lactosa), lípidos (ácido linoléico conjugado y derivados de cadena larga de este mismo) y minerales (calcio, fósforo y magnesio). (20)

1.5 CLASIFICACIÓN DEL YOGURT

El yogurt se puede clasificar ya sea por el método de elaboración, por su sabor y por su contenido graso; entre ellos podemos encontrar los siguientes:

Elaboración:

- Yogurt aflanado: la leche pasteurizada es envasada inmediatamente después de la inoculación.
- Yogurt batido: la inoculación de la leche pasteurizada se realiza en tanques de incubación.
- Yogurt líquido: es mezclado con una mayor parte de leche líquida.

Sabor:

- Yogurt frutado: se le agregan frutas procesadas en trozos.
- Yogurt natural: solo se adicionan estabilizantes y conservadores.
- Yogurt saborizado: contiene saborizantes naturales y/o artificiales. (21)

Contenido graso:

- Yogurt > 2 % M.G
- Yogurt descremado < 0'5 % M.G
- Yogurt enriquecido > 3 % M.G

1.6 EVALUACIÓN SENSORIAL

El éxito de cualquier producto alimenticio se sustenta no solo en la calidad nutricional, sino también en sus características sensoriales, que son las que definen su aceptabilidad en el mercado (22). No existe ningún otro instrumento que pueda reproducir o reemplazar la respuesta humana; por lo tanto la evaluación sensorial es un factor esencial en cualquier estudio que involucre alimentos (23).

El análisis sensorial constituye una ciencia multidisciplinaria en la que se utilizan panelistas humanos que utilizan los sentidos de la vista, olfato, tacto y gusto para medir las características organolépticas y la aceptabilidad de los productos alimenticios. (24) Los degustadores o catadores son seleccionados para evaluar sensorialmente los alimentos, expresan su opinión de forma preferentemente numérica para cada variable estudiada, en función de un patrón ideal, según una escala, o por medio de respuestas a preguntas determinadas.

La reunión de los datos obtenidos de una evaluación sensorial con un grupo de degustadores, permite el manejo estadístico de estos valores para determinar el grado de certeza en la igualdad o diferencia de los productos comparados, así como la aceptación o rechazo del producto (25).

La evaluación sensorial se puede emplear para muy distintos objetivos entre los que se encuentran:

- Caracterización de los cambios sensoriales en los alimentos o materias primas atribuibles al proceso o variaciones naturales.
- Distinción entre lotes o proveedores de un mismo producto.
- Clasificar los productos de acuerdo a la calidad establecida.
- Establecer relaciones entre los datos objetivos y la aceptación por parte del consumidor.
- Obtener información sobre la capacidad de discriminación o aceptación de diferentes grupos sociales de consumidores frente a variaciones o nuevos tipos de productos terminados (25).

En las pruebas orientadas a las preferencias del consumidor, se debe seleccionar una muestra aleatoria numerosa, compuesta de personas representativas de la población objetivo, con el fin de obtener información sobre las actitudes o preferencias de los usuarios. En las pruebas con consumidores no se emplean panelistas entrenados ni seleccionados por su agudeza sensorial; sin embargo los panelistas deben ser usuarios del producto. Por lo general para este tipo de pruebas se entrevistan de 100 a 500 personas y las entrevistas se pueden realizar en un lugar central tal como un mercado, una escuela, un centro comercial o también en los hogares de los consumidores. (23)

1.6.1 TIPOS DE PRUEBA EN LA EVALUACIÓN SENSORIAL

Los principales tipos de prueba y su aplicación en el análisis sensorial pueden describirse, de manera resumida, como se indica en la tabla 3 (25).

Tabla 3: Tipos de prueba y su aplicación en el análisis sensorial (23).

TIPOS DE PRUEBA
<p>Pruebas de aceptación o afectividad: En éstas el panel de catadores clasifica las muestras con relación a la preferencia que sienten por ella o a su nivel de satisfacción.</p> <ul style="list-style-type: none"> ● Preferencia ● Medida del grado de satisfacción <ul style="list-style-type: none"> - Hedónicas verbales - Hedónicas gráficas
<p>Pruebas de discriminación: Son las que permiten encontrar diferencias significativas entre las muestras o entre ella y un patrón. Además deben permitir cuantificar la diferencia significativa.</p> <ul style="list-style-type: none"> ● Pareada ● Triangular ● Dúo-Trío ● Comparaciones apareadas ● Comparaciones múltiples ● Ordenación

Pruebas descriptivas: Son las que permiten describir, comparar y valorar las características de la muestra en función de categorías o patrones definidos previamente.

- Pruebas de calificación con escalas
 - No estructuradas
 - De intervalos
 - Estándar
 - Proporcionales con estima de magnitud
- Medición de atributos con respecto al tiempo
- Definición de perfiles sensoriales
- Relaciones Psico- Físicas

1.7 EVALUACIÓN DE LA VISCOSIDAD

Dentro de los atributos sensoriales de importancia que se analizaron en el yogurt está la textura que, como lo reportan Rojas *et al.* (2007), suele percibirse en términos de la viscosidad y cuya medición es muy importante, en los productos tipo yogurt, que deben presentar cierta consistencia para su aceptación, en relación con su aspecto o gusto en el paladar (26).

El conocimiento de las propiedades reológicas de los productos lácteos es esencial para el manejo del material, para el diseño de la operación del equipo de proceso utilizado en la industria y también debido a la relación que tienen con las propiedades sensoriales.

La viscosidad está definida como, la resistencia que una sustancia presenta para fluir libremente (27). En el caso de un yogurt batido, el producto final debe contar con una textura homogénea y bastante viscosa, de tal manera que cuando se vierta lentamente se observe una película elástica cuando se rompe. En un yogurt de buena calidad la sinéresis que, se manifiesta cuando el gel se rompe formando una mezcla heterogénea de coágulos y suero, es indeseable y no debe presentarse (28).

Los factores como composición de la leche, acidez, sólidos totales, tipo y tiempo de batido, temperatura de incubación, tipo de cultivo, tiempo y temperatura de almacenamiento, entre otras, influyen en las propiedades reológicas del yogurt (29).

El yogurt es un fluido tixotrópico por lo que la agitación excesiva o altas fuerzas de corte, durante la elaboración, manejo y distribución, pueden producir una caída sustancial de la viscosidad del producto, lo que influye en su calidad (30). Además la incorporación de nuevos ingredientes en la formulación del yogurt, cambia la estructura original del gel, tanto física, como químicamente. Por lo que es importante conocer sus efectos (31).

CAPITULO II MATERIAS PRIMAS

2.1 LECHE

Según Bello en el 2004, define a la leche como:

“La secreción natural de las glándulas mamarias de especies domésticas, destinada para consumo humano, es un líquido blanco, opaco, de sabor ligeramente dulce. Contiene 87.5 % de agua, 4.3 % de proteínas animales, 5.6% de lactosa, 0.7% de minerales y vitaminas A y D”.

A continuación, se mencionan brevemente los principales componentes de la leche:

- **Proteínas:** una de las principales proteínas presentes en la leche es la caseína (2-15 g/L), lactoglobulina (2-4 g/L), lactalbumina (0.6-1.7 g/L), albumina sérica (0.4 g/L), inmunoglobulinas (0.01-0.6 g/L), lactoferrina (0.02-0.1 g/L). (20)
- **Carbohidratos:** son moléculas orgánicas formadas por carbono, oxígeno, hidrógeno, el principal carbohidrato de la leche es la lactosa, que para poder ser digerida por el organismo es necesaria la presencia de una enzima llamada lactasa (glucosa y galactosa, enlace b-1,4)
- **Lípidos:** son moléculas orgánicas formadas por carbono, oxígeno, hidrógeno y fósforo, son los componentes mayoritarios de la leche de todas las especies estudiadas, constituyendo más del 95% del total de sólidos en leche. Existen tres tipos de lípidos: grasas o aceites (triglicéridos o triacilglicéridos), fosfolípidos y ésteres de colesterol (ácidos grasos). La leche contiene unos 15 mg de colesterol por cada 100 gramos, variando en función del tipo y origen.(20)
- **Vitaminas:** pueden ser hidrosolubles y liposolubles.
- **Minerales:** los principales son calcio(Ca^+), fósforo(P^-), azufre(S^-), cloro(Cl^-), sodio(Na^+), potasio(K^+) y Magnesio(Mg^+) (macrominerales) y en menores concentraciones, hierro(Fe^+), flúor(F^-), cinc(Zn^+), yodo(I^-), molibdeno(Mo^-), cromo(Cr^-) y cobalto(Co^+), cobre(Cu^+), selenio(Se^-), manganeso(Mn^+) (microminerales). (20)

2.2 LECHE EN POLVO

“Se entiende por leche en polvo el producto obtenido mediante eliminación del agua de la leche.” (32)

2.3 FERMENTO O STARTER

Los cultivos bacterianos (de bacterias ácido lácticas) conocidos también como fermentos o starters, se utilizan en la elaboración de yogurt, kéfir y otros productos lácteos acidificados o fermentados, así como en la fabricación de mantequilla y queso.

Los fermentos se añaden al producto y se les deja crecer en él bajo condiciones controladas. En el transcurso de la correspondiente fermentación, las bacterias producen sustancias que dan al producto fermentado sus propiedades características tales como:

- Acidez
- Sabor
- Aroma
- Consistencia

Los cultivos pueden ser del tipo:

- Simple cepa.- Conteniendo una única cepa de bacterias
- Múltiple cepa.- Varias cepas, cada una de ellas con sus efectos específicos

Las características bacterianas, como temperatura óptima de crecimiento son muy importantes en la composición de un cultivo. El objetivo de utilizar mezclas de cepas es producir el efecto deseado en simbiosis, sin que tenga lugar competencia de unas con otras. En este sentido sus características han de ser complementarias.

En la tabla 4, podemos observar características de algunas bacterias de cultivos importantes para el crecimiento del starter.

Tabla 4: Características de algunas bacterias de cultivo importantes (33)

Bacteria (nombre antiguo)	Crecimiento óptimo Temp. (°C)	Tolerancia máxima para crecimiento %	Formación de ácido ferment. (%)	Ácido cítrico ferment.
<i>Streptococci</i>				
<i>Str. lactis</i>	Cerca de 30	4-6.5	0.8-1.0	-
<i>Str. cremoris</i>	25-30	4	0.8-1.0	-
<i>Str. dactylactis</i>	Cerca de 30	4-6.5	0.8-1.0	+
<i>Str. thermophilus</i>	40-45	2	0.8-1.0	-
<i>Leuc. citrovorum</i>	20-25	-	poca	+
<i>lactobacilli</i>				
<i>Lb. helveticus</i>	40-45	2	2.5-3.0	-
<i>Lb. lactis</i>	40-45	2	1.5-2.0	-
<i>Lb. bulgaricus</i>	40-50	2	1.5-2.0	-
<i>Lb. acidophilus</i>	35-40	-	1.5-2.0	-

Las industrias lácteas compran fermentos ya mezclados y preparados procedentes de laboratorios especializados. De esta manera pueden obtener cultivos con propiedades seleccionadas para conseguir las características específicas del producto que les caracteriza, tales como textura, sabor y viscosidad.

Los cultivos pueden venir en diferentes presentaciones:

- Líquidos.- para la propagación a partir de un cultivo madre
- Liofilizados.- concentrado de cultivos en forma de polvo, para la propagación como cultivo industrial
- Congelados.- concentrado de cultivos para la propagación como cultivo Industrial
- Congelados.- cultivos súper concentrados en forma muy soluble, para inoculación directa del producto (33).

2.3.1 BACTERIAS ACIDO LÁCTICAS

En general las BAL son cocos o bacilos Gram positivos, no esporulados, no móviles, anaeróbios, microaerofílicos o aerotolerantes, son; oxidasa, catalasa y benzidina negativas, carecen de citocromos, no reducen el nitrato a nitrito y producen ácido láctico como el único o principal producto de la fermentación de carbohidratos. Además, las BAL son ácido- tolerantes pueden crecer algunas a valores de pH tan bajos como 3.2,

otras a valores tan altos como 9.6, y la mayoría crece a pH entre 4 y 4.5, permitiéndoles sobrevivir naturalmente en medios donde otras bacterias no aguantarían la aumentada actividad producida por los ácidos orgánicos.

Existen diversos géneros de BAL; sin embargo, éstas son agrupadas como homofermentadoras o heterofermentadoras basado en el producto final de su fermentación. Las homofermentadoras como *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pedococcus*, *Vagococcus* y algunos *Lactobacillus*. Por su parte, las del género *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Weisella*, *Carnobacterium*, *Lactosphaera* y algunos *Lactobacillus* son heterofermentadoras y convierten hexosas a pentosas por la vía 6-fosfogluconato-fosfocetolasa, produciendo en el proceso además de ácido láctico, cantidades significativas de otros productos como acetato, etanol y CO₂.

En la industria alimentaria algunas BAL heterolácticas son más importantes que las homolácticas y son usadas en la elaboración de productos fermentados y como complementos alimenticios con la finalidad de promover la salud (probióticos).(34)

2.3.2 FUNCIÓN DE LOS PROBIÓTICOS

Nuevas investigaciones muestran que los probióticos proporcionan beneficios para el cuerpo completo, desde la salud oral a la colónica. (35) a continuación se mencionan algunos de los beneficios más comunes.

2.3.2.1 DEGRADACIÓN DE LA LACTOSA

Las bacterias ácido lácticas de hecho predigieren la lactosa, metabolizándola a ácido láctico. Las bacterias probióticas en los productos de leche fermentada y el yogurt que sobreviven el viaje hasta el intestino grueso pueden también proporcionar una actividad adicional de lactasa. Esta es la razón por la que para ciertos grupos poblacionales es más fácil digerir el yogurt que la leche. (35)

2.3.2.2 REDUCCIÓN DE DIARREAS POR ROTAVIRUS

Uno de los benéficos más probados de ciertas cepas probióticas es su habilidad para reducir la duración de diarreas infecciosas (causadas frecuentemente por rotavirus) en bebés y niños. El impacto en la disminución de la incidencia está menos probado, que otros efectos positivos de estas. Algunos estudios muestran efectos positivos en la reducción de la incidencia de diarrea asociada a antibióticos y diarrea del viajero, pero no todos los estudios tienen evidencia positiva. Lo anterior podrá sugerir la importancia en la selección correcta de cepas y dosis para lograr la eficacia. (35)

2.3.2.3 ENFERMEDADES EN EL COLON

Las investigaciones arrojan frecuentemente resultados que indican que los probióticos pudieran tener un papel en minimizar el riesgo de infecciones intestinales por *Helicobacter pylori*. Parecen tener un potencial, tanto para el síndrome de colon irritable como las enfermedades inflamatorias del mismo; así como para la reducción de alergias y eczemas en los niños (35).

Estudios epidemiológicos recientes han encontrado en cambio que dietas suplementadas con *Lactobacilos* y *Bifidobacterias* reducen el riesgo de contraer cáncer de colon. En poblaciones urbanas donde existe una mayor incidencia de cáncer de colon muestran un mayor predominio de bacterias del género *Bacteroides* dentro de su flora intestinal frente a poblaciones rurales donde el índice de esta enfermedad es muy bajo y predominan en su flora intestinal las bacterias lácticas (36). La administración de suplementos dietéticos como las oligofruktosas o inulinas favorece el crecimiento de estos últimos microorganismos, pudiendo ser muy eficaces en la reducción del adenocarcinoma de colon de acuerdo a Moore y Moore (1995).

2.3.2.4 CÁNCER DE VEJIGA

En algunos estudios realizados por Martínez *et. al.*, (2007) sobre el cáncer de vejiga, se ha demostrado el antagonismo entre las células tumorales y los probióticos. Lo anterior ha sido observado en individuos a los que se extirpó el tumor y fueron sometidos a una posterior administración de probióticos; como resultados, la reaparición del cáncer fue más lenta y tardía respecto de los individuos que no ingirieron estas sustancias tras la intervención quirúrgica (37).

Datos de estudios en animales y recurrencia de cáncer de vejiga han sugerido que el consumo de productos lácteos con BAL, como el yogurt, desempeña un papel en la reducción de carcinogénesis de vejiga (38); al respecto, existe evidencia de estudios en animales *in vitro*, en los cuales bacterias probióticas reducen el riesgo de cáncer al contrarrestar efectos mutagénicos y genotóxicos. (39)

2.3.2.5 REDUCCIÓN DEL COLESTEROL

Una elevada concentración del colesterol en la sangre es considerada un factor de génesis de arterioesclerosis, aumentando el riesgo de enfermedad cerebro-vascular, coronaria y vascular- periférica.

El consumo de productos lácteos fermentados, causa incremento en la producción de ácidos grasos de cadena corta, los cuales parecen disminuir la concentración de colesterol circulante por inhibición de la síntesis de colesterol o la redistribución de colesterol del plasma al hígado. Además, la actividad bacteriana incrementa la desconjugación de ácidos biliares y esto permite que no sean absorbidos, esto a su vez aumenta la síntesis de ácidos biliares a partir de colesterol. Lo anterior, representa un beneficio importante para personas que presentan elevadas concentraciones de colesterol plasmático.

Estudios realizados en diferentes grupos para observar cómo influye el yogurt en la formación de colesterol en el ser humano, indicaron que en las personas que tomaron yogurt 3 veces al día no hubo aumento en la concentración de colesterol plasmático, mientras que las que no tomaron yogurt tuvieron un aumento en la concentración de éste en la sangre (14).

2.3.2.6 INHIBICIÓN DE LOS MICROORGANISMOS PATÓGENOS

El efecto protector de los probióticos se realiza mediante 2 mecanismos: el antagonismo que impide la multiplicación de los patógenos y la producción de toxinas que imposibilitan su acción patogénica. (16)

Las formas en que los probióticos se utilizan para mejorar la resistencia del huésped contra los microorganismos patógenos, pueden ser:

- Efectos de barrera.
- Competencia por los sitios de adhesión y por nutrientes.
- Modificaciones del hábitat intestinal por cambios en el pH.
- Producción de sustancias antimicrobianas, entre otras.

Los microorganismos reconocidos como probióticos, son más de una docena y no todos ellos tienen los mismos efectos y mecanismos de acción, y lo que no se puede asumir que los efectos positivos sean en todos los casos similares, pero tampoco que sus efectos sean nocivos para el hombre (40).

2.3.2.7 MEJORA LA SALUD MENTAL (DEPRESION Y ANSIEDAD)

La composición de la flora intestinal no sólo afecta la salud física, sino que también tiene un impacto significativo en la función cerebral y estado mental.

Es importante darse cuenta que hay neuronas tanto en el cerebro *como en el* intestino, incluyendo neuronas que producen neurotransmisores como la serotonina. De hecho, la mayor concentración de serotonina, que está involucrada en el control del estado de ánimo, la depresión y la agresión, se encuentra en los intestinos, no en el cerebro. (41)

El consumo de yogurt probiótico manifiesta una disminución en la actividad de dos regiones cerebrales que controlan el procesamiento central de la emoción y la sensación:

- La corteza insular, que desempeña un papel importante en las funciones generalmente relacionadas con la emoción (incluyendo percepción, control motor, autoconciencia, función cognitiva y experiencia interpersonal) y la regulación de la homeostasis de su cuerpo. (42)
- La corteza somato sensorial, que desempeña un papel importante en la capacidad del cuerpo para interpretar una amplia variedad de sensaciones. (42)

Durante la exploración del cerebro en reposo, también se manifiesta una mayor conectividad entre una región conocida como sustancia gris periacueductal y áreas de la corteza prefrontal relacionadas con el conocimiento. En contraste, el no consumir productos lácteos fermentados muestra un mayor impacto en las emociones y sentimientos, pudiendo presentarse una depresión profunda y altos niveles de ansiedad (42).

2.3.3 *Streptococcus thermophilus*

A continuación se describen brevemente las características del *Streptococcus thermophilus*:

Morfología: Se presenta en forma de células esféricas u ovoides de 0.7 a 0.9 μm de diámetro unidas en parejas o largas cadenas, según la temperatura de crecimiento y el medio de cultivo.

Ecología: Se encuentran en la leche y los productos lácteos.

Metabolismo: Homofermentativa. En la leche produce 0.7-0.8% ácido láctico L (+), algunas cepas son capaces de producir hasta un 1% de ácido láctico. No produce amoníaco a partir de la arginina ni metaboliza el citrato. Algunas cepas son capaces de producir polisacáridos que forman un mucílago, lo cual es interesante para la viscosidad del yogurt.

En la leche, además de ácido láctico, produce los ácidos grasos volátiles: fórmico, acético, propiónico, butírico, isovalérico y caprónico, además produce acetoína y pequeñas cantidades de acetaldehído.

Presenta una actividad proteolítica muy pequeña en la leche y la mayoría de los aminoácidos liberados son consumidos durante la fase de crecimiento logarítmico.

Temperatura de crecimiento: Es una bacteria termófila. Su temperatura óptima de crecimiento es de 42-45°C, la mínima de 10°C y la máxima de 50°C. También es una bacteria termodúrica, aguanta un tratamiento de calor en la leche de 30 min a 60°C.

Sensibilidad a la presencia de sustancias: Es muy sensible a la presencia de inhibidores y en especial de antibióticos. También es muy sensible a la sal, hecho que se aprovecha para diferenciarlo de otros lactococos y enterococos, no crece en presencia de 4% de sal y algunas cepas en presencia de 2% de sal.(43)

2.3.4 *Lactobacillus delbruekii* ssp. *Bulgaricus*

Lo siguiente es una breve descripción de las características de *Lactobacillus delbruekii* ssp. *Bulgaricus*:

Morfología: Se presenta en forma de bacilos alargados con la punta redondeada, separados o formando cadenas. El tamaño medio en la leche es de 0.8-1 μm de ancho y 4-6 μm de largo.

Ecología: Se encuentran en la leche y los productos lácteos.

Metabolismo: Homofermentativa. En la leche produce aproximadamente 1.7% de ácido láctico D (-). Además de producir ácido láctico, produce pequeñas cantidades de otros productos como los ácidos grasos volátiles: acético, propiónico, butírico, isovalérico, caprónico y capríco además produce acetoína, acetaldehído y 2-butanona.

Presenta una actividad proteolítica mediana, pero importante por la liberación de aminoácidos libres.

Temperatura de crecimiento: Es una bacteria termófila. Su temperatura óptima de crecimiento es de 40-43°C, la mínima de 15°C y la máxima de 52°C (algunas cepas crecen hasta 60°C). Aunque no se considera una bacteria termodúrica, algunas cepas resisten temperaturas de 75°C durante 20-30 minutos.

Sensibilidad a la presencia de sustancias: Presenta una mayor resistencia a los antibióticos que el *S.thermophilus*. También es muy sensible a la sal; no se desarrolla en presencia de sales biliares o en caldos con un 2% de NaCl.

Ambos microorganismos son microaerófilos, soportan una acidez elevada y pueden vivir en simbiosis. (43)

2.3.5 *Lactobacillus lactis*

A continuación una breve descripción de las características de *Lactobacillus lactis*:

Morfología: Se presenta en forma de bastones delgados con la punta redondeada, separados o formando cadenas. El tamaño medio en la leche es de 0.8-1µm de ancho y 4-6µm de largo.

Ecología: Se encuentran en la leche y productos lácteos

Metabolismo: Homofermentativa. Forma ácido láctico como producto principal de la fermentación de azúcares. Produce cantidades de ácido láctico de entre 1.5 y 2%.

Temperatura de crecimiento: Es una bacteria termófila. Su temperatura óptima de crecimiento es de 40-45°C, la mínima de 20°C y la máxima de 50°C.

Sensibilidad a la presencia de sustancias: no se desarrolla en presencia de sales biliares o en caldos con más de un 2% de NaCl.

Son bacilos microaerófilos. (43)

2.4 PREBIÓTICOS

El consumo de prebióticos reduce el riesgo de contraer determinadas enfermedades, incluyendo:

- Supresión de diarreas asociadas a infecciones intestinales
- Reducción del riesgo de osteoporosis, pues la inulina favorece la fijación del calcio, aumentando la masa ósea.
- Reducción del riesgo de obesidad y de contraer diabetes tipo 2.
- Disminución de la frecuencia de cáncer de colon. (44)

Toda fibra dietética llega al intestino grueso sin haber sido transformada digestivamente. Las bacterias del colon, con sus numerosas enzimas digestivas de gran actividad metabólica, la pueden digerir en mayor o menor medida en dependencia de su composición química y de su estructura. Los AGCC, productos de un proceso metabólico, son ácidos grasos volátiles que en su mayoría se absorben rápidamente. De

estos (butirato, acetato y propionato), el butirato aporta mayor cantidad de energía y desempeña importantes funciones en la biología del colon:

- Suministra la mayor parte de la energía que necesitan las células de la mucosa colónica.
- Estimula el crecimiento y la diferenciación de estas células.
- Inhibe el crecimiento de las células tumorales. (16)

2.4.1 INULINA

La inulina es considerada como un prebiótico potencial al igual que la oligofructosa, se encuentran en más de 36,000 especies de plantas sin embargo, normalmente la inulina disponible comercialmente es sintetizada a partir de sacarosa y es extraída de raíces de achicoria (*Cichoriumintybus*). La cual contiene de 15-20% de inulina y 5-10% de oligofructosa respectivamente (45). La inulina se usa como ingrediente alimenticio en algunas ciudades de Europa, Estados Unidos, Canadá y Japón (44).

La principal fuente de inulina es la achicoria (*Cichoriumintybus*). De esta planta se obtiene un polisacárido complejo [a-D-glucopyranosil-(b-Dfructofuranosyl) n-1b-D-fructofuranósido], con un número de fructosas comprendidas entre 2 y 70. La inulina nativa es procesada en la industria alimentaria y transformada en frútanos (fructooligosacáridosó FOS) de cadena corta con un grado de polimerización entre 2 y 10 (normalmente 5) como resultado de la hidrólisis enzimática parcial por la inulina. (44)

2.4.1.1 EXTRACCIÓN DE LA INULINA

Existen diversos métodos de extracción de la inulina, a continuación se presentan algunos diagramas de estos procesos.

2.4.1.1.1 MÉTODO 1

Este método fue desarrollado por López *et al.* (2003) para cabezas de maguey tequilero (Ver figura 2).

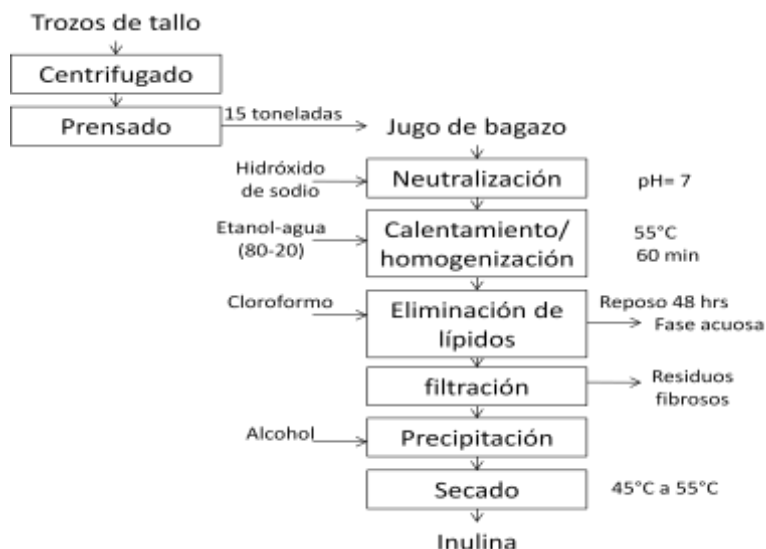


Figura 2: Diagrama de flujo extracción de inulina método 1 (46)

2.4.1.1.2 MÉTODO 2

Este método está basado en la supuesta alta solubilidad de los fructanos y en que el extracto obtenido será totalmente natural (47) (figura 3).

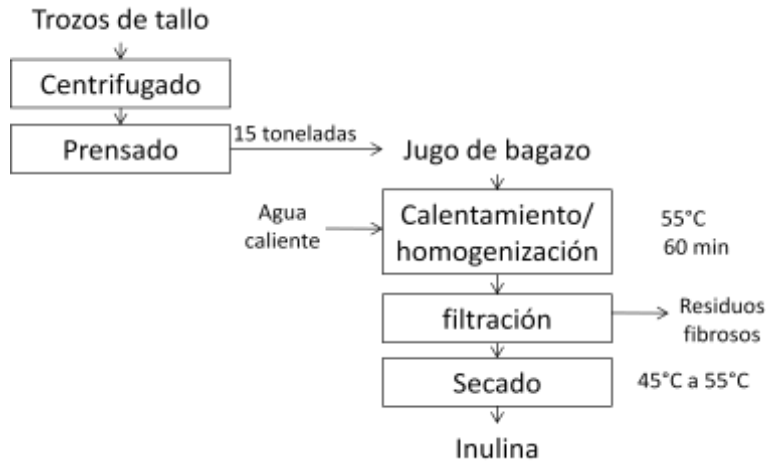


Figura 3: Diagrama de flujo extracción de inulina método 2

2.4.1.1.3 MÉTODO 3

La diferencia de este método con respecto al Método 2 es la centrifugación y la depuración con resina (48), lo cual podría mejorar la pureza del extracto (figura 4).

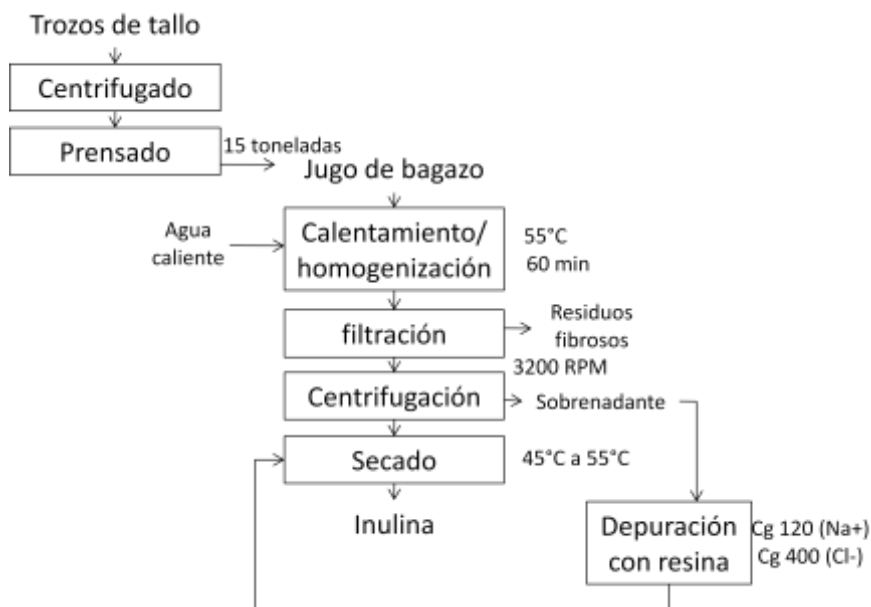


Figura 4: Diagrama de flujo extracción de inulina método 3(48).

2.4.1.1.4 MÉTODO 4

Para este método la muestra del tallo se secciona finamente y se le adiciona etanol al 80% hasta cubrirla (48); posteriormente se reduce más el tamaño de sus fracciones. Luego, la muestra se somete a congelación a -18°C durante 48 horas.

Para la extracción, las muestras se descongelan, homogeniza, filtra y centrifuga a 5200 rpm por 30 minutos a 20°C. El sobrenadante se decanta y el precipitado se somete a una segunda extracción con etanol al 80% a partes iguales; para ello esta mezcla se coloca en baño María a 55°C durante 15 minutos (48).

Finalmente el sobrenadante y el precipitado se decantan por separado. Con este método se buscó maximizar el contacto del disolvente con los fructanos presentes en los tejidos del tallo mediante la etapa de congelación, así como agotar los remanentes en los tejidos residuales.

2.4.1.2 FUNCIÓN DE LA INULINA

La inulina es poco soluble debido al tamaño de la molécula (60 g/l a temperatura de 10 °C), incluso puede formar microcristales en presencia de agua o leche. Los cristales de la inulina no son perceptibles en la boca, pero intervienen en la formación de la textura cremosa que se percibe en la boca como si fuera grasa (45). Se usa de manera exitosa en productos lácteos, panadería, helados, frutos congelados y desecados. En productos lácteos su principal función es incrementar la viscosidad, también se emplea como sustituto de azúcar con la finalidad de reducir calorías en alimentos horneados, en helados y en productos lácteos. Para finalizar, un beneficio importante de la inulina radica en su efecto prebiótico cuando es adicionada en el yogurt, el cual consiste en reforzar o mejorar la acción de cultivos prebióticos del yogurt.

La adición de inulina modula positivamente la fisiología del sistema gastrointestinal, fundamentalmente en cuanto al aumento del peso de las heces y la frecuencia de evacuación intestinal. Actualmente se estudian otros efectos como el aumento de la absorción de calcio, la estimulación del sistema inmunológico y la reducción del riesgo de cáncer de colon (44).

2.4.2 POLIDEXTROSA

La povidextrosa posee características de fibra dietaria, es comúnmente definida como un polímero con muchas ramificaciones y diversos tipos de enlaces glicosídicos, es soluble en agua y parcialmente metabolizable (14).

2.4.2.1 OBTENCIÓN DE LA POLIDEXTROSA

Se produce calentando dextrosa con un catalizador ácido y purificando el polímero resultante. El proceso consiste en la condensación de una mezcla fundida formada por aproximadamente ochenta y nueve por ciento de D-Glucosa, diez por ciento de sorbitol y uno por ciento de ácido cítrico, sobre base seca (14).

2.4.2.2 FUNCIÓN DE LA POLIDEXTROSA

La povidextrosa es la unión al azar de polímeros de glucosa altamente modificados con predominio de enlaces a (1β 6). Las características de la povidextrosa son:

- Es altamente soluble en agua (hasta un 80%).
- Es un buen humectante y efectivo para controlar la humedad de los productos.

- Puede reemplazar al azúcar y a la grasa en algunos alimentos
- Posee sabor neutro y agradable palatibilidad

La polidextrosa se metaboliza parcialmente en el cuerpo humano, se absorbe, contrariamente a lo que se ha mencionado hasta ahora, por el tracto gastrointestinal y no se metaboliza por la microflora. Sólo se metaboliza el 25% de la polidextrosa que se consume, lo que equivale a 1000 cal/g.

La polidextrosa se usa en productos alimenticios hipocalóricos para mejorar la textura y humedad. La polidextrosa y la maltodextrina no aportan calorías debido a que el cuerpo no los puede digerir, permitiendo una reducción calórica del 15 al 20%.

La dosis a emplearse debe ser usada con cuidado, no se pueden utilizar arbitrariamente en la preparación de los alimentos porque el exceso de polidextrosa produce diarrea; además, ciertos edulcorantes se desnaturalizan por acción del calor de la cocción. La dosis recomendada no debe ser mayor de 90g, por día. (14)

2.5 EDULCORANTE

Es un aditivo para los alimentos que tiene un sabor dulce pero que proporciona menos calorías que el azúcar común, por lo que se les llama “sustitutos de azúcar”.

Para que un edulcorante sea utilizable como aditivo, además de ser inocuo, su sabor dulce debe percibirse rápidamente, tiene que ser lo más parecido al de la sacarosa (azúcar común) y no dejar regustos extraños. Además, ha de resistir las condiciones del alimento en el que se va a utilizar, que es usualmente ácido, así como los tratamientos a los que se vaya a someter.(49)

2.5.1 CLASIFICACIÓN DE LOS EDULCORANTES

Los edulcorantes pueden ser clasificados como se resume en la tabla 5.

Tabla 5: Tipos de edulcorantes (50)

Edulcorantes calóricos				Edulcorantes no calóricos	
Naturales		Artificiales		Naturales	Artificiales
Azúcares	Edulcorantes naturales	Azúcares modificados	Alcoholes de azúcar	Stevia, taumatina, pentadina, monelina, brazzeína	Aspartame, sucralosa, neotamo, acesulfame K, ciclamato, alitamo, advantamo, neohesperidina DC
Sacarosa, glucosa, dextrosa, fructosa, lactosa, maltosa, galactosa	Miel, sirope de arce, azúcar de palma o de coco, jarabe de sorgo	Jarabe de maíz con alto contenido en fructosa, caramelo, azúcar invertido	Sorbitol, xilitol, manitol, eritritol, maltitol, isomaltulosa, lactitol, glicerol		

2.5.2 *Stevia rebaudiana*

La *Stevia rebaudiana* es una planta originaria del Sudeste de Paraguay, miembro de la familia de las asteráceas, conocida como “hoja dulce”. Es un arbusto perenne que puede alcanzar 65 a 80 cm, pero que cultivadas pueden llegar hasta 1,0 m de altura, sus hojas

lanceoladas tienen aproximadamente 5 cm de longitud y 2 cm de ancho y se disponen alternadas, enfrentadas de dos en dos. Puede utilizarse para la producción comercial del edulcorante Stevia por un período de cinco o más años, dando varias cosechas anuales a partir de la parte aérea de la planta, la planta crece en suelos arenosos cerca de arroyos de la parte selvática subtropical del alto Paraná (51).

Extractos de la *Stevia rebaudiana* se utilizan como edulcorante natural o en suplementos dietéticos por su contenido de los glucósidos: Esteviósidos y rebaudiósidos A, B, C, D y E; Dulcósido A, y Esteviolbiósido; los cuales poseen características químicas y farmacológicas adecuadas para su uso en la alimentación humana. El Esteviósido tiene un ligero sabor amargo y proporciona 250 a 300 veces el dulzor del azúcar (52).

Las hojas de la planta silvestre de Estevia contienen 0,3% Dulcósido, 0,6% Rebaudiósido C, 3,8% Rebaudiósido A y el 9,1% de Esteviósido. La composición química completa de las especies de Estevia aún no ha sido dilucidada. De las 110 especies de *Stevia rebaudiana* estudiadas por el sabor dulce solo 18 muestran esta característica, y de éstas la *Stevia rebaudiana bertonii* es la más dulce (52).

Las hojas frescas de Estevia contienen una gran cantidad de agua (80 a 85%). Aparte de los componentes antes mencionados (glucósidos), las hojas contienen ácido ascórbico, β -caroteno, cromo, cobalto, magnesio, hierro, potasio, fósforo, riboflavina, tiamina, estaño, zinc, etc. Entre los productos químicos encontrados están la apigenina, austroinilina, avicularin, β -sitoesterol, ácido caféico, campesterol, cariofileno, centaureidina, ácido clorogénico, clorofila, kaempferol, luteolina, quercetina, estigmasterol, entre otras (53).

2.5.1.1 OBTENCIÓN DEL STEVIA

El proceso de obtención comercial del edulcorante Stevia se realiza como lo indica el siguiente diagrama (figura 5).

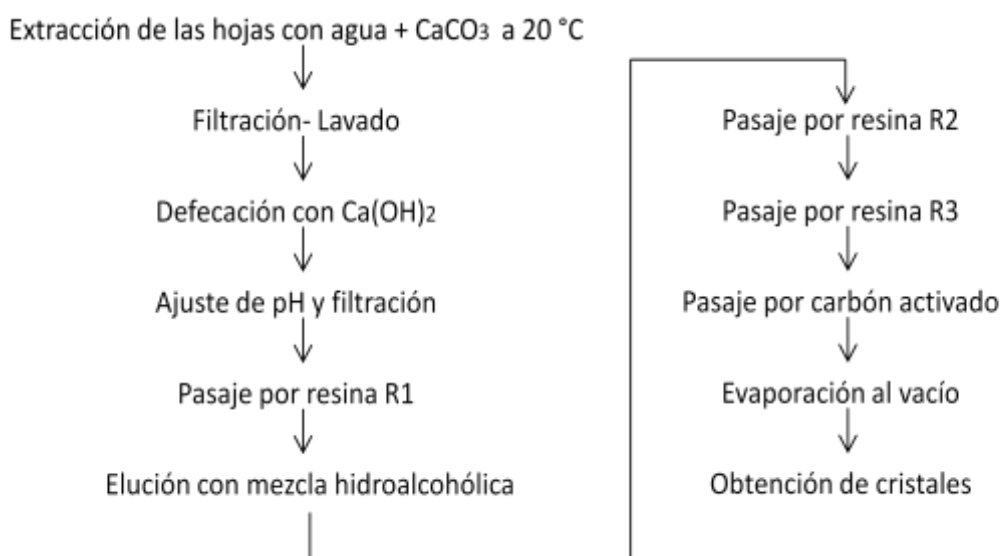


Figura 5: Diagrama de flujo para la obtención de edulcorante Stevia (54)

2.5.1.2 FUNCIÓN DE LA STEVIA

Durante siglos, las tribus Guaraníes de Paraguay y Brasil han usado diferentes especies de Stevia, principalmente *Stevia rebaudiana*, como endulzante para contrarrestar el sabor amargo de los medicamentos a base de diferentes plantas y bebidas, y con fines medicinales que incluyen la regulación de la glicemia e hipertensión (55).

2.5.1.2.1 DISMINUCIÓN DEL APETITO

Los edulcorantes no nutritivos han mostrado resultados contradictorios con respecto al consumo de energía y el peso corporal, especialmente el aspartame. La mayoría de los estudios indica que el aspartame reduce la ingesta de alimentos y puede ayudar a controlar el peso (56). Otros en cambio sugieren que el aspartame podría incrementar el apetito. Estudios que han evaluado el efecto de stevia sobre el apetito indican que los sujetos que consumieron aspartame y stevia no compensaron comiendo más en la siguiente comida (almuerzo o cena) y presentaron niveles similares de saciedad en comparación con los sujetos que consumieron sacarosa. Adicionalmente, stevia redujo los niveles de glucosa plasmática e insulina, lo que sugiere que Estevia podría ayudar con la regulación de la glucosa en sangre (57).

2.5.1.2 DIABETES MELLITUS

Los extractos de esteviósido rebaudiana pueden disminuir el nivel de glucosa en sangre en ratas diabéticas con un efecto tiempo-dependiente (51). Los esteviósidos regulan el nivel de glucosa en la sangre por el incremento en la secreción de insulina y un mejor uso de la glucosa por los tejidos periféricos y los músculos en ratas diabéticas (58); también se postula que los esteviósidos contrarrestan la glucotoxicidad en la células beta o también suprime la secreción de glucagón por parte de las células α del páncreas (59).

CAPITULO III METODOLOGIA

3.1 METODOLOGIA DE LA ELABORACIÓN DEL YOGURT

En el siguiente apartado se abordará todo lo relacionado con la preparación de las muestras utilizadas en la etapa experimental del presente trabajo.

3.2 PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

Con base en diversos diagramas de proceso para la elaboración de yogurt natural batido, se prepararon diferentes formulaciones de yogurt para estandarizar las condiciones de elaboración del mismo tales como: el contenido de sólidos, el tipo y la cantidad de cepa, el tiempo y la temperatura de incubación y el batido; esto con el propósito obtener las características representativas del producto final estipuladas en las NOM's. 9El diagrama y las condiciones, con los que se trabajó a lo largo de la experimentación, quedaron de la siguiente manera (figura 6):

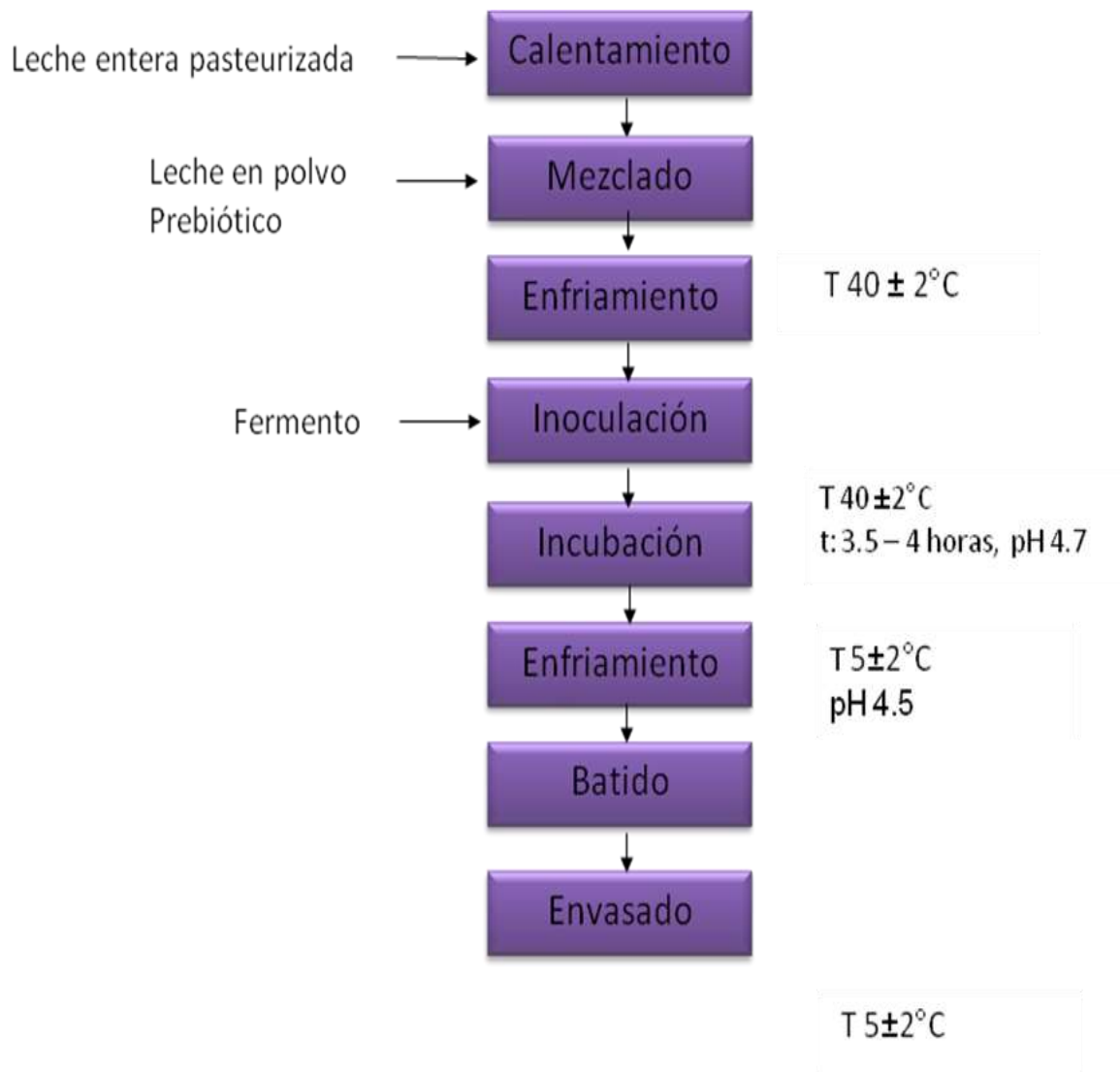


Figura 6: Diagrama de bloques para la elaboración del yogurt natural batido.

Una vez estandarizado el proceso y, partiendo de las recomendaciones hechas por Jaramillo (2007), se realizaron diversos ensayos variando la concentración de los prebióticos de interés (inulina, polidextrosa y mezcla), obteniendo los porcentajes de adición de prebióticos para las 11 formulaciones con las que se trabajó y que se enlistan a continuación.

Tabla 6: Porcentajes de adición de prebióticos

YOGURT			
1	SIN PREBIÓTICO		
2	INULINA	1g	
3	INULINA	2.5g	
4	INULINA	4g	
5	POLIDEXTROSA	2.5g	
6	POLIDEXTROSA	4g	
7	POLIDEXTROSA	8g	
8	MEZCLA	70% inulina	30% polidextrosa
9	MEZCLA	60% inulina	40% polidextrosa
10	MEZCLA	50% inulina	50% polidextrosa
11	MEZCLA	40% inulina	60% polidextrosa
12	MEZCLA	30% inulina	70% polidextrosa

} 100% = 4g

Para las formulaciones que contienen una mezcla de prebióticos se tomaron 4g como el equivalente al 100% y en base a esto se calcularon los porcentajes correspondientes.

3.3 EVALUACIÓN SENSORIAL

En la primera etapa de la experimentación se evaluaron sensorialmente las 12 formulaciones de yogurt (ver tabla 6), mediante una prueba de discriminación por ordenación.

Con el objetivo de reducir el tiempo, tener una buena organización y garantizar el control de las condiciones y variables de la evaluación, se utilizó un panel interno de consumidores de yogurt natural, integrado por personas no entrenadas pertenecientes al laboratorio de Tecnología de Calidad en Alimentos (LTCA). Las pruebas fueron realizadas dentro del LTCA en una sección que fue acondicionada con los parámetros de iluminación, limpieza, espacio, separaciones, etc., requeridas para este tipo de análisis.

La prueba se realizó en tres partes; en la primera se evaluó la formulación sin prebióticos adicionados y las que contenían inulina; en la segunda fase nuevamente la formulación base pero esta vez con aquellas que contenían polidextrosa; y finalmente la formulación base con aquellas que fueron formuladas con una mezcla de prebióticos (inulina+ polidextrosa).

Se entregaron a cada panelista las muestras codificadas aleatoriamente y el cuestionario correspondiente (ver imagen 8 y 9), en el que se les solicitó que ordenaran los códigos de acuerdo a su preferencia, siendo la primera la muestra de mayor aceptación y la última la que menos les gustó. Se asignó un valor numérico para cada muestra en relación a las respuestas obtenidas en la encuesta; estos valores fueron tabulados y analizados para determinar si existían diferencias significativas entre los productos.

El cuestionario fue diseñado de esta forma puesto que se trató únicamente de una prueba para descartar muestras. La evaluación para la selección del producto final, se realizó posteriormente e incluyó únicamente a consumidores de yogurt natural.

<p>Prueba de preferencia por ordenación</p> <p>YOGURT NATURAL</p> <p>Nombre: _____ Fecha: _____</p> <p>Sexo : (M) (F) Edad: _____</p> <p>Frente a usted hay tres muestras de yogurt natural, después de probarlas, ordene del 1 al 3, los códigos de la muestra de acuerdo a su preferencia, siendo el 1 el que más le gustó y 3 el que menos le gustó.</p> <p>1 _____</p> <p>2 _____</p> <p>3 _____</p> <p>Comentarios: _____</p> <p style="text-align: center;">MUCHAS GRACIAS POR SU PARTICIPACIÓN!!</p>

Figura 7: Formato para selección del sistema con inulina ó polidextrosa

<p>Prueba de preferencia por ordenación</p> <p>YOGURT NATURAL</p> <p>Nombre: _____ Fecha: _____</p> <p>Sexo : (M) (F) Edad: _____</p> <p>Frente a usted hay cinco muestras de yogurt natural, después de probarlas, ordene del 1 al 5, los códigos de la muestra de acuerdo a su preferencia, siendo el 1 el que más le gustó y 5 el que menos le gustó.</p> <p>1 _____</p> <p>2 _____</p> <p>3 _____</p> <p>4 _____</p> <p>5 _____</p> <p>Comentarios: _____</p> <p style="text-align: center;">MUCHAS GRACIAS POR SU PARTICIPACIÓN!!</p>
--

Figura 8: Formato para selección del sistema con mezcla de prebióticos

Al final de esta evaluación y, con el análisis de los resultados, se seleccionaron 3 de las 12 muestras que presentaron las puntuaciones más elevadas de aceptación.

3.4 EVALUACIÓN DE LA VISCOSIDAD

Para la determinación de la viscosidad de las muestras seleccionadas, se utilizó el viscosímetro Kheolab MC1 Paar-Physica, ubicado en el Laboratorio de Propiedades Reológicas y Funcionales en Alimentos, De la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán UNAM. Se seleccionó la geometría de cilindros concéntricos de 45mm, correspondiente al sistema Z2 DIN.

Considerando que el yogurt es tixotrópico para la determinación de la viscosidad se aplicó un programa de precizamiento a 100s⁻¹, tomando 50 lecturas con un intervalo de 10 segundos de tiempo entre punto y punto.

Cada una de las muestras se evaluó por triplicado a una temperatura de 15±3°C, que representa la temperatura aproximada de almacenamiento de un yogurt. A su vez se analizó, también por triplicado y bajo las mismas condiciones de prueba, una muestra comercial de yogurt natural batido con la finalidad de comparar la viscosidad del producto experimental con uno ya existente en el mercado.

3.5 EVALUACIÓN DE LA PROPIEDADES FISICO-QUIMICAS

Para garantizar que las tres formulaciones seleccionadas del producto experimental cumplen con los parámetros de calidad establecidos en las NOM's, se realizaron los análisis físico-químicos, y el análisis químico proximal, de cada una de ellas.

Al igual que para las pruebas anteriores, los procedimientos fueron repetidos por triplicado para cada una de las tres muestras de yogurt.

Las propiedades fisicoquímicas y el análisis químico proximal se realizó por los siguientes métodos (tabla 7):

Tabla 7: Métodos de análisis de propiedades fisicoquímicas y análisis químico proximal.

PROPIEDADES	METODO	FUENTE*
pH	Potenciómetro	NOM-185-SSA1-2002
Acidez titulable	Titulación alcalimétrica con NaOH	NOM 185-SSA1-2002
Humedad	Método de estufa (100°C/3hrs)	NOM-116-SSA1-1994
Proteína láctica	Método Micro-Kjedahl	NOM-155-SCFI-2003
Grasa total	Método de Roesse-Glottlieb	NOM-086-SSA1-1994
Carbohidratos totales y reductores	Titulación	NOM-086-SSA1-1994
Fibra dietética	Enzimático	AOAC985.29(1990)
Cenizas totales	Método general	NMX-F-284-SCFI-2011

*Consultar métodos en anexo A

3.6 CALIDAD MICROBIOLÓGICA

El análisis microbiológico es un instrumento que permite evaluar, mediante diversas técnicas y procedimientos, los riesgos y establecer los controles que orienten hacia medidas preventivas, con la finalidad de garantizar la inocuidad de los alimentos. Este sistema se basa en el conocimiento de los factores y microorganismos que contribuyen a causar brotes de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA's) (60).

Con la finalidad de obtener un producto de buena calidad e inocuidad, durante la elaboración, envasado y almacenamiento de todas las muestras, se llevaron a cabo medidas que redujeran el riesgo de contaminación del yogurt como fueron:

- Limpieza y desinfección de las áreas en que se manipularon materias primas y producto terminado.
- Lavado y sanitizado de los utensilios y el equipo (antes y después de su utilización).
- El uso de bata, cofia, cubre bocas y guantes para la manipulación de las materias primas y del producto terminado.
- Lavado y sanitizado de los recipientes utilizados para envasar las muestras (frascos de vidrio con tapa hermética).

La calidad microbiológica se determinó mediante las siguientes pruebas (tabla 8).

Tabla 8: Pruebas para calidad microbiológica.

PROPIEDADES	METODO	FUENTE*
Microorganismos viables	Cuenta en placa	NMX-703-COFOCALEC-2004
Coliformes totales	Cuenta en placa	NOM-243-SSA1-2010
<i>Salmonella spp</i>	Presencia	NOM-185-SSA1-2002
<i>Staphylococcus aureus</i>	Cuenta en placa	NOM-184-SSA1-2002
Mohos y levaduras	Cuenta en placa	NOM-111-SSA1-1994

*Consultar métodos en anexo B

3.7 MONITOREO DE LA FERMENTACION

Para realizar el monitoreo de la fermentación primero se determinó el contenido de microorganismos en el iniciador, utilizando un yogurt sin ningún tipo de prebiótico adicionado y que se encontraba en la etapa de inoculación. Las poblaciones se midieron por recuento total en placa (UFC/g); para los *L. bulgaricus* y *L. lactis* se usó agar MRS (en anaerobiosis) y para el *S. thermophilus* agar M17.

Para el conteo de las BAL, a lo largo de la etapa de fermentación, se tomaron 10ml de la muestra, ya inoculada, justo antes de iniciar la incubación (t_0), se diluyeron en 90ml de agua peptonada, y se homogenizó la muestra. Posteriormente se hicieron diluciones decimales (10^{-1} , 10^{-2} , ... 10^{-10}) y se sembraron en el agar correspondiente MRS para cuenta de lactobacilos y en M17 para cuenta de streptococos.

Este procedimiento se repitió cada hora, con la muestra ya en proceso de incubación, hasta completar las 4 horas de la fermentación establecidas en el diagrama de proceso. Las cajas se mantuvieron a una temperatura de 37°C y los conteos de BAL se realizaron

cada 2 días, debido a que la bibliografía sugiere lecturas óptimas de crecimiento después de las 36 horas.

3.8 EVALUACIÓN DE LA VIDA DE ANAQUEL

Para que un producto pueda considerarse un simbiótico, los microorganismos deben estar en cantidad suficiente: según algunos autores es imprescindible una cantidad de 10^7 - 10^8 UFC/g (unidades formadoras de colonias/ gramo) para que el probiótico mantenga su función, ya que si baja a 10^6 , el probiótico es incapaz de ejercer efectos beneficiosos para la salud. Además, es conveniente ingerir al menos una dosis diaria. Si se ingiere de forma alterna, aproximadamente 3 días a la semana, su acción es mucho menor o casi inapreciable (61).

Para la evaluación de la vida de anaquel del yogurt se inocularon

- *L. bulgaricus* y *L. lactis* en agar MRS (en anaerobiosis)
- *S. thermophilus* en agar M17

Se consideró para marcar la vida útil del producto, que éste cumpliera con el número de BAL requeridas en un producto simbiótico (mínimo 10^7 UFC/g), además de no presentar signos de deterioro aparente, como separación de fases (sinéresis), dichos atributos se determinaron por observación.

Las poblaciones se midieron por recuento total (UFC/g) cada cuatro días, por un periodo de 32 días, que es el tiempo correspondiente a la vida útil de acuerdo a lo marcado en la etiqueta para la mayoría de los yogurts. La muestra se mantuvo a temperatura de almacenamiento de $5\pm 2^\circ\text{C}$.

3.9 INHIBICIÓN

Para determinar que el yogurt, realmente cumple con la función de inhibir bacterias patógenas, se realizó un reto microbiano contra una cepa de *E. coli*, aislada de un caso clínico de mastitis, donada por la FMVZ de la UNAM. El yogurt fue inoculado con una concentración de 10^8 UFC/g de *Escherichia coli*, utilizando la curva de Mc Farland para la estandarización de dicha concentración. Las muestras contaminadas, se mantuvieron en refrigeración a 5°C , realizando muestreos días alternados hasta que se presentó la inhibición total.

3.9.1 SIMULACIÓN GASTROINTESTINAL (*IN VITRO*)

Para llevar a cabo la simulación gastrointestinal (*in vitro*), se elaboraron 3 sistemas:

Yogurt con inulina + *E. coli*

Yogurt con povidexrosa + *E. coli*

Yogurt con Mezcla (inulina+ povidexrosa) + *E. coli*

Inoculación de los sistemas

Se prepararon suspensiones 10^8 UFC/mL de *E. coli*, según la curva de Mc Farland (62). Se utilizaron 6.5ml de esta suspensión para inocular, respectivamente 250ml de yogurt, de cada uno de los sistemas; los cuales fueron almacenados a 37°C .

Medición de las poblaciones

Las poblaciones iniciales de bacterias Lácticas y *E. coli*, fueron medidas por recuento total (UFC/mL) en cada uno de los sistemas mencionados; posteriormente se hizo un monitoreo de las poblaciones hasta tener un conteo de *E. coli* de 0 UFC/mL, para comprobar la inhibición. Después de este registro, se realizaron 2 lecturas más, para verificar la muerte de la cepa.

Recuento total de bacterias Lácticas

Se realizó tomando alícuotas de 10mL de yogurt que se agregaron a 90mL de agua peptonada estéril (APE). A partir de esta dilución se hicieron diluciones consecutivas decimales que se inocularon en agar MRS y M17, según el procedimiento correspondiente para la determinación de bacterias lácticas. (63)

Recuento de *E. coli*.

Se llevó a cabo utilizando las diluciones descritas anteriormente, las cuales fueron sembradas, en series de 2 cajas de agar bilis-rojo-violeta, e incubadas a 37°C por 24 horas.

3.9.2 ALMACENAMIENTO COMERCIAL

Se realizó siguiendo el mismo procedimiento de la simulación gastrointestinal (*in vitro*), con la diferencia que los sistemas se almacenaron a 5°C que es la temperatura de refrigeración comercial.

3.9.3 IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS

La identificación de los microorganismos, se llevó a cabo con el propósito de garantizar la pureza y autenticidad de las cepas con las que se trabajó en la parte correspondiente a la inhibición (*E.coli*, *L. delbrueckii* spp. *bulgaricus*, *L. lactis* y *S. thermophilus*). Se realizaron tinciones de Gram y observaciones en el microscopio, las cuales permitieron identificar y clasificar los microorganismos según su morfología y la afinidad tintorial.

Para la tinción de Gram se tomaron muestras de los microorganismos, previamente sembradas en el medio correspondiente (64), y se hizo un frotis, colocando en un portaobjetos una gota de agua destilada con la que se suspendió una muestra de la colonia. El portaobjetos fue expuesto al calor para secarlo y poder realizar la tinción. Las tinciones se hicieron por triplicado para cada medio de cultivo.

Una vez hecha la tinción de Gram, cada uno de los frotis secos (con aceite de inmersión añadido), fueron llevados al microscopio para la observación de las colonias con un objetivo de inmersión de 100x. Mediante este procedimiento es posible la identificación morfológica de los microorganismos.

3.10 ACEPTACIÓN DEL YOGURT SIMBIÓTICO POR EL CONSUMIDOR

Se evaluó la aceptación del yogurt que presentó las mejores características, con consumidores. La prueba se realizó con 100 jueces consumidores no entrenados, de acuerdo al método descrito por Anzaldúa (1992), presentándoles una escala hedónica de cinco puntos, como la que se muestra en la figura 9. La muestra se le proporcionó a

cada juez debidamente codificada, a temperatura de refrigeración (5°C) y en vasos transparentes de 20ml (65)

NOMBRE: _____
EDAD: _____ FECHA: _____
1.- ¿Consumes yogurt? SI ____ NO ____
2.-¿Qué tan frecuente consumes yogurt natural?
1 Muy frecuente
2 Poco frecuente
3 Regularmente
4 Casi nunca
5 Nunca
3.- De la siguiente muestra de yogurt natural, indique el nivel de agrado, siendo el 1 Me gusta mucho y 5 me disgusta mucho.
1 Me gusta mucho
2 Me gusta ligeramente
3 Ni me gusta, ni me disgusta
4 Me disgusta ligeramente
5 Me disgusta mucho
Comentarios: _____

Figura 9: Formato de encuesta para evaluación de la aceptación del yogurt

CAPITULO IV RESULTADOS Y DISCUSION

4.1 EVALUACIÓN SENSORIAL

En la tabla 9, se muestran la formulación del yogurt base, sin adición de prebióticos y sin edulcorante.

Tabla 9: Formulación base sin edulcorante.

Ingrediente	%
Leche entera	88.965
Leche en polvo	11.032
Starter	0.003
	100

Esta muestra se dividió en 3 porciones, agregando diferentes cantidades de edulcorante natural a base de extracto de Stevia, para evaluar sensorialmente la cantidad de edulcorante y seleccionar la proporción con mayor aceptación, que fue estandarizada en las demás formulaciones.

Las cantidades de Stevia fueron las siguientes:

- A. 1.0g/250mL
- B. 0.8g/250mL
- C. 0.5g/250mL
- D. Sin endulzante

Los resultados de la prueba sensorial se analizaron mediante una prueba de atributos, con un 95% de confianza (anexo 3). Los datos obtenidos se presentan a continuación (tabla 10), reportando los rangos de atributos partiendo de la anterior enumeración alfabética.

Tabla 10: Resultados de la prueba sensorial para edulzante

DIFERENCIA DE RANGOS	VALOR ABSOLUTO	VALOR DE TABLA	JUEZ VS NO. PRUEBA
D-C	26	21	DIFERENTE
D-B	37	21	DIFERENTE
D-A	21	21	IGUAL
C-B	11	21	IGUAL
C-A	-5	21	IGUAL
B-A	-16	21	IGUAL

Como no se observan diferencias significativas, debido a que las cantidades de edulcorante son muy pequeñas, y los jueces no perciben tanta diferencia entre ellas, se decidió realizar ponderaciones de los atributos, para la selección. En la figura 10, se muestra la gráfica de las ponderaciones para el atributo de edulzante, donde se aprecia que 0.8g/250mL de edulcorante Stevia, presentó una mayor ponderación, lo que indica un mayor agrado en el gusto de los jueces, por lo que se tomó esta cantidad para endulzar en adelante las formulaciones.

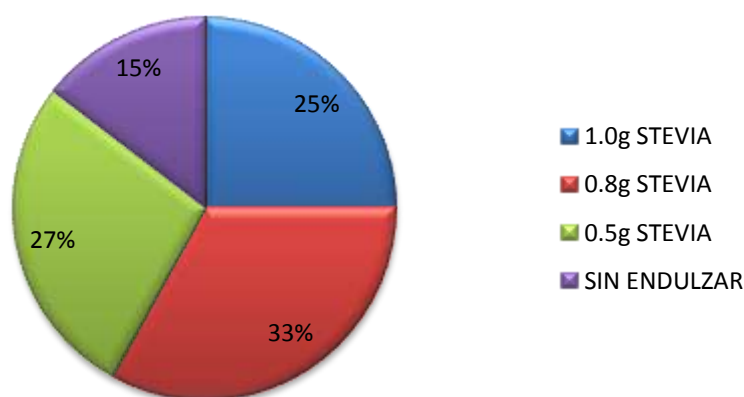


Figura 10: Gráfica de resultados de las ponderaciones para endulzante

Una vez fijada la cantidad de edulcorante a adicionar, se plantearon las siguientes formulaciones por cada tipo de prebiótico.

Las formulaciones elaboradas con adición de Inulina fueron las siguientes (tabla 11):

Tabla 11: Formulaciones con adición de inulina

	1g	2.5g	4g
Ingrediente	%	%	%
Leche entera	88.713	88.713	88.713
Leche en polvo	10.646	10.113	9.581
Inulina	0.354	0.887	1.419
Stevia	0.284	0.284	0.284
Starter	0.003	0.003	0.003
	100	100	100

Se realizó la misma prueba sensorial que se utilizó para la selección de la cantidad de edulcorante, y el mismo tratamiento de datos (tabla 12). Obteniendo, que la diferencia entre las muestras no es significativa en ningún caso.

La cantidad de Inulina, fueron las siguientes:

- A. 2.5g de Inulina/250mL
- B. 4g de Inulina/250mL
- C. 1g de Inulina/250mL

Tabla 12: Resultados de la prueba sensorial para selección de Inulina

DIFERENCIA DE RANGOS	VALOR ABSOLUTO	VALOR DE TABLA	JUEZ VS NO. PRUEBA
C-B	-1	15	IGUAL
C-A	7	15	IGUAL
B-A	8	15	IGUAL

Debido a que las cantidades de inulina utilizadas, no provoca un cambio sensorial significativo en el sabor de las muestras de yogurt, ya que la inulina posee un sabor

suave y neutro (2), y debido al tipo de panel utilizado, los jueces no logran identificar estas diferencias, ya que estas son exclusivamente en palatabilidad y cuerpo (2). Por este motivo, de la misma manera que para el edulcorante, se realizaron las ponderaciones de los atributos, obteniendo que la formulación con 2.5g de inulina/250mL (0.887%), obtuvo mayor porcentaje en dicha prueba, como se puede observar en la figura 11.

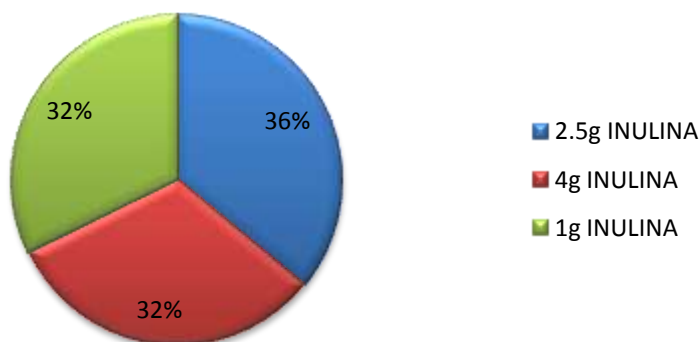


Figura 11: Gráfica de resultado de las ponderaciones para selección de Inulina

En el caso de la polidextrosa, se prepararon las siguientes formulaciones (tabla 13):

Tabla 13: Formulaciones con adición de Polidextrosa

	2.5g	4g	8g
Ingrediente	%	%	%
Leche entera	88.713	88.713	88.713
Leche en polvo	10.113	9.581	8.162
Polidextrosa	0.887	1.419	2.838
Stevia	0.284	0.284	0.284
Starter	0.003	0.003	0.003
	100	100	100

Para evaluar la aceptación o rechazo de los productos elaborados con polidextrosa, se realizó la misma prueba sensorial que se utilizó para la Inulina, y el mismo tratamiento de datos (tabla 14). Obteniendo de nuevo, que la diferencia entre las muestras no es significativa en ningún caso.

Las cantidades de polidextrosa, fueron las siguientes:

- A. 2.5g de Polidextrosa/250mL
- B. 8g de Polidextrosa/250mL
- C. 4g de Polidextrosa/250mL

Tabla 14: Resultados de la prueba sensorial para la selección de Polidextrosa

DIFERENCIA DE RANGOS	VALOR ABSOLUTO	VALOR DE TABLA	JUEZ VS NO. PRUEBA
C-B	0	15	IGUAL
C-A	-9	15	IGUAL
B-A	-9	15	IGUAL

Ranawana *et al.*, en el 2013, encontraron que la povidextrosa no altera significativamente el sabor y la palatabilidad de los alimentos. Por lo tanto, al igual que la inulina, los jueces no logran percibir un cambio en el sabor de las muestras, debido a esto, se realizaron las ponderaciones de los atributos, obteniendo que la formulación con 8g de Povidextrosa (2.838%) y la formulación con 4g de povidextrosa (1.419%), obtuvieran el mismo porcentaje en dicha prueba, como se observa en la figura 12.

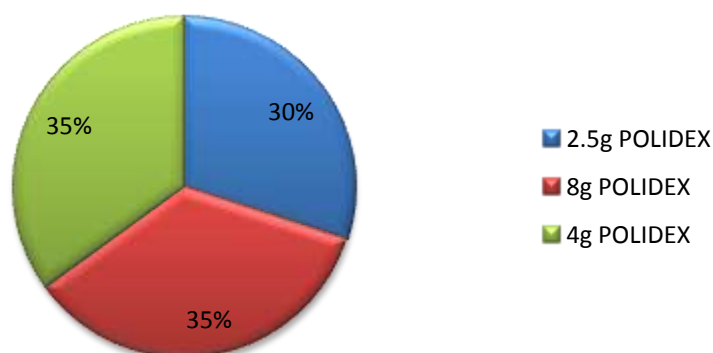


Figura 12: Gráfica de resultado de las ponderaciones para selección de Povidextrosa

En este caso se decidió seleccionar la muestra con 4g de povidextrosa/250mL (1.418%), debido a que el costo de la povidextrosa es más elevado, que la leche en polvo y no habiendo diferencia entre ellas, se toma esta decisión.

Las formulaciones para las mezclas son las siguientes (tabla 15), tomando en cuenta que el 100% del prebiótico es 4g/250mL.

Tabla 15: Formulaciones adicionada con mezcla de prebióticos

	70% Inulina 30%Povidextrosa	60% Inulina 40%Povidextrosa	50% Inulina 50%Povidextrosa	40% Inulina 60%Povidextrosa	30% Inulina 70%Povidextrosa
Ingrediente	%	%	%	%	%
Leche entera	88.713	88.713	88.713	88.713	88.713
Leche en polvo	9.581	9.581	9.581	9.581	9.581
Inulina	0.993	0.851	0.709	0.851	0.993
Povidextrosa	0.426	0.568	0.709	0.568	0.426
Stevia	0.284	0.284	0.284	0.284	0.284
Starter	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003
	100	100	100	100	100

Se realizó la misma prueba sensorial que se utilizó para la Inulina y para Povidextrosa, y el mismo tratamiento de datos (tabla 16). Obteniendo de nuevo, que sólo existe diferencia entre la muestra 60% Inulina-40% Povidextrosa y la muestra 40% Inulina-60% Povidextrosa, pero las demás muestras, no presentan diferencia significativa.

Las mezclas de prebióticos, son las siguientes:

- A. 50% Inulina-50% Povidextrosa
- B. 60% Inulina-40% Povidextrosa
- C. 30% Inulina-70% Povidextrosa
- D. 40% Inulina-60% Povidextrosa
- E. 70% Inulina-30% Povidextrosa

Tabla 16: Resultados de la prueba sensorial para la selección de la mezcla de prebióticos

DIFERENCIA DE RANGOS	VALOR ABSOLUTO	VALOR DE TABLA	JUEZ VS NO. PRUEBA
E-D	-14	28	IGUAL
E-C	-9	28	IGUAL
E-B	15	28	IGUAL
E-A	-2	28	IGUAL
D-C	5	28	IGUAL
D-B	29	28	DIFERENTE
D-A	12	28	IGUAL
C-B	24	28	IGUAL
C-A	7	28	IGUAL
B-A	-17	28	IGUAL

En esta prueba, los jueces si identifican diferencias en las texturas de los yogurts, pero no son significativas para su gusto. Por lo tanto, de la misma manera, se realizaron las ponderaciones de los atributos, obteniendo que la formulación con 60%Inulina-40%Polidextrosa, obtuvo el mayor porcentaje de aceptación en dicha prueba, como se puede observar en la figura 13.

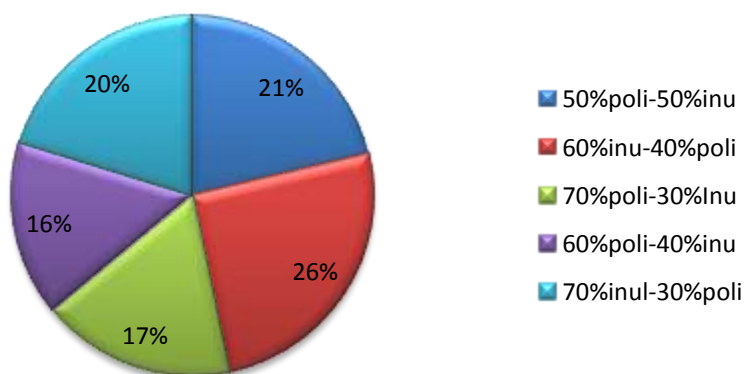


Figura 13: Gráfica de resultado de las ponderaciones para selección de la Mezcla

Las mejores formulaciones de cada prebiótico, se muestran en la tabla 17:

Tabla 17: Formulaciones seleccionadas

Ingrediente	Inulina 2.5g	Polidextrosa 4g	Mezcla 60% Inulina 40% Polidextrosa
	%	%	%
Leche entera	88.682	88.682	88.682
Leche en polvo	10.109	9.578	9.578
Inulina	0.887	0	0.851
Polidextrosa	0	1.418	0.567
Stevia	0.319	0.319	0.319
Starter	0.003	0.003	0.003
	100	100	100

4.2 EVALUACION DE LA VISCOSIDAD

Por lo tanto, con la finalidad de conocer la viscosidad final del yogurt, según el prebiótico adicionado (inulina 2.5g/250ml de yogurt, povidex 4g/250ml de yogurt y mezcla 60% inulina-40% povidex, tomando como base 4g/250ml de yogurt), se realizó su medición usando un viscosímetro Kheolab MC1 Paar-Physica, ubicado en el Laboratorio de Propiedades Reológicas y Funcionales en Alimentos, De la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán UNAM. Seleccionando, la geometría de cilindros concéntricos de 45mm, correspondiente al sistema Z2 DIN. Se tomaron mediciones de viscosidad y torque a diferentes velocidades.

En la figura 14, se presenta la grafica de resultados de la variación de la viscosidad en función del tiempo, de la muestra denominada povidex, con sus tres replicas. Como se puede observar, el yogurt adicionado con povidex como prebiótico, se comporta como un fluido dependiente del tiempo, y como se puede ver, a medida que aumenta el tiempo, la viscosidad disminuye. Esto se atribuye a que el yogurt cuando se somete a deformación, exhibe “adelgazamiento” aparente debido al rompimiento de la estructura tridimensional del gel formado (66).

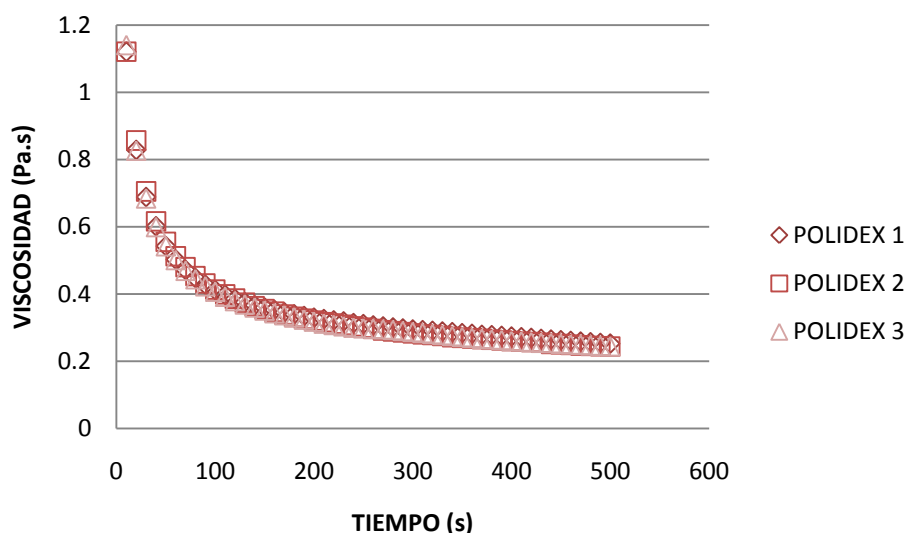


Figura 14: Gráfica de resultados de la variación de la viscosidad en función del tiempo, de la muestra adicionada con Polidex, como prebiótico.

En la figura 15, se presenta la gráfica de resultados de la variación de la viscosidad en función del tiempo, de la muestra denominada Inulina, con sus tres replicas. Como se puede observar, el yogurt adicionado con inulina como prebiótico (natural), se comporta como un fluido dependiente del tiempo, y de la misma manera que para el prebióticos sintético (povidex) se observa que a medida que aumenta el tiempo, la viscosidad disminuye.

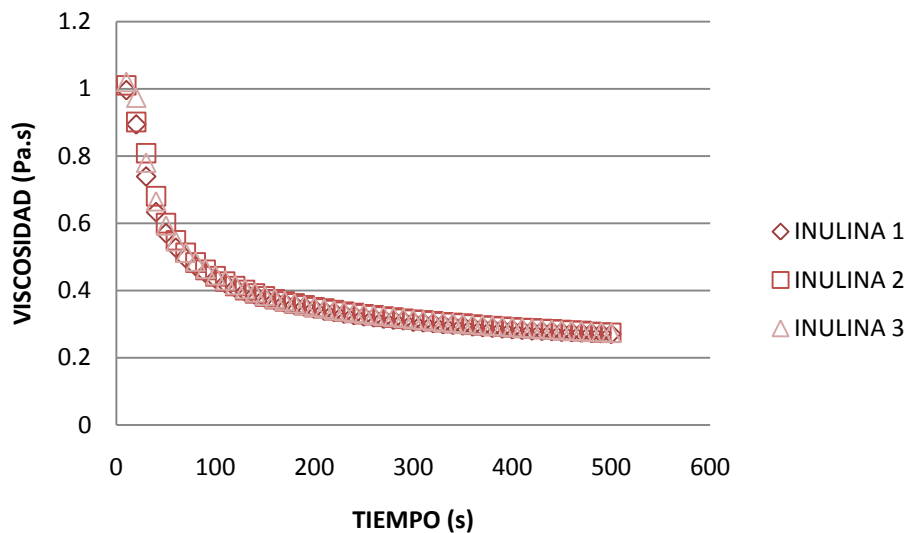


Figura 15: Gráfica de resultados de la variación de la viscosidad en función del tiempo, de la muestra adicionada con Inulina, como prebiótico.

En la figura 16, se presenta la gráfica de resultados de la variación de la viscosidad en función del tiempo, de la muestra denominada Mezcla, con sus tres replicas. Como se puede observar, el yogurt adicionado con mezcla de prebióticos (inulina-polidextrosa), se comporta como un fluido dependiente del tiempo, y de la misma manera que los sistemas de inulina y polidextrosa por separado, la viscosidad disminuye conforme avanza el tiempo.

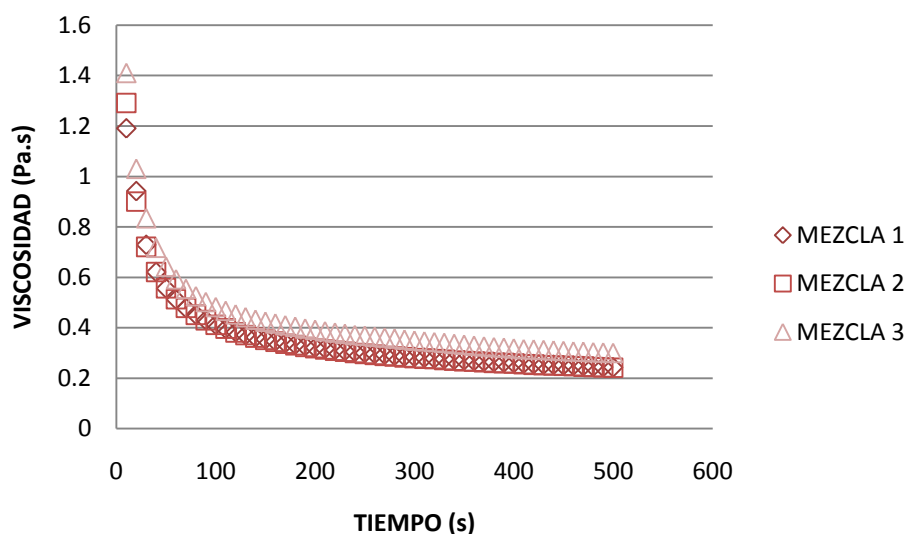


Figura 16: Gráfica de resultados de la variación de la viscosidad en función del tiempo, de la muestra adicionada con Mezcla de prebióticos.

Para esto se realizó también la medición de la base del yogurt, sin ningún tipo de prebiótico, para observar si existe alguna diferencia en la viscosidad, por la adición del prebiótico, y se obtuvo la figura 17, en la que se puede observar el comportamiento similar a los yogurts adicionados con algún prebiótico.

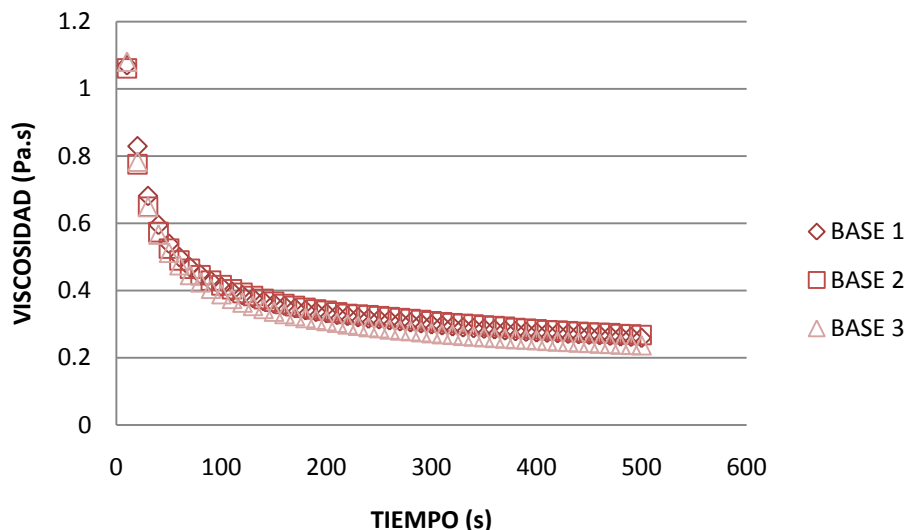


Figura 17: Gráfica de resultados de la variación de la viscosidad en función del tiempo, de la muestra Base, sin adición de prebióticos.

Para poder tener una visión más clara del comportamiento similar entre las muestras, presentamos la figura 18, como gráfica comparativa entre las muestras denominadas Polidextrosa, Inulina y Muestra, debido a que se superponen en sus réplicas, solo se presenta la primera gráfica de cada muestra.

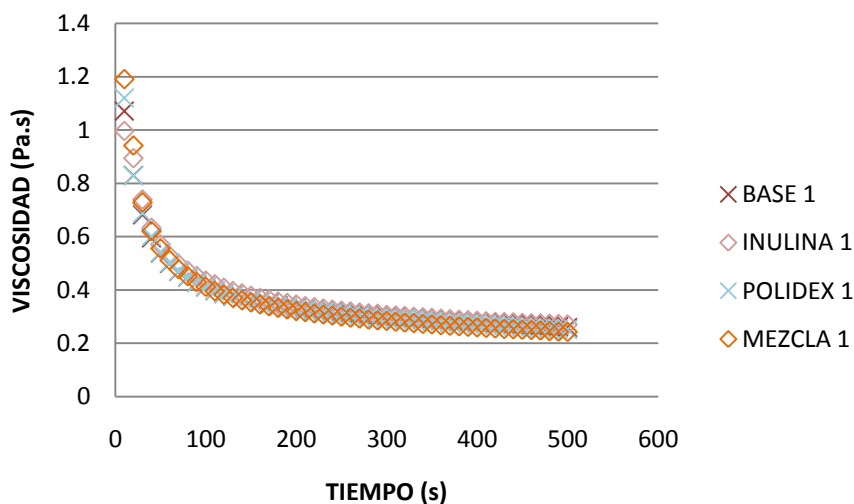


Figura 18: Gráfica comparativo de la viscosidad en función del tiempo, de las muestras denominadas: Base, Polidextrosa, Inulina y Mezcla.

En la tabla 18, se presentan los datos de la viscosidad inicial promedio, de las tres repeticiones de cada sistema, así como la viscosidad al final de la prueba.

Si se observa la viscosidad inicial, vemos que el sistema con inulina tiene menor viscosidad, pero esto es solo inicial, al final de la prueba su viscosidad es la mayor de todos los sistemas, y como era de esperarse el sistema con la mezcla de prebióticos, es la que presenta mayor viscosidad inicial.

Tabla 18: Viscosidad inicial y final promedio, por sistema.

	POLIDEXTROSA		INULINA		MEZCLA		BASE	
	INICIAL	FINAL	INICIAL	FINAL	INICIAL	FINAL	INICIAL	FINAL
PROMEDIO	1.1600	0.2460	1.0080	0.2720	1.2960	0.2600	1.070	0.254
DES. VEST.	0.069	0.004	0.012	0.002	0.11	0.034	0.010	0.016
C.V (%)	5.948	1.626	1.190	0.735	8.488	13.077	0.935	6.108

Por lo anterior podemos inferir que los tres sistemas, son fluidos dependientes del tiempo, este comportamiento era esperado debido a que Gauche *et al.* (2009), habían observado anteriormente que las bebidas lácteas presenta tixotropía y comportamiento pseudoplástico.

Posteriormente se utilizó un análisis de varianza ANOVA, con un nivel de confianza del 95%, para la viscosidad inicial, obteniendo lo siguiente (imagen 19):

En la figura 19, se presenta la gráfica de resultados obtenidos en el análisis estadístico ANOVA para la viscosidad inicial, en la cual se puede observar que el sistema adicionado con Inulina y la base no presentan diferencia significativa entre ellos, sin embargo povidextrosa y mezcla, si presentan diferencia significativa con los demás sistemas.

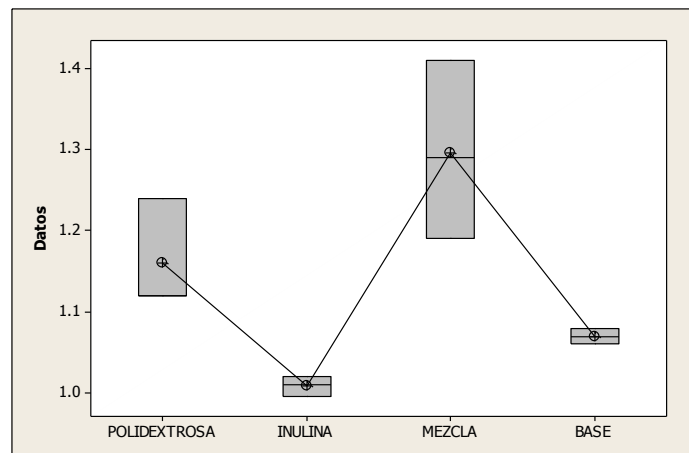


Figura 19: Gráfica de cajas para viscosidad inicial, para todos los sistemas.

Posteriormente se utilizó un análisis de varianza ANOVA, con un nivel de confianza del 95%, para la viscosidad final, obteniendo lo siguiente (figura 20):

En la figura 20, se presenta los resultados obtenidos en el análisis estadístico ANOVA para la viscosidad final, en la cual se puede observar que el sistema adicionado con inulina, es el único que presenta diferencia significativa.

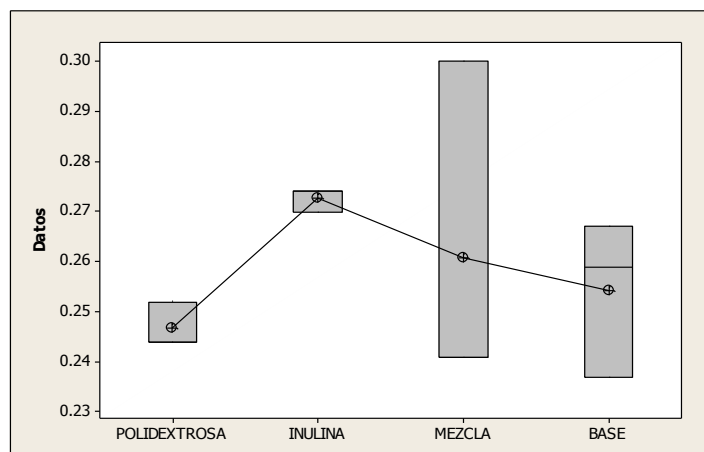


Figura 20: Gráfica de cajas para viscosidad final, para todos los sistemas.

Como era de esperarse la viscosidad inicial de la muestra denominada Mezcla, es mayor, ya que al combinar ambos prebióticos, nos dan un coagulo mas firme, en la preparación del yogurt. Sin embargo la inulina que muestra menor viscosidad inicial, es la que presenta mayor viscosidad final, esto nos indica que tiene mayor resistencia a la deformación.

Debido a que el yogurt que se desea obtener es un yogurt batido, se selecciona la muestra denominada Mezcla, como la muestra que brinda la mejor viscosidad, ya que un yogurt batido, debe poseer una viscosidad moderada, ya que una viscosidad muy alta o muy baja, son indicadores de mala calidad.

4.3 EVALUACIÓN DE LAS PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS

A continuación se presenta los resultados y el análisis correspondiente a las propiedades físico-químicas de las muestras que fueron seleccionadas mediante la evaluación sensorial (inulina 2.5g/250ml de yogurt, povidexrosa 4g/250ml de yogurt y mezcla 60% inulina-40% povidexrosa). En esta parte las pruebas se realizaron por triplicado, para todas las formulaciones, considerando las temperaturas y el tamaño de la muestra marcadas en la normatividad para cada técnica de análisis.

4.3.1 pH

El valor de pH se determinó mediante un potenciómetro previamente calibrado con soluciones buffer estándar; para lo cual se utilizaron 20ml de muestra a temperatura de $35 \pm 2^\circ\text{C}$, las mediciones se llevaron a cabo durante el proceso de incubación en intervalos de 30 min hasta alcanzar un pH de 4.7. Posteriormente las muestras fueron enfriadas para interrumpir el proceso de acidificación con el estándar marcado en la NOM (4.5 mínimo).

En las muestras el pH se considera un parámetro de gran importancia ya que, además de permitir la formación del coágulo del yogurt, influye directamente en las características finales como son la consistencia, el aroma y el sabor. Se tomó como referencia el valor de 4.5 que aparece en la normatividad puesto que, a valores de pH menores de 4.5, aumentó la sinéresis del yogurt.

Debido a lo anterior, se monitorearon las variaciones del pH del yogurt a lo largo de 32 días, como parte del seguimiento de la vida de anaquel del producto. (Ver pág. 30)

4.3.2 ACIDEZ

En el yogurt natural el alto nivel de acidez no es del agrado de muchos consumidores; por esta razón fue necesario añadir una pequeña cantidad de edulcorante Stevia (0.319%) a todas las formulaciones (inulina, polidextrosa y mezcla) y cuantificar el nivel de acidez de las mismas mediante una titulación, de tal forma que el producto se encontrara dentro del rango de acidez establecido en la normatividad (mínimo 0.5%) y tuviera una mejor aceptación entre los consumidores. Los valores obtenidos se presentan en la tabla 19.

Tabla 19: Acidez

	POLIDEXTROSA	INULINA	MEZCLA	BASE
PROMEDIO	0.491	0.447	0.485	0.502
DESV.STD	0.005	0.018	0.007	0.015
C.V (%)	1.04988343	3.98040181	1.41540888	2.96173094

Como se puede apreciar, todas las formulaciones cumplen con la normatividad; en todos los casos el coeficiente de variación es menor al 5% por lo que los resultados son confiables.

4.3.3 HUMEDAD

El contenido de humedad y los sólidos totales, están relacionados debido a que éstos, corresponden analíticamente, al residuo que permanece después de la eliminación de la humedad (67). Tomando como referencia la NOM 181, el yogurt debe tener un contenido de humedad aproximadamente del 80%, este valor no debe ser rebasado puesto que, si el contenido de sólidos totales es menor al 8.5% el producto puede tener una consistencia suave y un coagulo muy débil.

La humedad se evaluó mediante la prueba de secado en estufa a 100°C durante 5hrs y los resultados se resumen en la tabla 20.

Tabla 20: Humedad

	POLIDEXTROSA	INULINA	MEZCLA	BASE
PROMEDIO	78.447	78.497	78.400	79.603
DESV.STD	0.306	0.522	0.148	0.328
C.V (%)	0.39027662	0.66480589	0.18859222	0.4123147

Como se aprecia en todas las formulaciones se cumple con lo establecido por la normatividad; en todos los casos del coeficiente de variación es menor al 5% por lo que los resultados son confiables.

4.3.4 PROTEÍNA

Para la cuantificación del contenido de nitrógeno y, posteriormente el cálculo de las proteínas, se utilizó la técnica de Micro-Kjeldahl, obteniéndose porcentajes elevados,

esto debido a que además de las proteínas contenidas en la leche entera se adicionó leche en polvo que también aporta proteína al producto. Los valores obtenidos se observa en la tabla 21.

Tabla 21: Proteína

	POLIDEXTROSA	INULINA	MEZCLA	BASE
PROMEDIO	11.313	10.622	10.856	11.596
DESV.STD	0.444	0.350	0.340	0.174
C.V (%)	3.92554151	3.29198183	3.13593133	1.50112243

La NOM 181 establece un contenido de proteína láctica mayor al 2.9% por lo que, en lo referente a este parámetro todas las formulaciones cumplen con lo requerido. Al igual que en todos los casos anteriores, el coeficiente de variación para todas las muestras es menor al 5% por lo que los resultados son confiables.

4.3.5 GRASA

La grasa butírica presente en las muestras, se determinó mediante la técnica de Rosse-Gottlieb. De lo anterior se obtuvieron los datos reportados en la tabla 22.

Tabla 22: Grasa

	POLIDEXTROSA	INULINA	MEZCLA	BASE
PROMEDIO	6.479	6.292	6.696	7.367
DESV.STD	0.213	0.260	0.320	0.234
C.V (%)	3.29343204	4.13342322	4.78485191	3.17363644

Para un yogurt batido elaborado con leche entera el porcentaje de grasa butírica permitido es de máximo 15% por lo que las formulaciones entran en este rango.

En comparación con los valores de grasa para la leche entera (3.5%), todas las muestras presentaron valores de casi el doble; esto se debe, al igual que para el caso de las proteínas, a la adición de leche en polvo, que incrementa el valor al aportar más grasa. Sin embargo, si los comparamos con otros yogures y tomando como referencia el 15% marcado en la normatividad, las formulaciones propuestas presentan aproximadamente la mitad de dicho valor, esto resulta benéfico desde el punto de vista nutrimental ya que al tener menos grasa (que otros productos), puede ser consumida por personas que padecen de problemas de obesidad, colesterol elevado, etc.

La formulación base presenta mayor cantidad de grasa debido a que contiene mayor cantidad de leche en polvo, pues en las demás formulaciones el porcentaje de la leche en polvo se redujo en función de la cantidad de prebiótico añadido.

4.3.6 CARBOHIDRATOS

Los carbohidratos influyen directamente en la fermentación de tipo ácido-láctica, el efecto laxante y los efectos en la microflora del intestino grueso, por lo que la presencia de estos presentó una base para evaluar los aspectos microbiológicos que se abordan en capítulo posterior (pág. 48).

Para la evaluación de los carbohidratos se utilizó el método de Fehling y se calcularon los azúcares reductores totales y directos (tabla 23).

Tabla 23: Carbohidratos Directos

	POLIDEXTROSA	INULINA	MEZCLA	BASE
PROMEDIO	0.182	0.230	0.233	0.224
DESV.STD	0.006	0.012	0.000	0.011
C.V (%)	3.57166248	5.00267211	0.16110948	4.92480228

En la tabla 24, se presenta los resultados de los reductores totales.

Tabla 24: Carbohidratos Totales

	POLIDEXTROSA	INULINA	MEZCLA	BASE
PROMEDIO	0.139	0.154	0.178	0.144
DESV.STD	0.003	0.008	0.003	0.004
C.V (%)	2.23993244	4.92769284	1.61045466	2.6539189

Como se aprecia en todas las formulaciones, los carbohidratos totales, no superan el 0.18% del yogurt, cualquier formulación está por debajo que los yogurts comerciales, lo cual da un beneficio al producto; en todos los casos el coeficiente de variación es menor al 5% por lo que los resultados son confiables.

4.3.7 FIBRA DIETÉTICA

La determinación de este parámetro es de suma importancia pues, ayuda a determinar el contenido de prebiótico (inulina, povidexrosa y mezcla) que prevalecen al término de la fermentación (llegan al intestino sin ser modificados) y la cantidad que fue aprovechada por las BAL a lo largo del proceso de fermentación. Además es un factor considerado para el cálculo de los sólidos no grasos.

Para la determinación de fibra dietética, se utilizó un kit de ensayo de fibra dietética marca Sigma, obteniendo los siguientes resultados (tabla 25):

Tabla 25: Fibra Dietética

	POLIDEXTROSA	INULINA	MEZCLA	BASE
PROMEDIO	1.4040	0.8724	1.4100	0.0000
DESV.STD	0.0010	0.0015	0.0100	0.0000
C.V (%)	0.0712	0.1724	0.7092	0.0000

Como se observa en la tabla anterior, en todos los casos el coeficiente de variación es menor al 5% por lo que los resultados son confiables.

La cantidad de fibra en el yogurt, es prácticamente la misma que se adiciona al inicio de la fermentación, por lo tanto podemos decir que durante este proceso, las BAL, prefieren el consumo de la lactosa, al consumo de las fibras adicionadas, sin embargo son de ayuda, para su crecimiento (Pág. 50).

4.3.8 CENIZAS

El contenido en vitaminas y minerales depende de las características de la leche inicial y de la leche en polvo añadida, de las modificaciones por calor y de las cepas de fermentación usadas y de las condiciones de la fermentación (68). Las cenizas complementan el valor nutritivo del yogurt.

Para la determinación de las Cenizas se utilizó el método general como se indica en la normatividad, los valores se presentan en la tabla 26.

Tabla 26: Cenizas

	POLIDEXTROSA	INULINA	MEZCLA	BASE
PROMEDIO	1.835	1.737	1.542	1.741
DESV.STD	0.054	0.021	0.025	0.033
C.V (%)	2.92786614	1.18963606	1.65291319	1.92027975

Como se aprecia en todos los casos del coeficiente de variación es menor al 5% por lo que los resultados son confiables.

Como era de esperarse, los resultados obtenidos en las cenizas, son superiores a los reportados por yogurts comerciales en sus etiquetas, debido a que se trabajó con leche en polvo adicionada con hierro.

4.3.9 SÓLIDOS NO GRASOS LÁCTEOS

Los sólidos no grasos lácteos (S.N.G.L.), están compuestos por proteínas (mayoritariamente caseína), lactosa (el azúcar de la leche) y las sales minerales (calcio, potasio, fósforo, magnesio, hierro, etc.). La NOM 181 establece que para el yogurt, el contenido de sólidos lácteos no grasos debe ser mínimo de 8.25%.

Los S.N.G.L. presentes en la muestra, expresados en porcentaje, se calculan utilizando las siguientes ecuaciones establecidas en la NOM 155:

$$\begin{aligned} \% \text{ sólidos totales} &= 100\% - \text{Humedad} \\ \% \text{ S.N.G.L.} &= \% \text{ Sólidos totales} - \% \text{Grasa} \end{aligned}$$

A su vez los S.N.G.L. pueden ser calculados sumando los porcentajes de carbohidratos, proteína, fibra y cenizas, obtenidos en los apartados anteriores. Esto se puede observar en la tabla 27.

Tabla 27: Sólidos no grasos lácteos.

	POLIDEXTROSA	INULINA	MEZCLA	BASE
PROMEDIO	16.241	15.909	15.404	13.530
DESV.STD	0.780	0.432	0.342	0.436
C.V (%)	4.8018756	2.71396683	2.21841944	3.22355298

En todos los casos el contenido de SNGL es mayor al 8.5%, lo que influyó positivamente en la consistencia de todas las muestras evaluadas, siendo innecesaria la utilización de otro tipo de aditivo para consistencia o estabilización del producto.

4.4 AQP

En la siguiente tabla 28, se presenta una sumatoria de todos los parámetros medios con anterioridad por cada sistema (polidextrosa, inulina, mezcla y la base), expresados en porcentaje.

Tabla 28: Análisis Químico Proximal

	POLIDEXTROSA	INULINA	MEZCLA	BASE
HUMEDAD	78.447	78.497	78.400	79.603
PROTEINA	11.180	10.955	10.856	11.596
GRASA	6.479	6.415	6.477	7.367
CARB. DIRECTOS	0.185	0.223	0.233	0.210
CARB. TOALES	0.139	0.154	0.178	0.144
FIBRA***	1.404	0.872	1.410	0.000
CENIZAS	1.835	1.737	1.542	1.741
TOTAL	99.670	98.852	99.096	100.661

Como se aprecia en todas las formulaciones se cumple con lo establecido por la normatividad; en todos los resultados del AQP del coeficiente de variación es menor al 5% por lo que los resultados son confiables, obteniendo un valor muy cercano al 100% en la sumatoria de los resultados de cada técnica del AQP.

Posteriormente se le realizó un análisis de varianza ANOVA con un 95% de confianza, para los tres sistemas adicionados con prebióticos (polidextrosa, inulina y mezcla).

En la tabla 29, observamos los resultados del análisis de varianza ANOVA, donde se realiza comparación de todos los parámetros, entre los sistemas denominados Inulina, Polidextrosa y Mezcla, se marca con ✖, si no existe diferencia significativa entre los sistemas, y con ✓, si existe diferencia significativa con algún sistema.

Tabla 29: ANOVA Análisis químico proximal.

	POLIDEXTROSA	INULINA	MEZCLA
Humedad	✖	✖	✖
Proteína	✓	✖	✖
Grasa	✖	✖	✓
Fibra	✓	✓	✓
Carbohidratos Directos	✓	✖	✖
Carbohidratos Totales	✓	✓	✓
Cenizas	✓	✓	✓

Observamos en la tabla anterior (tabla 29), el sistema adicionado con polidextrosa como prebiótico, con respecto a los sistemas adicionados con inulina y mezcla, presenta diferencia significativa, proteínas, fibra, carbohidratos directos y totales y en cenizas, mientras que el sistema adicionado con inulina, presenta diferencia significativa para fibra, carbohidratos totales y cenizas, y el sistema adicionado con mezcla de prebióticos, presenta diferencia significativa, grasa, fibra, carbohidratos totales y cenizas.

Finalmente se realiza un análisis de varianza ANOVA, con el yogurt base, con un 95% de confianza, para determinar si existe o no, la diferencia entre un yogurt adicionado con alguno tipo de prebiótico, en comparación de un yogurt tradicional.

En la tabla 30, observamos los resultados del análisis de varianza ANOVA, donde se realiza comparación de todos los parámetros, entre los sistemas denominados Inulina, Polidextrosa, Mezcla y base, se marca con **x**, si no existe diferencia significa entre los sistemas, y con **✓**, si existe diferencia significativa con algún sistema.

Se puede observar la base, presenta diferencia significativa en casi todos los parámetros excepto para carbohidratos totales y para cenizas, en el cual se encuentra en el mismo rango que el yogurt adicionado con inulina como prebiótico.

Tabla 30: ANOVA Análisis químico proximal, con la base.

	POLIDEXTROSA	INULINA	MEZCLA	BASE
Humedad	x	x	x	✓
Proteína	✓	x	x	✓
Grasa	x	x	✓	✓
Fibra	✓	✓	✓	✓
Carbohidratos Directos	✓	x	x	✓
Carbohidratos Totales	✓	x	✓	x
Cenizas	✓	x	✓	x

En la tabla anterior (30), Se puede observar la base, presenta diferencia significativa en casi todos los parámetros excepto para carbohidratos totales y para cenizas, en el cual se encuentra en el mismo rango que el yogurt adicionado con inulina como prebiótico.

En cuanto al AQP, la mejor formulación es la adicionada con Polidextrosa como prebiótico, debido a presenta mayor contenido de proteína y cenizas, que son parte importante en el valor nutrimental del yogurt.

4.5 CALIDAD MICROBIOLÓGICA

En la tabla 31, que aparece a continuación, se reportan los resultados obtenidos del análisis microbiológico a los tres sistemas de yogurt, indicando además los límites establecidos por la normatividad para BAL (microorganismos viables), coliformes totales, *Salmonella spp.*, *Staphylococcus aureus*, mohos y levaduras.

Tabla 31: Calidad microbiológica

MICROORGANISMO	PERMITIDO	RESULTADOS
Microorganismos viables	10 ⁶ UFC/g en suma Mínima 10 ¹⁰ UFC/g en suma Máxima	LACTOBACILLUS Inulina 69x10 ⁷ UFC/g Polidextrosa 39x10 ⁷ UFC/g Mezcla 46x10 ⁷ UFC/g STREPTOCOCCUS Inulina 88x10 ⁷ UFC/g Polidextrosa 64x10 ⁷ UFC/g Mezcla 62x10 ⁷ UFC/g

Coliformes totales	10 UFC/g Máximo	AUSENTE
<i>Salmonella spp</i>	Ausente en 25ml	AUSENTE
<i>Staphylococcus aureus</i>	< 10UFC/g Máximo	AUSENTE
Mohos y Levaduras		AUSENTE

Como se puede observar las formulaciones cumplen de forma adecuada con los requerimientos de la normatividad, obteniendo un conteo de microorganismos viables que se encuentran dentro del rango marcado y ausencia de microorganismos patógenos (coliformes totales, *Salmonella spp.*, *Staphylococcus aureus*, mohos y levaduras); con esto se garantiza que, todos los sistemas, no representan un peligro para la salud y son aptos para su consumo, además de corroborar que durante el proceso de elaboración, envasado y almacenamiento se cumplió en todo momento con las Buenas Prácticas De Manufactura.

4.6 MONITOREO DE LA FERMENTACIÓN

Para determinar el aprovechamiento del prebiótico, durante la etapa de fermentación del proceso de elaboración del yogurt, se realizaron siembras en agar MRS y agar M17, para obtener el conteo de colonias presentes de *Lactobacillus* (agar MRS) y *Streptococcus* (agar M17). Dichas siembras se llevaron a cabo cada hora, durante las 4 horas que dura la fermentación.

Las cajas inoculadas fueron conservadas en incubación a una temperatura de 37°C y las lecturas se realizaron pasadas 96 horas, garantizando de esta manera el crecimiento adecuado de las colonias.

En la figura 21, se muestra la gráfica de crecimiento de *Lactobacillus* durante el monitoreo de la fermentación. Donde se observa que desde la adición del iniciador (tiempo 0), la concentración de *Lactobacillus* fue de 1.3 a 1.7×10^6 UFC/mL, al término de las 4 horas de la fermentación se tuvo un conteo de 6.9×10^8 UFC/mL en el sistema con inulina y el mínimo a este mismo tiempo de 3.9×10^8 UFC/mL para el sistema adicionado con polidextrosa como prebiótico.

Como se puede apreciar el comportamiento del crecimiento de los *Lactobacillus* es muy parecido en los tres sistemas y se ajusta al modelo de la curva de crecimiento para microorganismos, sin embargo la muestra que contenía inulina presentó mayor número de bacterias, en comparación con los sistemas con polidextrosa o mezcla, en la primera, segunda y cuarta hora de fermentación; esto indica que la inulina se aprovecha de mejor forma por los *Lactobacillus* bajo las condiciones de fermentación estudiadas.

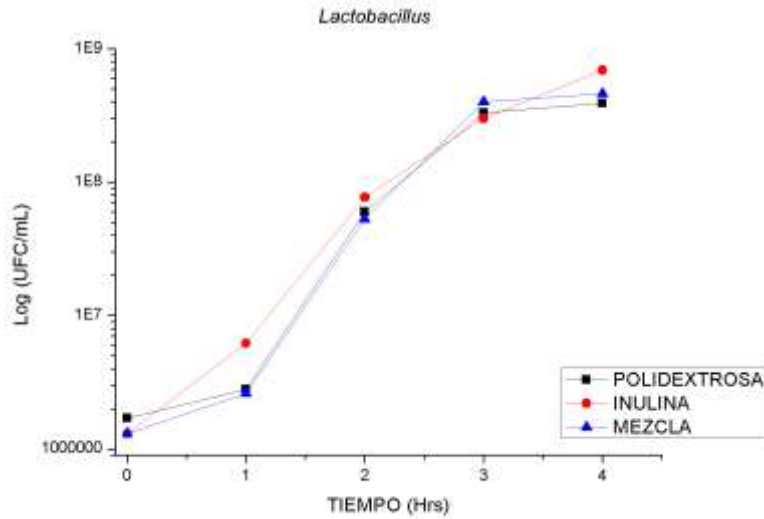


Figura 21: Gráfica de crecimiento de *Lactobacillus* durante el monitoreo de la fermentación.

En el análisis estadístico de ANOVA con un nivel de significancia del 95%, muestra que existe diferencia significativa para el sistema con inulina, incluso la caja es más amplia que en los otros dos casos, tal como se muestra en la figura 22.

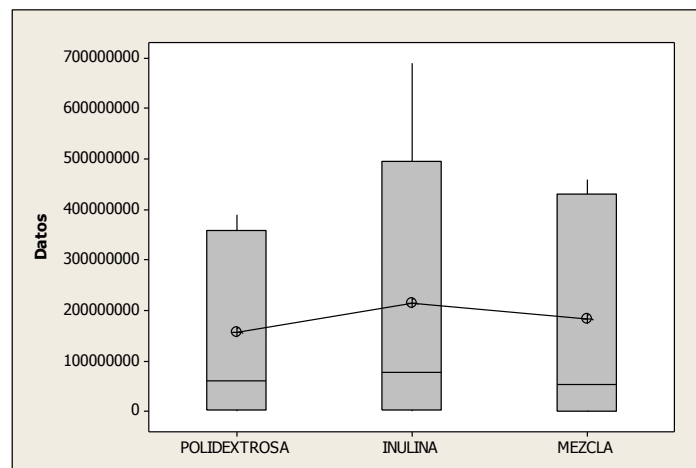


Figura 22: Gráfica de cajas del crecimiento de *Lactobacillus* durante el monitoreo de la fermentación.

En la figura 23, se presenta la grafica de crecimiento de *Streptococcus* durante el monitoreo de la fermentación, teniendo al tiempo 0, un conteo de $1 \text{ a } 2.0 \times 10^6$ UFC/mL de *Streptococcus*, obteniendo al final de la fermentación un mínimo de 6.2×10^8 UFC/mL para el sistema con mezcla de prebióticos y el valor máximo se presentó para el sistema con inulina obteniendo 8.8×10^8 UFC/mL.

Al igual que para los *Lactobacillus*, el comportamiento del crecimiento se ajusta a la primera parte de una curva de crecimiento de microorganismos observándose claramente las primeras etapas de la misma. En el caso de los *Streptococcus*, los tres sistemas tienen crecimientos muy parejos entre ellos por lo que las diferencias se analizaron mediante un ANOVA con un nivel de significancia del 95%.

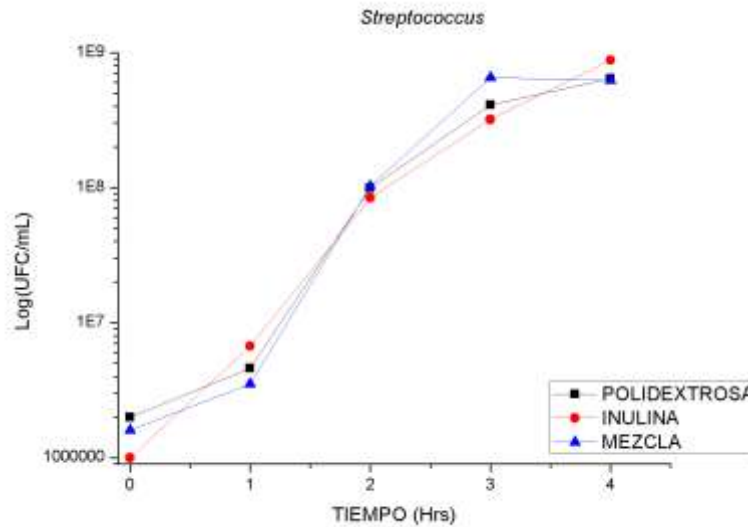


Figura 23: Grafica de crecimiento de *Streptococcus* durante el monitoreo de la fermentación.

En la gráfica de cajas que se muestra a continuación (figura 24), se observa que no existe diferencia significativa entre ninguno de los sistemas, solamente la caja del sistema con inulina como prebiótico, tiene mayor dispersión en sus datos.

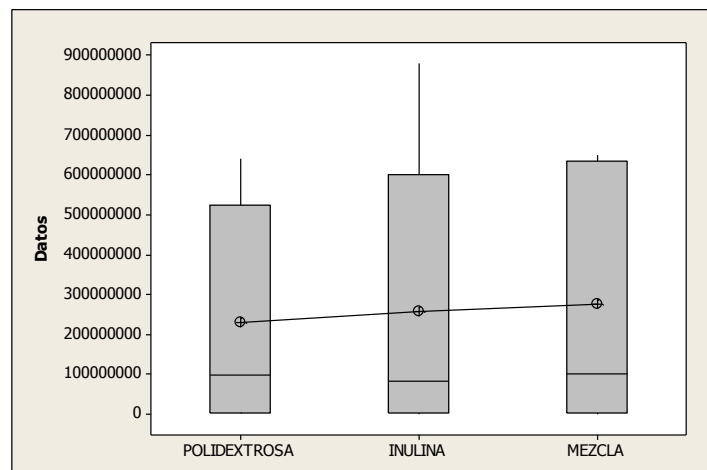


Figura 24: Grafica de cajas de crecimiento de *Streptococcus* durante el monitoreo de la fermentación.

Las condiciones para la fermentación son las mismas en todos los casos, por lo tanto tenemos un comportamiento similar para *Streptococcus* y *Lactobacillus*; sin embargo al término del proceso y con los datos obtenidos, podemos notar que los *Lactobacillus*, en comparación con la mezcla y la polidextrosa, aprovechan mejor la inulina durante la fermentación y por lo tanto se incrementa el número de bacterias en el yogurt; mientras que los *Streptococcus* no muestran preferencia por algún prebiótico en especial desarrollándose de forma muy parecida en los tres sistemas.

4.7 EVALUACIÓN DE LA VIDA DE ANAQUEL

La vida de anaquel del yogurt es más larga que la de la leche pasteurizada gracias a su nivel de acidez más bajo (pH). Siempre se aconseja que, al igual que la leche

pasteurizada, el yogurt se almacene y transporte a una temperatura inferior a los 5°C. La temperatura durante el almacenamiento resulta de gran importancia para mantener la calidad del producto, en términos de sabor y estructura.

Según Ulfman (1992), bajo condiciones favorables, la vida de anaquel del yogurt comercial es de 30 días. En el presente estudio se monitoreó la vida de anaquel a lo largo de 32 días, las pruebas que se realizaron durante este periodo fueron: la medición del pH y la verificación de la viabilidad de las BAL mediante una siembra en placa.

En la evaluación de la vida de anaquel del producto se consideró la medición del pH debido a que conforme transcurre el tiempo el yogurt tiende a acidificarse por la presencia del ácido láctico producido por los probióticos, pudiendo en un momento dado, provocar sinéresis en el producto, lo cual es un defecto que se debe evitar, pues tiene un impacto negativo en las características sensoriales tales como el olor, sabor y textura. Del seguimiento del pH se obtuvo la figura 25, donde se muestra que el pH más bajo se observa en el yogurt adicionado con inulina al día 32, el cual está entre 3.9 y el más alto se obtiene en el mismo sistema de inulina en el día 0 y es de 4.59.

Al término de los 32 días, y con la disminución del pH, las tres formulaciones adquirieron un sabor y olor ligeramente más ácido, la estabilidad se vio poco afectada presentándose una baja sinéresis.

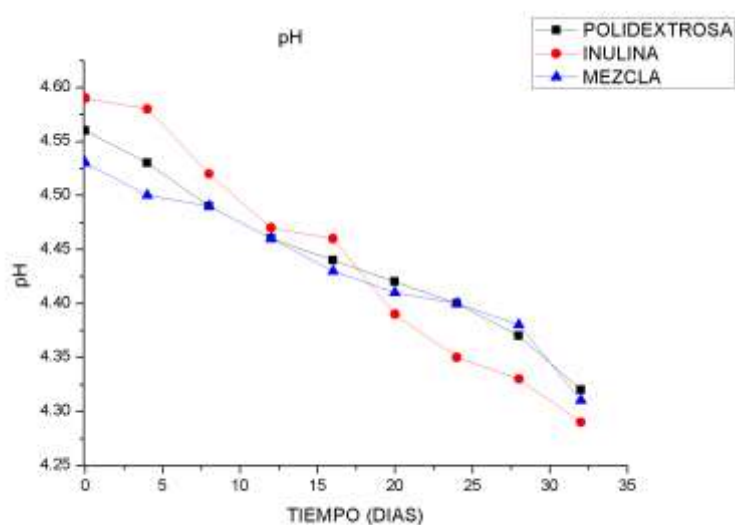


Figura 25: Gráfica de comportamiento del pH durante la vida de anaquel.

Para el seguimiento de la vida de anaquel también se realizaron conteos en placa de los *Lactobacillus* en agar MRS y de *Streptococcus* en agar M17, cada 4 días, durante 32 días, para conocer las unidades formadoras de colonias (UFC) de cada grupo de bacterias; cabe resaltar que los *Lactobacillus delbrueckii subesp. bulgaricus*, y los *Lactobacillus cremoris*, se cuantificaron en un solo grupo mencionando como *Lactobacillus*. Obteniendo las siguientes gráficas (26 y 28), con el objeto de corroborar si los productos cumplen o no con la normatividad vigente.

En la figura 26, se muestra la gráfica de la viabilidad de los *Lactobacillus*, durante la vida de anaquel. Donde se observa que el crecimiento de *Lactobacillus* inicia en el rango de 10^8 , se incrementa a 10^9 - 10^{10} (dependiendo de la formulación) y se reduce

ligeramente hasta el término del estudio; por lo tanto, a lo largo de los 32 días, todas las muestras cumplen con el conteo de UFC/mL de BAL requeridas por el Codex alimentarius para que el producto pueda ser considerado un yogurt simbiótico ($>10^7$ de UFC/mL de BAL).

Entre los aspectos que pueden destacarse se observa que, al llegar el día 8, el sistema adicionado con una mezcla de prebióticos es el que presenta el mayor incremento en las BAL con 3.2×10^{10} UFC/ML de *Lactobacillus* y 8.7×10^{10} de *Streptococcus*; el punto de menor crecimiento se observa en la formulación con povidextrosa con 3.9×10^8 UFC/ML para el día 1, del estudio.

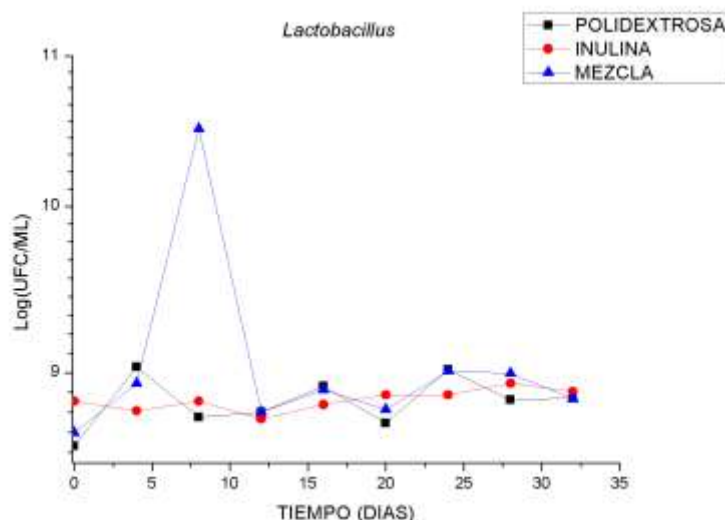


Figura 26: Gráfica de la Vida de anaquel, viabilidad de los *Lactobacillus*

Se utilizó un análisis de varianza ANOVA, con un nivel de confianza del 95%, para el crecimiento de *Lactobacillus*, obteniendo la siguiente gráfica de cajas (figura 27).

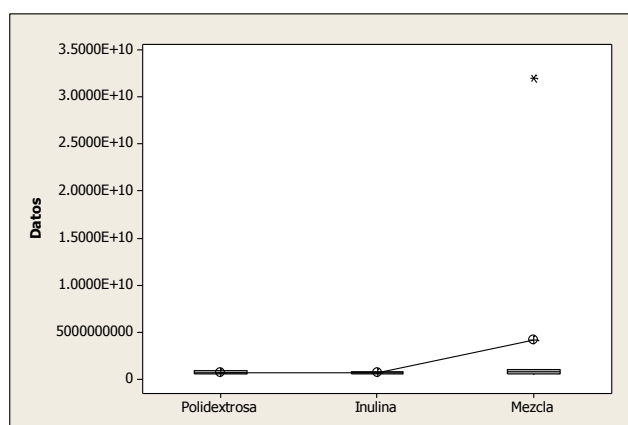


Figura 27: Gráfica de cajas de Povidextrosa, Inulina y Mezcla de prebióticos, para *Lactobacillus* en vida de anaquel

Como se observa en la gráfica 18, la muestra que contiene una mezcla de povidextrosa e inulina da como resultado un incremento en las BAL por lo que presenta diferencias significativas en comparación con los sistemas adicionados con povidextrosa e inulina por separado, en los que el incremento es menor o se presenta en un lapso de tiempo mayor. A partir de esto se puede decir que la sinergia entre los prebióticos es evidente y

tiene un efecto positivo en las BAL ya que, al combinar sus características individuales, aportan nutrientes con mejores propiedades para favorecer el desarrollo de las diferentes cepas de *Lactobacillus* existentes en la formulación.

Para el monitoreo de las UFC/mL de *Streptococcus thermophilus* se obtuvieron los datos que se presentan en la figura 28, en la que se observa que el valor más bajo obtenido es de 6.2×10^8 UFC/mL en la muestra que tiene una mezcla de prebióticos y el más alto se obtiene igualmente con la mezcla siendo este de 7.6×10^{10} UFC/mL (día 8).

Al igual que para los *Lactobacillus* la viabilidad de los *Streptococcus* se mantiene dentro del rango especificado por la codex, para los productos simbióticos.

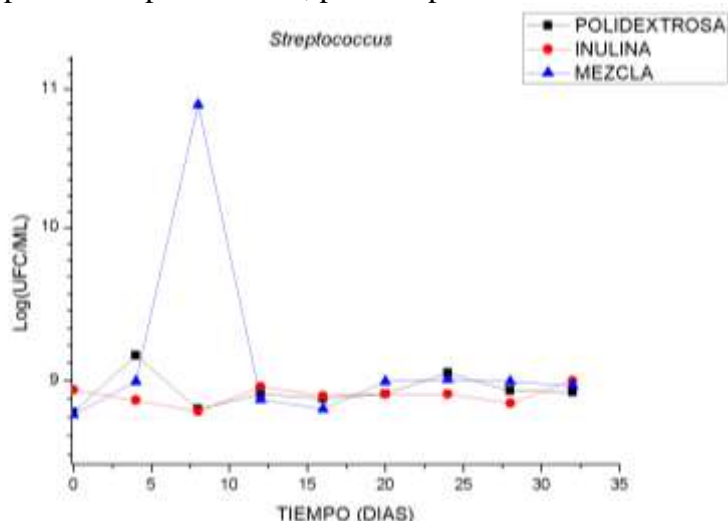


Figura 28: Grafica de la vida de anaquel, viabilidad de los *Streptococcus*.

Posteriormente se le realizó un análisis estadístico ANOVA con un 95% de confianza, a dichos datos, del cual se obtuvo la gráfica de cajas (figura 29), donde se puede apreciar que no existe diferencia significativa entre los sistemas con inulina y polidextrosa como prebiótico, mientras que solamente el sistema con mezcla de prebióticos, representa una diferencia significativa en el número de colonias de *Streptococcus* en función del tiempo. Al igual que para los *Lactobacillus* la sinergia entre los prebióticos tiene un efecto positivo ya que son mejor aprovechados por el *S.thermophilus*, favoreciendo su crecimiento en comparación con los sistemas que contienen a la polidextrosa y a la inulina de manera individual.

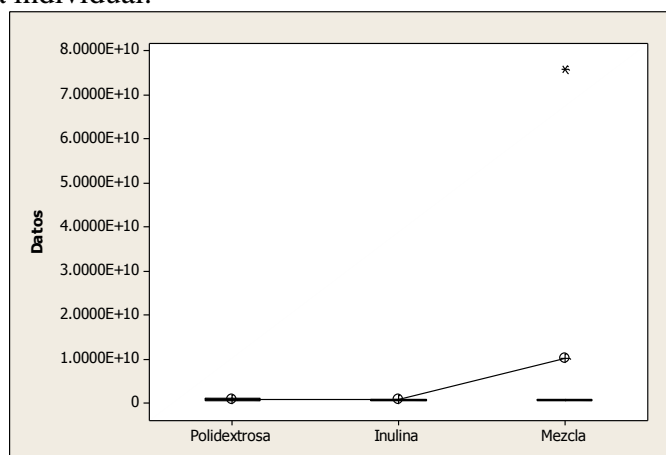


Figura 29: Gráfica de cajas de Polidextrosa, Inulina y Mezcla de prebióticos, para *Streptococcus* de vida de anaquel

En la figura 30, se muestra una gráfica comparativa del crecimiento de los prebióticos *Lactobacillus* y *Streptococcus thermophilus*, en donde se observa claramente que el sistema con mezcla de prebióticos en el día 8 presenta un incremento importante en comparación de los otros sistemas y al transcurrir el tiempo se observa el mismo comportamiento que con los demás prebióticos.

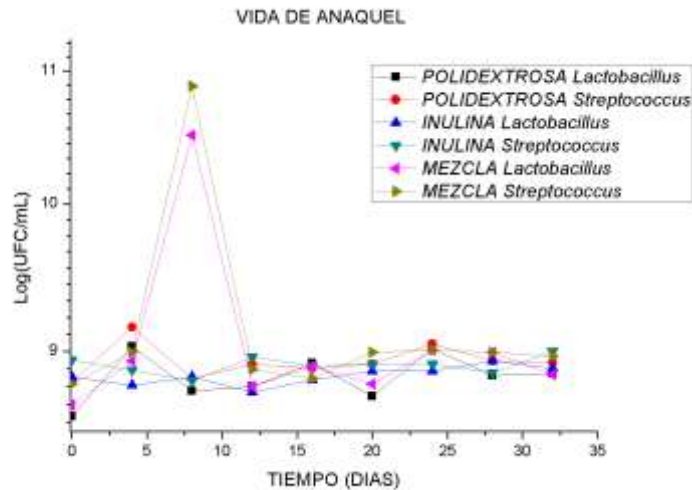


Figura 30: Gráfica de comparativo de *Streptococcus* y *Lactobacillus*, para vida de anaquel.

El comportamiento anterior, del sistema con mezcla de prebióticos, se esperaba; sin embargo también se esperaba que esa diferencia se mantuviera en todos los puntos, no solo en el día 8. Esto se atribuye a la cantidad de biocinas, ácidos orgánicos, etanol y otros metabolitos inhibidores, tales como peróxidos de hidrogeno, acetaldehído y acetoína, que generan tal cantidad de BAL, si se observa detenidamente la gráfica, después decrecer, vuelven a la etapa de adaptación y generan de nuevo un pequeño crecimiento, debido a que están en competencia por los mismo nutrientes, solo pueden mantenerse en este ciclo logarítmico, al igual que las otras muestras.

Al término de los 32 días del estudio, se observó que la viabilidad de las BAL continuaba siendo adecuada y cumplía con la normatividad pudiéndose ampliar la vida útil del producto; sin embargo se evaluaron los cambios en el olor, sabor, pH, y estabilidad del yogurt que, aunque no fueron muy drásticos, modificaron las características deseadas para el producto, dichos cambios suceden gracias a la actividad proteolítica de las BAL, siendo esto lo que marcó el fin del estudio.

4.8 INHIBICIÓN *Escherichia coli*

Para determinar que el yogurt, realmente cumple con la función de inhibir bacterias patógenas, se realizó un reto microbiano contra una cepa de *E. coli*, aislada de un caso clínico de mastitis, donada por la FVMZ de la UNAM. El yogurt fue inoculado con una concentración de 10^8 UFC/g de *Escherichia coli*, utilizando la curva de Mc Farland para la estandarización de dicha concentración. Las muestras contaminadas, se mantuvieron

en refrigeración a 5°C, realizando muestreos días alternados hasta que se presentó la inhibición total (15 días).

En la gráfica (figura 31) se puede observar claramente donde comienza la etapa de decrecimiento de *Escherichia coli*; en el producto con mezcla de inulina y polidextrosa esta etapa se presenta al término de 2 días, mientras que para la inulina se presenta hasta el día 4 y para la polidextrosa hasta el día 6.

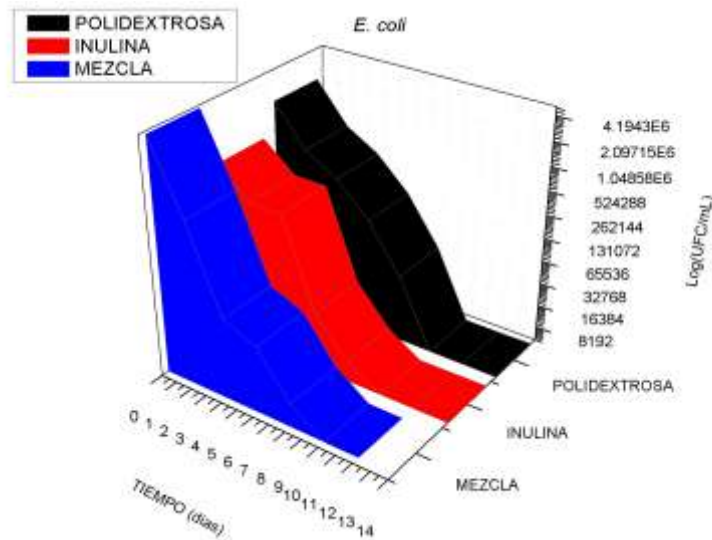


Figura 31: Grafica de decrecimiento de *Escherichia coli*.

El comportamiento de *Escherichia coli*, en los diferentes sistemas es el que se muestra en las siguiente gráfica, obteniendo el punto final de inhibición al día 12, para el sistema con mezcla, mientras que para inulina y polidextrosa se obtuvieron hasta el día 14. Cabe resaltar que durante este proceso también se realizó la cuantificación de las BAL, en las mismas condiciones de tiempo y temperatura (37°C), en esta cuantificación las BAL se mantienen constantes en un rango de entre 10^7 y 10^9 UFC/mL, con esto se comprueba que al consumir cualquiera de las 3 formulaciones una concentración elevada de BAL es transportada a través del tracto digestivo, aumentando la posibilidad de que estas lleguen vivas siendo benéficas para el consumidor.

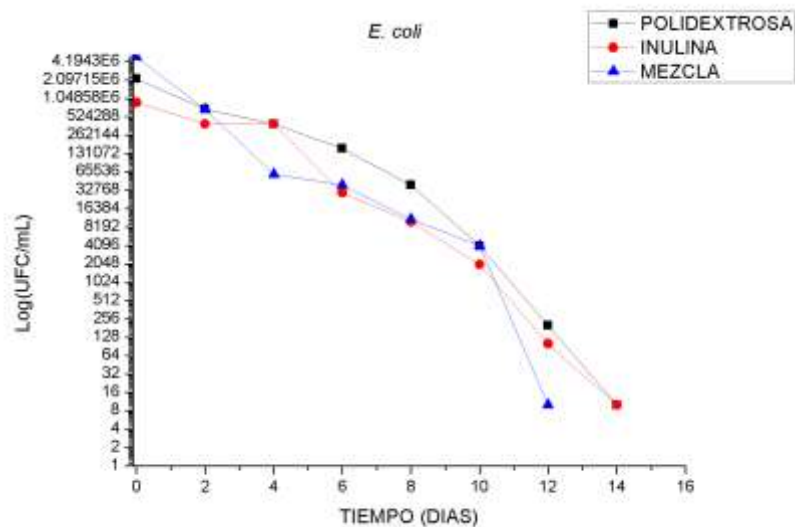


Figura 32: Grafica de inhibición de *E. coli*.

Se realizó posteriormente un análisis estadístico ANOVA con un nivel de significancia del 95% a partir de cual se obtuvo la gráfica de cajas (figura 33), en la que se puede observar que el sistema con mezcla de prebióticos, es el único que presenta, diferencia significativa al compararlo con las muestras que contenían solo inulina o polidextrosa.

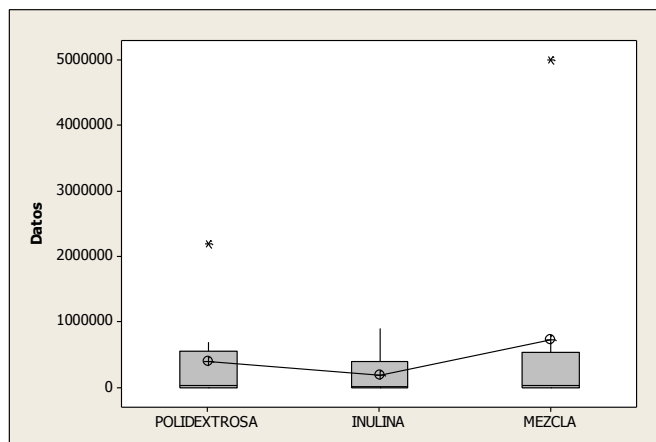


Figura 33: Gráfica de cajas de Inhibición, para los sistemas denominados Polidextrosa, Inulina y Mezcla.

Barrates *et. al*, en el 2004, utilizaron una concentración de 10^8 UFC/mL de *Escherichia coli* en un reto con yogurt comercial, en este caso encontraron que la inhibición total se presentó el día 16, resultados similares a los obtenidos en el presente estudio, donde debido a que el yogurt fue elaborado con prebiótico en la formulación, la inhibición se produce en un menor tiempo (12 y 14 días respectivamente).

Calderon *et. al*, en el 2007, realizaron el mismo procedimiento para inhibición de *E.coli*, adicionando diferentes prebióticos al yogurt comercial, para lo que formularon tres sistemas diferentes:

A: yogurt sin prebióticos

B: yogurt con *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus acidophilus*

C: yogurt con *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus rhamnosus*.

La inhibición de *Escherichia coli*, se alcanzó en el día 20, para el yogurt comercial (misma bacterias ácido lácticas utilizadas en el presente trabajo), por lo tanto se puede decir que la adición del prebiótico, comparado con los resultados de Calderon *et al.*, redujo entre 6 y 8 días la inhibición in vitro de dicha bacteria patógena.

4.9 TINCIÓN DE GRAM

Para comprobar la pureza de las BAL y las colonias de *E.coli* con las que se inoculó el yogurt, cada una de ellas fue aislada y visualizada en el microscopio tras la realización de la tinción de Gram correspondiente. De las imágenes obtenidas, y que se muestran a continuación, se puede decir que:

Los *Lactobacillus* aislados del yogurt, al pertenecer al género de las bacterias Gram positivas presentaron una coloración azul-violeta y la morfología de bastones alargados correspondiente al género, como se puede apreciar en la figura 34.

Como se observa en la figura 35, los *Streptococcus*, también se presentan una coloración azul-violeta y se observan cadenas de cocos o esferas bien definidas, que corresponden a la morfología típica del género.

En la figura 36, se puede notar que la *E.coli* al ser una bacteria Gram negativa presentó una coloración rosada y forma de bacilo corto tal como se reporta en la bibliografía.

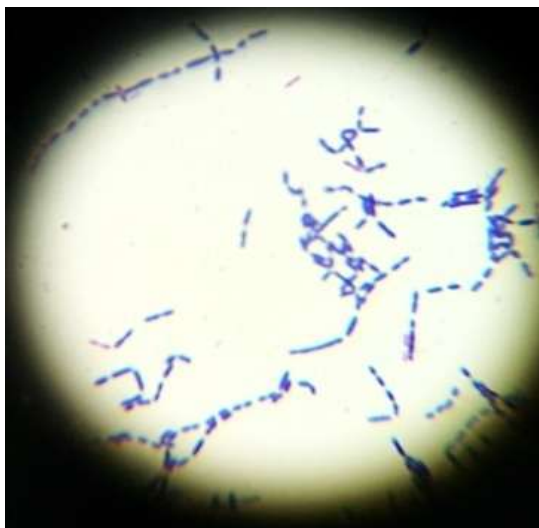


Figura 34: Tinción de Gram
Lactobacillus

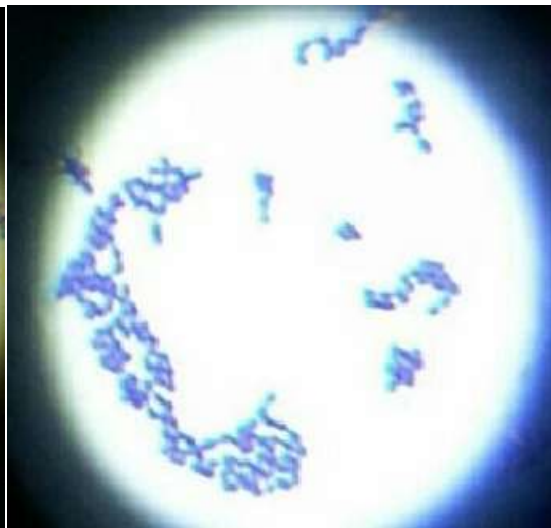


Figura 35: Tinción de Gram
Streptococcus

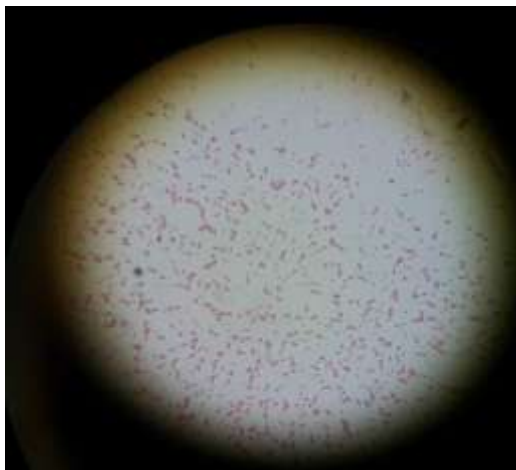


Figura 36: Tinción de Gram *E.coli*

4.10 COSTOS

Para determinar el precio aproximado de las tres formulaciones que fueron analizadas, se realizó el cálculo de los costos en función de las materias primas que se utilizaron. En la tabla 32 se encuentran reunidos los precios y las presentaciones de cada una de las materias primas con las que se elaboraron los diferentes yogurts.

Tabla 32: Costo de ingredientes según la presentación comercial

INGREDIENTE	PRESENTACIÓN	PRECIO (M.N)
Leche entera pasteurizada	1L	\$15.00
Leche en polvo	Bolsa c/520g	\$56.00
Starter	Sobre para 50L de yogurt	\$116.00
Edulcorante (Stevia)	110g en sobres de 1g	\$51.00
Inulina	1 kg	\$400.00
Polidextrosa	1 kg	\$120.00

En la tabla 33, se muestran los costos aproximados para cada formulación, los cuales se calcularon en base a una presentación de 125mL de yogurt, que es la porción que se sugiere para su comercialización (en base a los productos ya existentes en el mercado).

Tabla 33: Costos en base a materias primas por 125ml de formulación (m.n)

INGREDIENTES	BASE	INULINA	POLIDEXTROSA	MEZCLA
Leche entera pasteurizada	1.86	1.86	1.86	1.86
Leche en polvo	1.67	1.54	1.46	1.46
Edulcorante (Stevia)	0.21	0.21	0.21	0.21
Starter	0.29	0.29	0.29	0.29
Inulina	0	0.50	0	0.48
Polidextrosa	0	0	0.24	0.09
Envase	0.50	0.50	0.50	0.50
TOTAL	4.53	4.90	4.56	4.89

Analizando los costos de las formulaciones adicionadas con prebióticos, la que está adicionada con polidextrosa resulta la opción más económica y la que contiene inulina la más costosa.

Como se señaló en capítulos anteriores, para que el yogurt cumpla con su funcionalidad en el organismo, es necesario que el consumidor ingiera 2 piezas por día por lo que el precio final se incrementaría al doble del total indicado en la tabla 33.

Aunque los gastos generados por los servicios son iguales, sin importar la formulación con la que se trabaje, se calcularon los costos para verificar que el producto final puede competir en precio con los productos que se encuentran actualmente en el mercado.

En la tabla 34 se presentan los costos generales de los servicios utilizados durante el proceso de elaboración.

Tabla 34. Costos en base a servicios de producción (m.n.)

SERVICIO	DESCRIPCIÓN	COSTO
Mano de obra	Jornada de 8 hrs.	67.29
Agua	Por metro cúbico	7.90
Electricidad (incubación)	kW/ h	0.804
Electricidad (refrigeración)	kW/h	0.804
Gas	Precio por litro	13.15

Tomando en cuenta los valores obtenidos en la tabla antes mencionada, se calculó el costo total en función del consumo de servicios durante la producción; para lo cual se

consideraron los gastos generados en un día de trabajo para la elaboración de yogurt (pudiéndose preparar desde 250mL hasta 5L de yogurt sin que se alteren los costos).

Tabla 35. Costos de los servicios de producción por día de elaboración (m.n)

SERVICIO	Consumo	COSTO
Mano de obra	Jornada completa	67.29
Agua	0.02 m ³	0.16
Electricidad (incubación)	3.2 kW/h	2.57
Electricidad (refrigeración)	0.575 kW/h	0.46
Gas	0.1285 L	1.68
TOTAL		72.16

Si se elabora la cantidad máxima de yogurt (5L) el costo de los servicios por cada 250mL sería de \$3.61 (m.n), por lo que el precio final aproximado del producto terminado sería el que se presenta en la tabla 36.

Tabla 36. Costo del producto final en base a materias primas y servicios de producción

DESCRIPCIÓN	BASE	INULINA	POLIDEXTROSA	MEZCLA
Costos de materias primas	4.53	4.90	4.56	4.89
Costos de servicios	3.61	3.61	3.61	3.61
TOTAL	8.18	8.51	8.17	8.50

Como se puede observar, considerando los gastos de formulación y los servicios, cualquiera de los sistemas se encuentra dentro del rango de precios que se maneja en los supermercados para productos con características similares, que van de los \$3.70 a los \$10.00 m.n. (dependiendo de la marca).

4.11 SELECCIÓN DEL YOGURT CON BASE EN SUS PROPIEDADES

Las 3 formulaciones de yogurt simbiótico con las que se trabajó a lo largo de esta investigación, cumplen con los parámetros requeridos por la normatividad mexicana, teniéndose la posibilidad de comercializar cualquiera de ellas; sin embargo y, como parte de las conclusiones, se seleccionó la formulación que presentó las mejores características en la mayoría de los rubros analizados (tabla 37), siendo el sistema adicionado con mezcla de prebióticos (mezcla 40% inulina 60% polidextrosa) el elegido.

En la tabla 37, se observan los parámetros evaluados en esta investigación. La muestra que presento el mejor comportamiento es señalada con el símbolo ✓, y las demás muestras que se señalan con el símbolo ✗.

Tabla 37. Selección de muestra

	POLIDEXTROSA	INULINA	MEZCLA
VISCOSIDAD	✗	✗	✓
A.Q.P.	✓	✗	✗
FERMENTACION	✗	✓	✗
VIDA DE ANAQUEL	✗	✗	✓
INHIBICION	✗	✗	✓
COSTOS	✓	✗	✗

4.12 ACEPTACIÓN DEL YOGURT SIMBIÓTICO SELECCIONADO (MEZCLA: 40% INULINA -60% POLIDEXTROSA)

Para determinar la aceptación del yogurt (mezcla 40% inulina 60% polidextrosa), se realizó una prueba de aceptación hedónica verbal de 5 puntos, a 100 consumidores de yogurt, en la zona de Cuautitlán Izcalli, de los cuales el 100% consumía algún tipo de yogurt.

De los 100 consumidores encuestados el 56% fueron hombres y el 44% mujeres, como se observa en la figura 37.

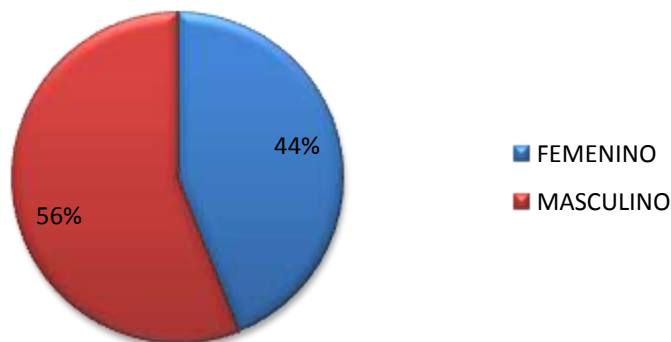


Figura 37: Gráfica del Sexo de los consumidores

En la figura 38, se observa que de estos consumidores el 45% fueron jóvenes entre los 21 y 25 años de edad y solo el 3% fueron consumidores entre 61 y 65 años. Esto se debe a que en el lugar en el que se realizó la prueba, existe una zona escolar.

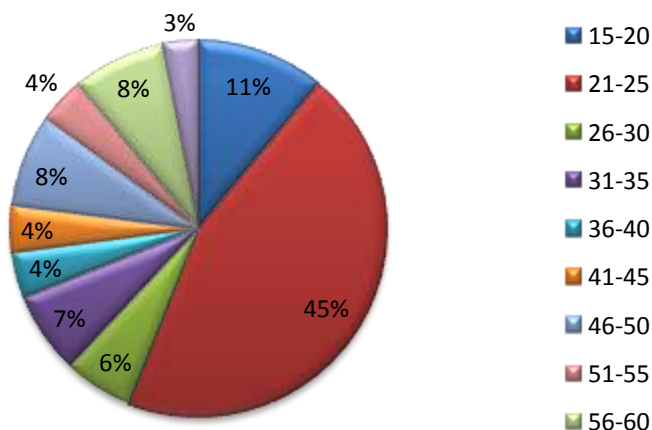


Figura 38: Gráfica de la edad de los consumidores

Del 100% de los consumidores que aseguraban consumir yogurt, solo el 32% consume yogurt natural frecuentemente, como se observa en la figura 39, que entre poco frecuente, casi nunca y nunca, suman el 45%, a esto se atribuye que la mayor parte de los comentarios recibidos eran “LE FALTA AZUCAR”, mientras que los consumidores frecuentes de yogurt natural mencionaban “EL YOGURT ESTA RICO, PORQUE NO ES TAN ÁCIDO COMO LOS COMERCIALES”.

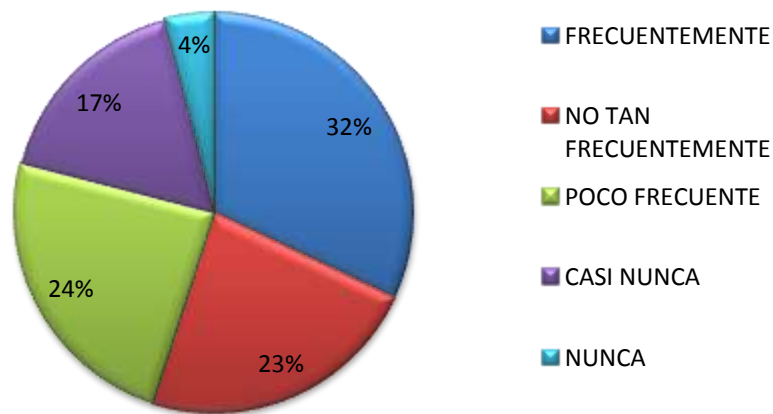


Figura 39: Gráfica de consumo de yogurt natural.

Finalmente se observa en la figura 40, la aceptación del yogurt con mezcla de prebióticos, entre “me gusta mucho” y “me gusta”, suman el 64%; cabe resaltar que durante la prueba no se les mencionó que era un yogurt simbiótico, ni mucho menos ninguno de los beneficios para no influir en el resultado. Por lo tanto, el yogurt es aceptado y puede comercializarse.

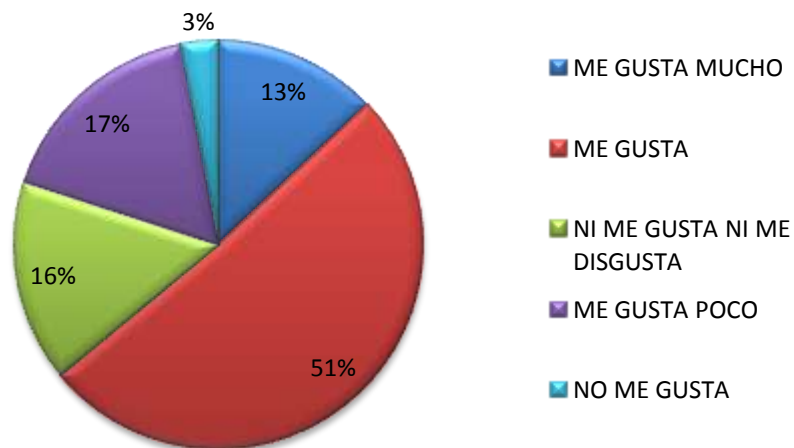


Figura 40: Gráfica de aceptación del yogurt con mezcla de prebióticos.

CONCLUSIONES

Para lograr dispersar los sólidos del yogurt (leche en polvo y prebióticos), fue necesario controlar la temperatura de la leche (60°C), evitando así, la formación de grumos, dando como resultado la mejora de la textura de los sistemas.

La inoculación con la cepa liofilizada de adición directa, se realizó después de un enfriado, hasta alcanzar una temperatura de 42°C, garantizando así la supervivencia de las BAL.

De las 12 formulaciones propuestas al inicio de la experimentación, solo se trabajó con las 3 que fueron seleccionadas por medio de evaluación sensorial, una por cada tipo de prebiótico (inulina, polidextrosa y mezcla).

De las 3 formulaciones adicionadas con inulina como prebiótico, resultó seleccionada la formulación con 2.5g/ 250ml de yogurt.

De las 3 formulaciones adicionadas con polidextrosa como prebiótico, resultó seleccionada la formulación con 4.0 g/ 250ml de yogurt.

De las 5 formulaciones adicionadas con mezcla de prebióticos, resultó seleccionada la formulación con 60% inulina- 40% polidextrosa.

Las formulaciones evaluadas en este trabajo, no presentaron el mismo comportamiento reológico de un yogurt comercial semejante. Sin embargo se obtienen fluidos dependientes del tiempo, con una tendencia tixotrópica, características en yogurt.

Los 3 sistemas estudiados se encuentran dentro de los parámetros marcados por la normatividad vigente en México en cuanto a AQP. El sistema adicionado con polidextrosa como prebiótico, presenta las mejores características, siendo este, el que presenta en la mayoría de los parámetros (mayor contenido de proteína, menor contenido de grasa...), una diferencia significativa, en comparación de los otros sistemas.

Los 3 sistemas estudiados cumplen con la normatividad vigente en México para yogurt, no presentando contaminación bacteriana alguna, demostrando con esto que el producto se elaboró bajo buenas prácticas de manufactura y es seguro para su consumo.

Durante, el monitoreo de la fermentación, se observó que el sistema adicionado con inulina como prebiótico, presentó un mejor aprovechamiento de este, puesto que las colonias de *Lactobacillus* incrementan su concentración hasta 6.9×10^8 UFC/mL; mientras que los *Streptococcus* no muestran preferencia por un prebiótico en especial desarrollándose de forma muy parecida en los 3 sistemas.

En los 3 sistemas analizados tanto los *Lactobacillus* como los *Streptococcus*, presentaron un comportamiento que se ajusta a la primera parte de una curva de crecimiento de microorganismos.

Los *Lactobacillus* aprovecharon mejor la inulina durante la fermentación

En cuanto, a la vida de anaquel todos los sistemas tienen un comportamiento similar a excepción del 4to día, donde el sistema adicionado con mezcla de prebióticos (60% inulina- 40% polidextrosa), tanto como para el conteo de *Lactobacillus*, así como de *Streptococcus*, presenta un incremento en dos escalas logarítmicas, en el número de colonias de BAL. Este comportamiento era esperado debido a la sinergia que se presenta entre las BAL al beneficiarse de la mezcla de prebióticos, tanto de origen natural, como sintético.

Como era de esperarse que durante el tiempo de almacenamiento (32 días), el pH, se reduce por la producción de ácido láctico producido por las BAL, al cabo de este periodo, se generó una ligera sinéresis y un aumento en la acidez del yogurt. A pesar de estas modificaciones en las características físico-químicas, el conteo microbiano de las BAL, se mantiene dentro de los parámetros marcados por la OMS como la cantidad necesaria de bacterias para ejercer efectos benéficos en el organismo.

Para corroborar que el producto ayuda a combatir infecciones causadas por microorganismos patógenos, se realizaron retos microbianos con una concentración de 10^8 UFC/ml de *E. coli*, logrando la inhibición total de esta bacteria en periodo de 12 a 14 días para los sistemas, resultando el sistema con mezcla de prebióticos (60% inulina-40% polidextrosa), el que inhibe a dicha bacteria en un menor tiempo (12 días), 8 días menos que lo reportado por otros autores para yogurt sin prebióticos.

Debido a que el yogurt simbiótico es un producto con valor agregado más alto que el de la leche, el segmento de mercado a quien este producto estaría dirigido es el medio alto.

En este estudio, el sistema adicionado con mezcla de prebióticos (60% inulina- 40% polidextrosa) es el que aporta una mayor funcionalidad, al comprobarse que éste, en comparación con los otros 3 sistemas, favorece el desarrollo de mayores cantidades de BAL, mejorando además la capacidad del yogurt para inhibir microorganismos patógenos.

De acuerdo a la encuesta realizada a consumidores, el producto adicionado con mezcla de prebióticos (60% inulina- 40% polidextrosa) presentó un nivel de aceptación del 64%, lo que indica que puede ser lanzado a la venta.

A pesar de que el sistema adicionado con polidextrosa resulta la opción más económica, el beneficio que aporta la mezcla de prebióticos a la salud del consumidor hace que por una diferencia de aproximadamente 30 centavos sea la opción más recomendable para su comercialización.

RECOMENDACIONES

Si se desea utilizar la misma materia prima, se recomienda utilizar un enmascarante de sabor, ya que al realizarse la prueba de aceptación, el 15% de los panelistas mencionó que el yogurt dejaba un resabio metálico, que asociaban con la leche en polvo.

También se recomienda fomentar el consumo de yogurt natural, evitando la adición de azúcares naturales y/o sintéticos. De no ser posible, agregar fruta o un edulcorante natural, en concentraciones que no afecten el sabor del producto al dejar un resabio desagradable.

No utilizar concentraciones elevadas de stevia para endulzar el yogurt, ya que, éste edulcorante tiende a desarrollar en los productos un sabor amargo. Este sabor no deseado se puede enmascarar al combinar stevia con otros edulcorantes.

Lanzar una campaña con los beneficios que otorga el consumo de prebióticos y probióticos en el organismo, debido a que en comerciales de televisión abierta, promueven varios productos adicionados con prebióticos, pero la población no tiene conocimiento de sus beneficios, ni de su origen.

Se recomienda concientizar al consumidor del origen del yogurt y la importancia de la refrigeración de los productos con prebióticos, debido a que durante esta experimentación se observó la venta de yogurts en las calles, plazas y comercio ambulante, sin ningún tipo de refrigeración y con exposición a los rayos solares, lo que modifica sus propiedades y reduce su funcionalidad.

Para reducir los costos, se recomienda comprar las materias primas, con los proveedores directamente y por mayoreo, ya que los costos revisados en este trabajo, son los costos por unidad comprada en centros comerciales.

Se recomienda para estudios posteriores utilizar distintos tipos de probióticos, encapsulamiento o recubrimiento de estos, para tener mayores parámetros de comparación.

BIBLIOGRAFIA CITADA

1. Palou, A. y Serra, F. (2000). Perspectivas Europeas sobre los alimentos funcionales. Alimentación, nutrición y salud. 7 (3), 76-90.
2. Olagnero, G., Abad, A., Bendersky, S., Genevois, C., Granzella, L. y Montonati, M. (2007). Alimentos funcionales: Fibra, prebióticos, probióticos y simbióticos. DIAETA. 25 (121), 20-33.
3. Silveira, M., Monereo, S. y Molina, B. (2003) Alimentos funcionales y nutrición óptima. ¿Cerca o lejos?. Revista española de salud pública. 77 (33), 317-331.
4. Aranceta, J. y Gil, A. (2010). Alimentos funcionales y salud en la etapa infantil y juvenil. Madrid. Ed. Médica panamericana.
5. Marín, Z., (2008). Elementos de nutrición humana. Costa Rica. Ed. Universidad Nacional Estatal a Distancia.
6. Bello, J. (2000). Ciencia Bromatológica. Madrid. Ediciones Díaz de Santos
7. Calvo, S., Gómez, C., López, C., Royo, M. (2011). Nutrición, Salud y Alimentos Funcionales, Madrid, UNED.
8. Astiasarán, I., Laceras, B., Ariño, A., y Martínez, J. (2003) Alimentos y nutrición en la práctica sanitaria. Madrid. Ediciones Díaz de Santos
9. Martínez, J., (2004). Alimentos funcionales: oferta actual y necesidad real para el consumidor. Nutrición y Dietética. 1(9), 33-42.
10. Reglero G. (2011). Los Alimentos Funcionales: Un Tesoro Cuestionado. Encuentros Multidisciplinarios. 13(37), 36-43.
11. Recio, I. y López-Fandillo, R. (2005). Ingredientes y Productos Lácteos Funcionales: Bases Científicas de sus Efectos en la Salud. Alimentos funcionales. Madrid. Fundación Española para la Ciencia y la Tecnología.
12. Soriano, C. (2009). Prebióticos, probióticos y simbióticos. Tópicos selectos de medicina interna, Gastroenterología. Perú. Sociedad Peruana de Medicina Interna.
13. Gibson, G. y M. Roberfroid. (1995). Dietary modulation of the human colonic microflora: introducing the concept of prebiotics. Journal of Nutrition. 125(6), 1401-1412.
14. Jaramillo, Z. (2007). Elaboración de yogurt simbiótico. Tesis para la obtención del título de Ingeniería en industrialización de alimentos. Universidad Tecnológica Equinoccial. Facultad de Ciencias de la Ingeniería.
15. Gotteland M. y Brunser, O. (2006). Efecto de un yogur con inulina sobre la función intestinal de sujetos sanos o constipados. Revista Chilena de Nutrición. 33(1). 553-560.
16. De las Cagigas, L. y Blanco, J. (2002). Prebiótico y Probiotico, una relación beneficiosa. Revista Cubana Alimentación y Nutrición. 16(1). 63-68
17. NOM-181-SFI-2010. Yogurt-Denominación, Especificaciones Físicoquímicas y Microbiológicas, Información Comercial y Métodos de prueba.
18. García-Garibay M., Revah S., Gómez I. (1992). Productos lácteos en biotecnología alimentaria. México. Ed. Limusa.
19. Profeco. (2002). Yogur. Revista del Consumidor. 304(6). 1-4.
20. Bello J., Lizeldi B., Gonzalez E., Manzo A., Nochebuena X., Quiñonez E. y Vazquez C. (2004). Productos lácteos: la ruta de la metamorfosis. Revista Digital Universitaria. 5(7). 2-14.
21. Quiminet.com.[en línea]. ¿Cuántos tipos de yogurt existen?. Fecha de publicación 29-Julio-2011.[Fecha de consulta 17 de marzo 2014]. Disponible en www.quiminet.com/.../cuantos-tipos-de-yogurt-existen-62842.html

22. Sabbag A., Gosta, S. (1995). Aceptabilidad sensorial de cuatro sabores de yogurt. La alimentación latinoamericana 209(1). 60-64.
23. Espinosa P., Villacrés E., Bautista C., Espín S. (1998). El uso del análisis sensorial para medir la aceptación de clones promisorios de Papa. Ecuador. Editorial AbyaYala
24. Watts B., Ylimaki G., Jeffery L., Elías L.(1992). Métodos sensoriales básicos para la evaluación de alimentos. Canadá. Centro Internacional de Investigaciones para el desarrollo.
25. Sancho, J., Bota,E. y de Castro, J.(2002). Introducción al análisis sensorial de los alimentos. México. Alfaomega.
26. Rojas W., Chacón A., Pineda M. (2007). Características del yogurt batido de fresa derivadas de diferentes proporciones de leche de vaca y cabra. Agronomía Mesoamericana. 18(2). 221-237.
27. Badui S. (1993). Química de los alimentos. Alhambra Mexicana. México.
28. Gómez M.(2013). Curso de tecnología de lácteos. Universidad Nacional Abierta y a Distancia. Escuela de Ciencias Básicas Tecnología e Ingeniería .Programa Tecnología de alimentos. Bogotá.
29. Valdéz J., Ludeña F., Idrogo G. (2005). Efecto del tiempo de almacenamiento de la leche cruda y la adición de cloruro de calcio en la viscosidad del yogurt batido. Universidad Nacional Agraria La Molina. 61(2).151-172.
30. Garibay M., Quintero R., López A.(1993).Biotechnología alimentaria. México. Limusa.
31. Díaz B., Sosa E., Vélez J.(2004).Efecto de la adición de fibra y la disminución de grasa en las propiedades fisicoquímicas del yogur. Revista Mexicana de Ingeniería Química. 3(3). 287-305.
32. Codex Standard 207-1999.Norma del Codex para las leches en polvo y la nata (crema) en polvo.
33. Bylund, G. y Tr. López, A. (2003). Manual de industrias lácteas. Madrid. Mundi-Prensa libros.
34. Ramírez J., Rosas P., Velázquez M., Ulloa J., Arce F. (2011). Bacterias lácticas: Importancia en alimentos y sus efectos en la salud. Revista Fuente. 2(7). 1-16
35. Gerdes, S. (2007) Sinergia simbiótica de prebióticos y probióticos. Revista Mundo lácteo y cárnico. (1) 6-10
36. Moore, W.and L. Moore.(1995). Intestinal floras of populations that have a high risk of colon cancer. AppliedEnvironmentalMicrobiology. 61(1).3202-3207.
37. Martínez, M., Pacho, S. y Vicario, S. (2007).Probióticos: potencial para prevenir y curar. Revista Complutense de Ciencias Veterinarias. 1(1). 573-583.
38. Larsson, S.; et al. (2008).Cultured milk, yogurt, and dairy intake in relation to bladder cancer risk in a prospective study of Swedish women and men. American Journal Clinical Nutrition. 8(1).1083-1087
39. Adolfsson, O.,Meydani, S. y Russel, R. (2004).Yogur and gut function. American JournalClinicalNutrition. 80(1). 245-256.
40. Mack D., Michail, S., Wei S., Mcdougall I., Hollingsworth M., (1999). Probiotics inhibit enteropathogenic E. coli adherence in vitro by introducing intestinal mucin gene expression. Gastrointestinal and Liver Physiology. 276 (4) 941-950.
41. Beg A., Ernstrom G., Davis M., Jorgensen E. (2008). Protons Act as a Transmitter for Muscle Contraction in C. elegans. Cell. 132(1). 149-160.
42. Tillisch,K., Labus, J., Kilpatrick,L., Jiang, Z., Stains, J., Ebrat, B., Guyonnet,D., Legrain-Raspaud, S., Trotin, B., Naliboff, B. y Mayeri, E.(2013). Consumption

- of Fermented Milk Product with Probiotic Modulates Brain Activity. Gastroenterology. 144(1).1394–1401
43. Mestres, J. y Romero del Castillo, R.,(). Productos lácteos. Tecnología.UPC
 44. Roberfroid M. (2002). Concepts and strategy of functional food science: The European perspective. American Journal of Clinical Nutrition. 71(1).1660-1664
 45. Niness, K. (1999). Breakfast foods and the health benefits of inulin and oligofructose. Cereal FoodsWorld .44(2). 79-81
 46. López M., Mancilla N., Mendoza G. (2003). Molecular structures of fructans from Agave tequilana Weber variety. azul. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 51(1). 7835–7840.
 47. AOAC. 1990. Official Methods of Analysis, 15th ed. Método 985.29. Association of Official Analytical Chemists, Maryland, USA.
 48. Pollock, C. y Jones, T. (1979). Seasonal patterns of fructan metabolism in forage grasses. New Phytologist Trust. 83(1). 9-15.
 49. Ibáñez, F., Torre, P. e Irigoyen, A., (2013). Aditivos Alimentarios. Revista de la Universidad Pública de Navarra. 8(1)
 50. García J. , Casado G., García J. (2013). Una visión global y actual de los edulcorantes. Aspectos de regulación. Nutrición hospitalaria. 28(4). 17-31.
 51. Kujur, R., Singh, V., Ram, M., Yadava, H., Singh, K., Kumari, S. y Roy, B.(2010).Antidiabetic activity and phytochemical screening of crude extract of Stevia rebaudiana in alloxan-induced diabetic rats. Pharmacognosy. 2(1). 258-253.
 52. Kolb, N., Herrera, L., Ferreira, D. y Uliana, R. (2001).Analysis of sweet diterpene glycosides from Stevia rebaudiana: Improved HPLC method. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 49(1). 4538–41
 53. Sharma, N., Causal, N., Chawla, A., Mohan, M., Sethi, A. y Sharma, Y. (2006) Stevia rebaudiana-A review. AgrobiosNewslett. 5(1).46–48.
 54. Soto, A. y Del Val, S. (2002). Extracción de los principios edulcorantes de la Steviarebaudiana. Revista de Ciencias Agrarias y Tecnología de los Alimentos. 20(1). 5-9.
 55. Lee, C., Wong, K., Liu, J., Chen, Y., Cheng, J. y Chan, P. (2001). Inhibitory effect of stevioside on calcium influx to produce anti-hypertension. Planta Médica. 67(1).796–799.
 56. De la Hunty A., Gibson S., Ashwell M.(2006). A review of the effectiveness of aspartame in helping with weight control. NutritionBulletin. 31(2). 115-118.
 57. Anton S., Martin C., Han H., Coulon S., Cefalu W., Geiselman P., Williamson D.(2010).Effects of stevia, aspartame, and sucrose on food intake, satiety, and postprandial glucose and insulin levels. Appetite. 55(1). 37-43.
 58. Chen, T., Chen, S., Chan, P., Chu, Y., Yang, H., Cheng, J.(2005) . Mechanism of the polyglycemic effect of stevioside, a glycoside of Stevia rebaudiana. Planta Médica. 71(1).108–113
 59. Chen, J., Jeppesen, P., Nordentoft, I. y Hermansen, K. (2007).Stevioside improves pancreatic cell function during glucotoxicity via regulation of acetyl-CoA carboxylase. American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism. 292(1).1906–1916.
 60. Caballero A., Lengomín M., Grillo M., Arcia J., León M. (1997). Análisis de riesgos y puntos críticos de control en la inspección sanitaria de los alimentos. Revista Cubana Alimentación y Nutrición. 11(1).61-71
 61. Peralta M.(2007).Prebióticos y probióticos ¿por qué nos conviene?. Revista especializada para profesionales de la salud. 43(1).

62. Tortora G., Funke B., Case C. (2007) Introducción a la microbiología. España. Ed. Médica Panamericana.
63. Revista colombiana de ciencias químico-farmacéuticas, 1989 Números 17-23 Universidad de Texas
64. Rodríguez E. (2005). Bacteriología General: Principios Y Prácticas de Laboratorio, Costa Rica. Ed. Universidad de Costa Rica.
65. Anzaloua A. (1994). La evaluación sensorial de los alimentos en la teoría y en la práctica. España. Ed. Acribia
66. Awadhal, N.K. y Singj C.P. (1985). A rheological model for milk products. Journal of Food Science. 50(1). 1611-1614.
67. Galvis E. (2009). Evaluación de la utilización de Stevia en Yogurt. Universidad Nacional de Colombia. Programa Interfacultades de Especialización en Ciencia y Tecnología de Alimentos. Bogotá.
68. Vázquez C., De Cos A., López C. (2005) Alimentación y nutrición: manual teórico-práctico. España. Ediciones Díaz de Santos.
69. V., Muller A., Henry CJ., (2013). Polydextrose: its impact on short-term food intake and subjective feelings of satiety in males—a randomized controlled cross-over study. European Journal of Nutrition. 52(3). 885-893.
70. Gauche, C., T. Tomazi, P. L. M. Barreto, P. J. Ogliari, and M. T. Bordignon-Luiz. (2009). Physical properties of yoghurt manufactured with milk whey and transglutaminase. Lebensmittel-Wissenschaft Technologie. 42(1). 239–243.
71. Domagała J. (2008). Sensory evaluation and rheological properties of yoghurts prepared from goat, cow and sheep milk. Department of Animal Products Technology, University of Agriculture, Cracow, Poland. 11(3)
72. Ulfman I. (1992). El Yogurt, Producto de enorme valor comercial. Carne y leche. 54(1). 36-38
73. Barrantes, X., Railey, D., Arias, M. y Chaves, C. (2010) Evaluación del efecto de cultivos probióticos adicionados a yogurt comercial sobre poblaciones conocidas de *Listeria monocytogenes* y *Escherichia coli O157:H7*. Revista Mundo lácteo y cárnico. 7-11
74. Calderón. (2007). Evaluation of the effect of *Lactobacillus rhamnosus* probiotic culture added to yogurt over *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli O157:H7*, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enteritidis* populations. Archivos Latinoamericanos de Nutrición. 57(1). 51-55.

ANEXO A

Determinación de acidez en cremas y productos lácteos fermentados y acidificados (apéndice normativo A, NOM-185-SSA1-2002)

1.1 Principio del método.

La acidez se mide con base a una titulación alcalimétrica con NaOH 0.1 N utilizando fenolftaleína como indicador.

1.2. Equipo.

1.2.1. Potenciómetro (opcional)

1.2.2. Balanza analítica con una precisión de 0,1 mg.

1.2.3. Agitador magnético

1.3. Materiales.

1.3.1. Probeta graduada de 100 mL.

1.3.2. Pipeta volumétrica de 9 mL (estándar para crema).

1.3.3. Matraz Erlenmeyer de 125 mL

1.3.4. Bureta de 25 o 50 mL graduada en 0.1 mL.

1.3.5. Barra magnética (opcional).

1.4. Reactivos.

Todos los reactivos deben ser grado analítico a menos que se indique otra especificación y por agua se entiende agua destilada recientemente hervida.

1.4.1. Solución de hidróxido de sodio (NaOH) 0.1 N valorada.

1.4.2. Solución indicadora de fenolftaleína (C₂₉H₁₄O₄) al 1%.

1.5. Procedimiento.

1.5.1. Medir 9 mL (si se emplea la pipeta estándar de crema) o pesar 18 g de muestra perfectamente mezclada en un matraz Erlenmeyer o una cápsula de porcelana. Si la muestra es medida volumétricamente, enjuagar la pipeta con veces su volumen de agua y adicionar los enjuagues al matraz o cápsula y mezclar bien.

1.5.2. Si la muestra es pesada, añadir 2 veces el peso de la misma en agua y mezclar bien.

1.5.3. Adicionar 0.5 mL de indicador de fenolftaleína y titular con solución de hidróxido de sodio 0.1 N hasta la aparición de un color rosa permanente por lo menos 30 segundos (se recomienda emplear siempre una cantidad constante de indicador ya que su concentración puede influir en los resultados).

1.5.4. Si la muestra es oscura o colorida, será necesario después de agregar agua, titular con ayuda de un potenciómetro a un pH de 8.3.

1.6. Cálculos.

% Acidez (expresada como ácido láctico) = $\frac{V \times N \times 9}{M}$

donde:

V = mL de NaOH 0.1 N gastados en la titulación.

N = Normalidad de la solución de NaOH

M = Volumen o peso de la muestra.

1.7. Expresión de resultados.

% Acidez tituable expresada como ácido láctico
--

Determinación de humedad en alimentos por tratamiento térmico. método por arena o gasa. (NOM-116-SSA1-1994)

5.1 Reactivos

Los reactivos que a continuación se mencionan deben ser grado analítico, cuando se indique agua, debe entenderse agua destilada.

Sílica gel con indicador de humedad.

Arena de mar purificada con ácido y calcinada (tamaño de partícula, 0,1 a 0,3 mm) o gasa.

Agua.

5.2 Materiales

Desecadores con placa.

Cápsulas de níquel, aluminio o vidrio de 20 mm de altura y 50 mm de diámetro, con tapa de 52 mm de diámetro por 6 mm de altura y base cóncava o plana según se requiera.

Varillas de vidrio de 4 mm de diámetro.

Pinzas para crisol.

Material común de laboratorio.

6 APARATOS E INSTRUMENTOS

Los aparatos que a continuación se indican deben estar calibrados y ser ajustados antes de su operación:

Baño maría, o bien, placa calefactora eléctrica termostatzada.

Balanza analítica con $\pm 0,1$ mg de sensibilidad.

Estufa con termostato para mantener una temperatura de 100 ± 2 °C.

7 PREPARACION DE LA MUESTRA

7.1 Preparación de las cápsulas. Para cada muestra preparar dos cápsulas y las tapas respectivas con las siguientes características:

Cápsulas de níquel, aluminio o vidrio, con 30 g de arena como máximo, o gasa recortada al tamaño del fondo de la cápsula y una varilla de vidrio de longitud apropiada para reposar oblicuamente en la cápsula sin que se impida el tapado de ésta. Secar previamente las cápsulas entreabiertas (con arena o gasa, varilla y tapas), durante un mínimo de 2 horas a 100 ± 2 °C, taparlas e introducir en un desecador y dejar enfriar a temperatura ambiente y pesar con precisión de 0,1 mg (masa M1)

7.2 Preparación de la muestra

Justo antes de tomar la muestra, homogeneizarla bien, si es necesario, colocar el envase original en baño maría a 40°C para poner en suspensión los componentes que hayan podido separarse. (Por ejemplo grasa y fibras).

8 PROCEDIMIENTO

8.1 Colocar en la cápsula preparada una cantidad de producto inferior a 10 g, volver a tapar la cápsula y pesar con precisión de 0,1 mg (masa M2).

Para que se cumpla el grado de precisión, se recomienda utilizar una cantidad de muestra superior a 1 g y en los productos heterogéneos utilizar de 3 a 5 veces más de la cantidad mínima propuesta.

8.2 Después de pesar, mezclar bien la muestra con arena o colocarla sobre la gasa. Si es necesario, añadir unos centímetros cúbicos de agua destilada, lo cual facilita una mezcla uniforme.

8.3 Si la muestra lo requiere, evaporar a sequedad, sin tapa, por medio de un baño maría o placa calefactora a un máximo de 100°C. Durante la evaporación, el contenido de la cápsula debe removerse de vez en cuando al principio y más a menudo al final. Evitar las pérdidas de sustancia y arena.

8.4 Introducir en la estufa las cápsulas con la muestra previamente evaporada, colocar las tapas de manera que al final del tiempo de secado puedan taparse rápidamente, cerrar la estufa y secar durante 4 horas a 100 ± 2 °C. Abrir la estufa, tapar las cápsulas y colocarlas en los desecadores, dejar enfriar hasta temperatura ambiente y pesar inmediatamente con precisión de 0,1 mg (masa M3).

9 EXPRESION DE RESULTADOS

9.1 Método de cálculo.

El contenido de humedad en la muestra se calcula con la siguiente fórmula expresada en por ciento:

$$\text{Humedad en \%} = \frac{M2 - M3}{M2 - M1} \times 100$$

En donde:

M1 = Peso de la cápsula con arena o gasa (g)

M2 = Peso de la cápsula con arena o gasa más muestra húmeda (g)

M3 = Peso de la cápsula con arena o gasa más muestra seca (g)

Nota: Indicar el valor medio de la determinación por duplicado con un decimal.

9.2 Grado de precisión

Repetibilidad: no debe exceder de 0,1 g por 100 g de muestra.

Si el producto es homogéneo y la diferencia excede 0,1 g/100 g, debe repetirse la determinación. Sin embargo para ciertas materias heterogéneas las diferencias admisibles pueden alcanzar de 0,3 a 0,5 g/100 g.

10 INFORME DE LA PRUEBA

Informar: humedad en %.

Determinación de proteínas por micro Kjeldahl. (Numeral 8.5, NOM-155-SCFI-2003)

8.5.1 Fundamento

Este método se basa en la descomposición de los compuestos de nitrógeno orgánico por ebullición con ácido

sulfúrico. El hidrógeno y el carbón de la materia orgánica se oxidan para formar agua y bióxido de carbono. El ácido

sulfúrico se transforma en sulfato, el cual reduce el material nitrogenado a sulfato de amonio.

El amoniaco se libera después de la adición de hidróxido de sodio y se destila recibiendo en una solución al 2%

de ácido bórico. Se titula el nitrógeno amoniacal con una solución valorada de ácido, cuya normalidad depende de la

cantidad de nitrógeno que contenga la muestra. En este método se usa el sulfato de cobre como catalizador y el

sulfato de potasio para aumentar la temperatura de la mezcla y acelerar la digestión.

8.5.2 Reactivos y materiales

8.5.2.1 Reactivos

- Acido sulfúrico concentrado al 98% (libre de nitrógeno)
- Hidróxido de sodio al 40%
- Sulfato de Potasio
- Sulfato de Cobre pentahidratado
- Acido bórico al 2%
- Solución de ácido clorhídrico 0,1N
- Indicador Wesslob
- Tabletillas Kjeldahl comerciales

8.5.2.2 Materiales

- Probeta de 50 mL
- Material común de laboratorio

8.5.3 Equipo

- Equipo de digestión con control de temperatura ajustable

- Unidad de destilación y titulación, para aceptar tubo de digestión de 250 mL y frascos para titulación de 500 mL

- Tubos de digestión y destilación

8.5.4 Preparación de la muestra

Agregar al tubo de digestión 12 g de sulfato de potasio y 1 g de sulfato de cobre pentahidratado. Calentar la leche

a $38^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Mezclar la muestra para homogeneizar. Pesar $5 \text{ mL} \pm 0,1 \text{ mL}$ de la muestra caliente e inmediatamente colocarla en el tubo de digestión. (Nota: Los pesos deben ser registrados con una exactitud de 0,0001 g). Adicionar 20 mL de ácido sulfúrico. Cada día se deberá correr un blanco (todos los reactivos sin muestra).

8.5.5 Procedimiento

8.5.5.1 Digestión

Al inicio se fija una temperatura baja en el equipo de digestión (180 a 230°C) para evitar la formación de espuma.

Se colocan los tubos, con el extractor conectado en el equipo de digestión. El vacío debe ser suficientemente bueno para eliminar los vapores. Digerir por 30 minutos o hasta que se formen vapores blancos. Incrementar la temperatura de 410 a 430°C y digerir hasta que se aclare la solución. Podría ser necesario incrementar la temperatura en forma gradual, cada 20 minutos, para el control de la espuma. Evitar que la espuma dentro del tubo alcance el extractor o llegue a una distancia de 4-5 cm del borde superior del tubo. Después de que la solución se aclare (cambio de color azul claro a verde), continúe la ebullición cuando menos por una hora. El tiempo aproximado de digestión es de 1,75 a 2,5 horas. Al término de la digestión, la solución debe ser clara y libre de material sin digerir. Enfriar la solución a temperatura ambiente (aproximadamente por 25 minutos). La solución digerida debe ser líquida con pequeños cristales en el fondo del tubo (la cristalización excesiva indica poco ácido sulfúrico residual al fin de la digestión y podría generar bajos resultados. Para reducir las pérdidas de ácido durante la digestión, reducir la tasa de extracción de vapores). Después de enfriar la solución a temperatura ambiente, adicionar 85 mL de agua (el blanco puede requerir 100 mL) a cada tubo, tape para mezclar y deje enfriar a temperatura ambiente.

Cuando se adiciona agua a temperatura ambiente se pueden formar algunos cristales, para después integrarse nuevamente a la solución; esto es normal. Los tubos se pueden tapar para llevar a cabo la destilación posteriormente.

8.5.5.2 Destilación

Coloque la solución de hidróxido de sodio al 50% (o 40%) en el depósito de álcali de la unidad de destilación.

Ajuste el volumen de dosificación a 55 mL de NaOH al 50% (65 mL en el caso de NaOH al 40%). Coloque el tubo de digestión que contiene la solución en la unidad de destilación. Coloque un matraz Erlenmeyer de 500 mL con 50 mL de la solución de ácido bórico al 4% con indicador sobre la plataforma de recepción, asegurando que el tubo del condensador se encuentre dentro de la solución de ácido bórico. Destilar hasta obtener un volumen de = 150 mL.

Retirar el matraz de recepción. Titular el destilado con HCl 0,1N utilizando el indicador Wesslob o el potenciómetro.

Registrar el volumen utilizado de HCl con una exactitud de 0,05 mL.

8.5.5.3 Correr como estándar glicina o triptófano y sulfato de amonio con pureza de 99% para determinar el porcentaje de recuperación del método.

% recuperación sulfato de amonio = 99%

Glicina = 98%

8.5.6 Cálculos y expresión de resultados

El nitrógeno presente en la muestra, expresado en porciento se calcula mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de nitrógeno} = \frac{V \times N \times 0,014 \times 100}{M}$$

Donde:

V es el volumen de ácido clorhídrico empleado en la titulación, en mL.

N es la normalidad del ácido clorhídrico.

M es la masa de la muestra en gramos.

0,014 son los miliequivalente del nitrógeno.

El porcentaje de proteínas se obtiene multiplicando el % de nitrógeno obtenido por el factor de 6,38.

Nota.- Para convertir el % de proteína a g/L debe aplicarse la siguiente fórmula:

Proteína en g/L = % de proteína x 10 x densidad de la leche

Método de Roese-Gottlieb (Hidrólisis alcalina). Para fórmulas para lactantes, fórmulas de continuación, leches en polvo, entre otros. (Apendice normativo C, NOM-086-SSA1-1994)

1.2.1 Fundamento

El método descrito es una modificación al de Roese-Gottlieb. Se utiliza amoniaco para suavizar la caseína, alcohol etílico para romper la emulsión y la combinación grasa-proteína, así como favorecer la extracción de la grasa por el éter etílico. Se usa también éter de petróleo que disminuye la solubilidad del éter etílico en la capa acuosa. Extraída la grasa ésta se estima por diferencia de peso.

1.2.2 Reactivos y materiales

1.2.2.1 Reactivos

Hidróxido de amonio G.R.

Alcohol etílico de 96°

Eter etílico (libre de peróxidos)

Eter de petróleo (P.E. 30 - 60°C)

1.2.2.2 Materiales

Tubos de Roese-Gottlieb o de Mojonier

Vasos de precipitados de 125 ml

Pipetas de 10 ml graduadas en 0,1 ml

Perlas de vidrio

1.2.3 Aparatos e instrumentos

Desecador

Estufa para secar que alcance una temperatura entre 70 a 80°C

Baño de agua caliente o placa caliente

Balanza analítica con sensibilidad de 0,1 mg

1.2.3 Procedimiento

1.2.3.1 Pesar de 1 a 2 g de muestra y colocarlos en el tubo, agregar 9 ml de agua hirviendo y agitar vigorosamente hasta que la muestra esté disuelta, enfriar a la temperatura ambiente. Agregar 1,5 ml de hidróxido de amonio y mezclar perfectamente. Agregar 10 ml de alcohol etílico, tapar y agitar fuertemente; agregar 25 ml de éter etílico, tapar y agitar vigorosamente por 90 segundos. Agregar 25 ml de éter de petróleo, tapar y volver a agitar suavemente por 90 segundos. Centrifugar a 600 rpm o dejar reposar hasta que el líquido superior esté prácticamente claro. Decantar la capa etérea en un vaso de precipitado a peso constante. Lavando el labio y el tapón del tubo

con una mezcla de partes iguales de los dos éteres. Agregar estos lavados al vaso. Repetir la extracción del líquido sobrante en el tubo, dos veces más utilizando 25 ml de cada disolvente. Efectuar una tercera extracción con 20 ml de cada disolvente. Evaporar los disolventes del vaso en una placa caliente o un baño de vapor, a una temperatura apropiada que permita la eficiente evaporación, secar la grasa en estufa a 80°C, enfriar y pesar.

1.2.3.2 Después de introducir el producto en el tubo Mojonnier, añadir aproximadamente 0,1 g de amilasa y un agitador magnético, para facilitar la suspensión, luego adicionar de 8 a 10 ml de agua destilada a 45°C, evitando que el nivel de agua suba demasiado.

Colocar el tubo Mojonnier tapado por 2 h al baño de agua a 65°C. Remuévase ligeramente de vez en cuando.

Comprobar que el almidón se haya degradado por completo: al añadir dos gotas de solución de yodo aproximadamente 0,1 N no debe formarse coloración azul. En caso contrario, volver a colocar el tubo al baño de agua hasta que desaparezca la coloración. Enfriar el tubo Mojonnier y continúe con el procedimiento.

1.2.4 Cálculos

$$\% G = \frac{PG \times 100}{Pm}$$

En donde:

% G = Por ciento de grasa

PG = Peso de la grasa extraída

PM = Peso de la muestra

1.2.5 Reproducción de la prueba

En la reproducción de la prueba, la diferencia máxima permisible para la determinación efectuada por duplicado, no debe ser mayor de 0,1%, en caso contrario se recomienda repetir la determinación.

Determinación de azúcares (Apendice normativo C, NOM-086-SSA1-1994)

2.1 Reductores directos y totales

2.1.1 Fundamento

La muestra primero se digiere para precipitar las proteínas, utilizando soluciones de acetato de zinc y ferrocianuro de potasio. En un volumen se determinan los azúcares reductores directos y otro volumen es hidrolizado con ácido clorhídrico para determinar los azúcares reductores totales mediante una valoración volumétrica según el método de Lane y Eynon.

2.1.2 Reactivos y materiales

2.1.2.1 Reactivos y soluciones

Acetato de zinc

Ferrocianuro de potasio

Sulfato de cobre pentahidratado

Acido acético glacial

Tartrato de sodio y potasio

Hidróxido de sodio (NaOH)

Sacarosa G.R.

Acido clorhídrico concentrado (HCl)

Solución alcohólica de fenolftaleína al 1%

Solución de hidróxido de sodio 1:1 m/v

Solución acuosa de azul de metileno al 0,2% ($C_{37}H_{27}N_3O_3 \cdot 2NaSO_3$).- Disolver 0,2 g de azul de metileno en agua y diluir a 100 ml.

Solución de acetato de zinc.- Disolver 21,9 g de acetato de zinc ($Zn(C_2H_3O_2)_2 \cdot 2H_2O$) cristalizado y 3 ml de ácido acético glacial en agua y diluir a 100 ml.

Solución de ferrocianuro de potasio ($K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$).- Disolver 10,6 g de $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$ en 100 ml de agua destilada.

Solución (A) de sulfato de cobre.- Disolver 34,639 g de sulfato de cobre pentahidratado ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$) en agua destilada y diluir a 500 ml utilizando un matraz volumétrico; filtrar a través de lana de vidrio.

Ajustar la solución, determinando el contenido de cobre en una alícuota con tiosulfato de sodio 0,1 N y ioduro de potasio al 20% hasta obtener 440 mg de cobre por cada 25 ml.

Solución (B) de Tartrato de sodio y potasio.- Disolver 173 g de tartrato de sodio y potasio ($KNaC_4H_4O_6 \cdot 4H_2O$) y 50 g de NaOH en agua y diluir a 500 ml; dejar reposar 2 días y filtrar a través de lana de vidrio.

Solución patrón de sacarosa.- Pesar 9,5 g de sacarosa ($C_{12}H_{22}O_{11}$) y disolver en 50 ml de agua, agregar 5 ml de HCl concentrado y diluir con agua a 100 ml. Guardar algunos días a temperatura ambiente (aproximadamente 7 días a 12-15°C o 3 días a 20-25°C o 15 min a 67°C) después de esta inversión diluir con agua a un litro (esta solución es estable por algunos meses en refrigeración).

Solución diluida de sacarosa.- Neutralizar una alícuota de 10 ml con NaOH 1 N y diluir a 100 ml con agua (1 ml= 1 mg de sacarosa)

2.1.2.2 Materiales

Matraz volumétrico de 100 y 250 ml

Matraz Erlenmeyer de 250 y 500 ml

Pipetas volumétricas de 5 y 50 ml

Vaso de precipitado de 50 ml

Bureta de 50 ml graduada en décimas

2.1.3 Aparatos e instrumentos

Placa caliente

Baño de agua con capacidad para mantener la temperatura a 70°C.

Balanza analítica con sensibilidad de 0,1 mg

2.1.4 Titulación de la solución A-B

Medir con pipeta volumétrica 5 ml de la solución A y 5 ml de la solución B en un matraz Erlenmeyer de 500 ml. Agregar 100 ml de agua, unos cuerpos de ebullición, calentar en parrilla cerrada a ebullición y agregar poco a poco con una bureta, solución patrón de sacarosa diluida, hasta la reducción total del cobre. Agregar 1 ml de la solución de azul de metileno. Continuar la titulación hasta la desaparición del color azul (mantener continua la emisión de vapor para prevenir la reoxidación del cobre o del indicador). Si el gasto es menor de 15 ml o mayor de 50 ml de la solución de azúcar invertido, hacer la dilución apropiada o reformulación para que quede dentro de ese rango. Calcular los mg de sacarosa que se necesitan para titular la solución A-B. Este valor corresponde al factor F del reactivo.

$$F = V_1 \times D_1$$

En donde:

F = Factor de Fehling para lactosa

V₁ = Volumen de la solución de sacarosa gastada en la titulación de la solución A-B en ml.

D₁ = Dilución de la solución de sacarosa en mg.

2.1.5 Procedimiento

2.1.5.1 Determinación de reductores directos

Pesar de 10-12 g de muestra finamente molida en un vaso de precipitado de 50 ml transferir cuantitativamente con 200 ml de agua destilada caliente a un matraz volumétrico de 250 ml, mezclar y dejar reposar 30 min agitando ocasionalmente. Agregar 4 ml de la solución de acetato de zinc, mezclar, agregar 4 ml de solución de ferrocianuro de potasio y mezclar. Diluir a la marca y filtrar.

Colocar el filtrado en una bureta y proceder como se indica en 2.1.4 usando el filtrado obtenido en lugar de la solución patrón de sacarosa.

2.1.5.2 Determinación de reductores totales

Tomar 25 ml del filtrado y pasar a un matraz volumétrico de 100 ml. Agregar 20 ml de agua, 10 ml de ácido clorhídrico concentrado y mezclar. Colocar el matraz con un termómetro sumergido en la solución en un baño de agua a 70°C y mantener por un periodo de 15 min contados a partir del momento en que la temperatura interna alcance 96°C. Enfriar inmediatamente, agregar unas gotas de fenolftaleína, neutralizar con solución de NaOH, enfriar y llevar a la marca.

Colocar la solución en una bureta y proceder como se indica en 2.1.4, usando la solución obtenida en lugar de la solución patrón de sacarosa.

2.1.6 Cálculos

% de Reductores Directos = $250 \times 100 \times F$

(en sacarosa) $V \times PM$

En donde:

V = ml gastados de la muestra para titular la solución A-B según 2.1.5.1

PM= Peso de la muestra en g

F = Factor del reactivo de Fehling en g de sacarosa

Determinación de fibra dietaria Método Enzimático (AOAC 985.29 1990)

Muestras en duplicado de alimentos secos y desgrasados son gelatinizados con amilasa térmicamente estable y luego digeridas enzimáticamente con proteasa y amiloglucosidasa para remover la proteína y el almidón. La fibra dietética soluble es precipitada por la adición de etanol, el residuo total se filtra, se lava, se seca y se pesa. En el residuo en duplicado se determina proteína, y en el otro cenizas.

Fibra dietética total = Peso del residuo - Peso (proteína + cenizas).

6.0. MATERIALES, INSUMOS Y EQUIPOS

6.1. Materiales y Equipos

6.1.1. Balanza analítica, con sensibilidad de 0,1 mg.

6.1.2. Baños termorregulados: (a) a ebullición y (b) ajustable a 60 °C con agitación directa en el interior de cada matraz de digestión para dar un movimiento constante al matraz de digestión durante la hidrólisis enzimática.

6.1.3. Bomba de vacío.

6.1.4. Crisol con placa porosa, porosidad N° 2 o equivalente de 40 - 60 mm.

6.1.5. Desecador con silicagel o similar.

6.1.6. Estufa de vacío a 70 °C o alternativamente estufa de aire de acuerdo a lo indicado en la referencia.

6.1.7. Mufla a 525 °C.

6.1.8. Tamiz de 0,3 - 0,5 mm.

6.1.9. Vasos de precipitados altos de 400 a 600 mL.

6.1.10. pHmetro.

6.1.11. Homogenizador.

6.1.12. Material usual de laboratorio.

6.2. Reactivos

6.2.1. Etanol al 95 %, p.a.

6.2.2. Etanol al 78 %. Mezclar un volumen de agua con cuatro volúmenes de etanol al 95 %.

6.2.3. Acetona p.a.

6.2.4. Tampón fosfato 0,08 M, pH 6,0:

Disolver 1,4 g de fosfato dibásico de sodio anhidro (Na_2HPO_4) (o 1,753 g dihidratado) y 9,68 g de fosfato monobásico de sodio monohidratado (NaH_2PO_4) (o 10,94 g dihidratado) en alrededor de 700 ml de agua. Diluir a 1 L con agua. Chequear el pH con pHmetro.

6.2.5. a - amilasa termoestable. Mantener refrigerada.

6.2.6.- Proteasa. Mantener refrigerada.

6.2.7. Amiloglucosidasa. Mantener refrigerada.

6.2.8. Hidróxido de sodio 0,275 N. Disolver 11,00 g de NaOH en 700 ml de agua en un matraz volumétrico de 1 L. Diluir a volumen con agua.

6.2.9. Acido clorhídrico 0,325 N Diluir una solución stock de HCl de título conocido. por ejemplo, 325 mL de HCl 1 N a 1 L con agua.

6.2.10. Celite C - 211, lavado con ácido.

6.2.11. Eter de petróleo.

7.2. Preparación de la muestra y extracción

7.2.1. Homogeneizar, secar y moler la muestra en un homogenizador.

7.2.2. Pasar por un tamiz de malla de 0,3 - 0,5 mm.

7.2.3. Extraer con éter de petróleo sí el contenido de grasa es superior al 10 %, tres veces con porciones de 25 mL / g de muestra.

7.2.4. Anotar la pérdida de peso por la remoción de la grasa y considerarlo en el cálculo final.

7.3.- Determinación

7.3.1. Pesar en duplicado alrededor de 1 g de muestra en un vaso de precipitados de 400 mL.

El peso de las muestras no debe diferir en más de 20 mg. Registrar m.

7.3.2. Agregar 50 mL de tampón fosfato pH 6,0 a cada vaso.

7.3.3. Controlar el pH y ajustar a $\text{pH } 6 \pm 0,2$ si fuese necesario.

7.3.4. Adicionar 0,1 mL de la solución de a amilasa. Cubrir el matraz con papel aluminio, colocarlo en un baño de agua y hervir durante 15 minutos. Agitar a intervalos de 5 minutos. El contenido debe llegar a 95 - 100 °C.

7.3.5. Enfriar la solución a temperatura ambiente.

7.3.6. Ajustar pH a $7,5 \pm 0,2$ con aproximadamente 10 mL NaOH 0,275 N.

7.3.7. Adicionar 5 mg de proteasa. Cubrir el matraz con papel aluminio e incubar 30 minutos a 60 °C con agitación continua.

7.3.8. Enfriar y añadir 10 mL de HCl 0,325 N.

7.3.9. Medir el pH y agregar gotas de ácido sí fuese necesario. El pH final debe ser 4,0 - 4,6.

7.3.10. Añadir 0,3 mL amiloglucosidasa, cubrir con papel aluminio e incubar 30 minutos a 60°C con agitación continua.

7.3.11. Adicionar 280 mL de etanol al 95 % precalentado a 60 °C.

7.3.12. Dejar precipitar a temperatura ambiente por 60 minutos.

7.3.13. Pesar el crisol que contiene celite, humedecerlo y redistribuir el celite en el crisol usando etanol al 78 % y aplicar succión.

- 7.3.14.** Mantener la succión y transferir cuantitativamente el precipitado al crisol.
- 7.3.15.** Lavar el residuo sucesivamente con tres porciones de 20 mL de etanol al 78 %, dos porciones de 10 mL de etanol al 95 % y dos porciones de 10 mL de acetona. Se puede formar goma con algunas muestras, atrapando el líquido. Si así fuera, rompa la película de la superficie con espátula para mejorar el filtrado. El tiempo de filtración y lavado variará de 0,1 a 6 horas, con un promedio de 1 1/2 hora por muestra. Se pueden evitar tiempos largos de filtración, mediante una succión intermitente y cuidadosa.
- 7.3.16.** Secar el crisol que contiene el residuo durante la noche en estufa de vacío a 70 °C o en estufa de aire a 105 °C.
- 7.3.17.** Enfriar en desecador y pesar. Restar el peso del crisol y del celite para determinar el peso del residuo. Registrar m1.
- 7.3.18.** Analizar proteínas usando N x 6,25 como factor de conversión en el residuo de una de las muestras de los duplicados. Registrar P.
- 7.3.19.** Calcinar el residuo de la segunda muestra del duplicado durante 5 horas a 525 °C.
- 7.3.20.** Enfriar en desecador y pesar.
- 7.3.21.** Restar el peso del crisol y del celite para determinar cenizas. Registrar C.
- 7.3.22.** Efectuar la determinación del blanco en duplicado y en las mismas condiciones descritas en el procedimiento para el análisis de muestras.
- 7.4. Cálculo e informe de resultados**
- 7.4.1.- Determinación del blanco:**
 $B = \text{blanco, mg} = \text{masa del residuo} - PB - CB$
 Donde:
 - Masa del residuo = promedio de masa del residuo (mg) para la determinación blanco.
 - PB y CB = masa (mg) de proteína y cenizas, respectivamente en los residuos de los blancos.
- 7.4.2.- Cálculo de fibra dietética total:**
 $\% \text{ FDT} = [(\text{masa del residuo} - P - C - B) / \text{masa de la muestra}] \times 100$
 Donde :
 - m = masa de la muestra = promedio de la masa de 2 muestras (mg).
 - m1 = masa del residuo = promedio de las masas de las muestras determinadas en duplicado (mg).
 - P y C = masa (mg) de proteína y cenizas, respectivamente en los residuos de las muestras.
 - B = blanco, indicado en
- 7.4.1.** Promediar los valores obtenidos y expresar el resultado con dos decimales.
 Repetibilidad: La diferencia de los resultados no deberá ser superior al 5 % del promedio.
 Informar el % de fibra al 0,1 %, sobre la base de la muestra original considerando que ha sido desgrasada en el caso de contener más de 10 % de grasa.

Determinación de cenizas totales (NMX-F-284-SCFI-2011)

FUNDAMENTO

Se basa en la medida del peso de los óxidos residuales de la calcinación, en una mufla a una temperatura de 650 °C ± 25 °C.

4 MATERIALES

- Cápsulas de aluminio, porcelana o platino;

- Crisol de platino o porcelana;
- Pinzas para crisol, y
- Desecador.

5 INSTRUMENTOS

- Balanza con sensibilidad de $\pm 0,0001$ g. Este instrumento debe contar con informe vigente de calibración y/o verificación con patrones certificados, y
- Mufla con indicador y control de temperatura.

6 PROCEDIMIENTO

6.1 Poner el crisol en la mufla durante una hora a una temperatura de $650\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 25\text{ }^{\circ}\text{C}$. Transcurrido este tiempo apagarla y esperar a que baje la temperatura a $150\text{ }^{\circ}\text{C}$.

6.2 Abrir la mufla y con ayuda de las pinzas retirar los crisoles y colocarlos en el desecador hasta temperatura ambiente, pesar el crisol y anotar el peso.

6.3 Extraer la porción de muestra por analizar.

6.4 Llevar a base seca la muestra de carbón.

6.5 Colocar en el crisol 0,1 g de carbón, referido a base seca.

NOTA 1: Cuando se analice carbón granular, debe molerse la muestra después de llevar a base seca y antes de determinar el peso para proceder a efectuar la determinación del contenido total de cenizas. Moler hasta lograr un tamaño de partícula similar al del carbón pulverizado.

6.6 Colocar el crisol con la muestra en la mufla a la temperatura de $650\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 25\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante un tiempo de 3 horas a 16 horas, dependiendo del tipo de carbón, hasta llegar a peso constante y sacarlo para colocarlo en el Desecador.

Tabla1.- Diversos tipos de carbón

Tipo de Carbón Tiempo Aproximado

Carbón Vegetal 4 horas

Carbón Mineral 5 horas

Carbón de Hueso Animal 5 horas

Algunos carbones (ya trabajados) pueden arder espontáneamente, en este caso se debe colocar la muestra en la mufla fría y luego llevarla a la temperatura de $650\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 25\text{ }^{\circ}\text{C}$.

6.7 Determinar el peso a la temperatura ambiente.

7 EXPRESIÓN DE RESULTADOS

$$\% \text{ de cenizas totales (en base seca)} = \frac{100 (A - B)}{P}$$

Donde:

A es el peso en g del crisol con cenizas.

B es el peso en g del crisol vacío.

P es el peso en g de la muestra (en base seca).

8 REPETIBILIDAD

La diferencia entre los resultados sucesivos obtenidos con el mismo método, sobre materiales de prueba idénticos y bajo las mismas condiciones no debe exceder de 5 %, en caso contrario, deben repetirse las determinaciones. El resultado final será el promedio de estos último.

ANEXO B

Enumeración de microorganismos característicos del yogur por la técnica de conteo de colonias a 37 °C (NMX-703-COFOCALEC-2004)

8.3.1 Alcance

Este procedimiento establece un método para la enumeración de microorganismos característicos en yogur por medio de la técnica de conteo de colonias a 37 °C. El método es aplicable a los productos en los cuales los microorganismos característicos (*Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*) están presentes y viables.

8.3.2 Términos y definiciones

Para los propósitos de este procedimiento, aplican los siguientes términos y definiciones.

8.3.2.1 Microorganismos característicos del yogur

Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus y *Streptococcus thermophilus* son detectados bajo las condiciones establecidas en este procedimiento.

8.3.2.2 *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*

Microorganismo termofílico el cual forma colonias lenticulares, con frecuencia puntiagudas, de 1 a 3 mm de diámetro en medio MRS acidificado bajo las condiciones establecidas en este procedimiento.

NOTA Bajo el microscopio, estos microorganismos aparecen como barras, generalmente cortas, pero a veces en formas más largas. No forman esporas, son Gram positivos, inmóviles y catalasa negativo.

8.3.2.3 *Streptococcus thermophilus*

Microorganismo termofílico que forma colonias lenticulares de 1 a 2 mm de diámetro en medio el M17 bajo las condiciones establecidas en este procedimiento.

NOTA Bajo el microscopio estos microorganismos aparecen en forma esférica o células ovaladas (de 0,7 µm a 0,9 µm de diámetro) en pares o cadenas largas. Ellos son Gram positivos y catalasa negativos.

8.3.3 Fundamento

8.3.3.1 Diluciones decimales de la muestra de prueba se inoculan en:

a) medio MRS acidificado, seguida de incubación anaerobia a 37 °C + 1 °C durante 72 h, para el recuento de *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*

b) medio M17, seguida de incubación aerobia a 37 °C + 1 °C durante 48 h, para el recuento de *Streptococcus thermophilus*.

8.3.3.2 Recuento y confirmación de las colonias por medio de pruebas apropiadas.

8.3.3.3 El número de microorganismos característicos por gramo de la muestra se calcula a partir del número de colonias obtenidas de las placas cuya dilución brinde un resultado significativo.

8.3.4 Reactivos, medios de cultivo, diluyentes y materiales

Utilice solamente reactivos de grado analítico reconocido, a menos que se especifique de otro modo, y agua destilada o desmineralizada o agua de pureza equivalente.

8.3.4.1 Diluyente

8.3.4.1.1 Agua peptonada

8.3.4.1.1.1 Composición

Ingrediente	Cantidad
Peptona	1,0 g
Cloruro de sodio	8,5 g
Agua	1 L

8.3.4.1.1.2 Preparación

Disolver los componentes en 1 litro de agua.

Distribuir en porciones de 99, 90 y 9 ml o en cualquier volumen múltiplo de nueve según se requiera.

Esterilizar a 121 °C + 1,0 °C durante 15 minutos.

Después de la esterilización, el pH y los volúmenes finales de la solución de trabajo deberán ser iguales a los iniciales.

Si este diluyente no es usado inmediatamente, almacenar en lugar oscuro a una temperatura de 2 °C a 4 °C por un tiempo no mayor de un mes, en condiciones tales que no alteren su volumen o composición.

8.3.4.2 Medios de cultivo

Utilizar medios de cultivo recientemente preparados (MRS y M17) protegidos de la luz solar directa. Si los medios de cultivo preparados no se utilizan inmediatamente, salvo que exista alguna otra indicación, deben ser almacenados en refrigeración de 2 °C a 4 °C por no más de 1 semana y bajo condiciones que no produzcan ningún cambio en su composición.

8.3.4.2.1 Medio MRS acidificado

8.3.4.2.1.1 Composición

Ingrediente	Cantidad
Peptona 1 (digerido trípico de caseína)	10,0 g
Extracto de malta	10,0 g
Extracto de levadura (seca)	5,0 g
Glucosa (C ₆ H ₁₂ O ₆)	20,0 g
Tween 80 (mono-oleato de sorbitol)	1,0 mL
Ortofosfato ácido de potasio (K ₂ HPO ₄)	2,0 g
Acetato de sodio trihidratado(CH ₃ CO ₂ Na.3H ₂ O)	5,0 g
Citrato de amonio [C ₆ H ₆ O ₇ (NH ₄) ₂]	2,0 g
Sulfato de magnesio heptahidratado(MgSO ₄ .7H ₂ O)	0,2 g
Sulfato de manganeso tetrahidratado (MnSO ₄ .4H ₂ O)	0,05 g
Agar	9,0 a 18,0 g

1) Agua (la suficiente para) 1 000 mL

1) Depende de la firmeza del gel que forme el agar utilizado, seguir las instrucciones del fabricante.

8.3.4.2.1.2 Preparación

Disolver por separado cada uno de los componentes en un baño de agua hirviendo.

Enfriar en otro baño de agua a 50 °C. Ajustar el pH por la adición de ácido acético, a fin de que después de la esterilización, sea de 5,4 + 0,1 a 25 °C + 1 °C, comprobando con un pHmetro.

Transferir el medio en porciones de 100 mL en botellas con capacidad de 150 mL o en porciones de 200 mL en botellas de 250 mL.

Esterilizar en autoclave a 121 °C + 1 °C por 15 minutos.

NOTA 1 El medio MRS es altamente sensible a diferencias en el tratamiento térmico causadas por el autoclave utilizada.

NOTA 2 Pruebas comparativas han demostrado que el medio MRS comercialmente disponible puede dar recuentos menores que los obtenidos con el medio MRS preparado de acuerdo con este procedimiento. Por lo tanto, si es utilizado, se debe comprobar contra el medio preparado según este procedimiento o mediante pruebas de promoción de crecimiento microbiano.

Antes de comenzar la evaluación bacteriológica, fundir totalmente la cantidad requerida de medio en un baño de agua hirviendo, o calentar al vapor en un envase parcialmente cerrado. Posteriormente enfriar en otro baño de agua

45 °C + 1 °C. El medio de cultivo no debe fundirse más de una vez.

8.3.4.2.2 Medio M17

8.3.4.2.2.1 Medio básico

8.3.4.2.2.1.1 Composición

Ingrediente Cantidad

Peptona 1 (digerido tripsico de caseína) 2,5 g

Peptona 2 (digerido pépsico de carne) 2,5 g

Peptona 3 (digerido papaínico de soya) 5,0 g

Extracto de levadura (seca) 2,5 g

Extracto de carne 5,0 g

Sal disódica de Glicerofosfato (C₃H₇O₆PNa₂) 19,0 g

Sulfato de magnesio heptahidratado (MgSO₄.7H₂O) 0,25 g

Ácido Ascórbico (C₆H₈O₆) 0,50 g

Agar 9,0 a 18,0 g 1)

Agua la suficiente para 950 MI

8.3.4.2.2.1.2 Preparación

Disolver por separado cada uno de los componentes en un baño de agua hirviendo. Enfriar en otro baño de agua a 50 °C.

Ajustar el pH con NaOH 0,1 M ó HCl 0,1 M ó CH₃COOH glacial, a fin de que después de la esterilización, sea de 6,8 + 0,1 a 25 °C + 1 °C, comprobando con un pHmetro.

Transferir el medio en porciones de 95 mL en botellas con capacidad de 150 mL.

Esterilizar en autoclave a 121 °C + 1 °C por 15 minutos.

8.3.4.2.2.2. Solución de lactosa

8.3.4.2.2.2.1. Composición

Ingrediente Cantidad

Lactosa (C₁₂H₂₂O₁₁) 10,0 g

Agua la suficiente para 100 mL

8.3.4.2.2.2.2. Preparación

Disolver la lactosa en el agua. Diluir con agua a 100ml. Esterilizar en autoclave a 121 °C ± 1 °C por 15 minutos.

8.3.4.2.2.3 Medio completo (M17)

8.3.4.2.2.3.1. Composición

Ingrediente Cantidad

Medio básico (8.3.4.2.2.1) 95,0 mL

Solución de lactosa (8.3.4.2.2.2) 5,0 mL

8.3.4.2.2.3.2. Preparación

Inmediatamente antes de usar, fundir el medio básico en un baño de agua hirviendo.

Enfriar en otro baño de agua a 50 °C.

Precalentar la solución de la lactosa a la temperatura del medio básico y mezclar girando.

Enfriar el medio en baño de agua entre 44 °C y 47 °C.

NOTA 1 El medio M17 completo comercialmente disponible, como en el caso del medio MRS comercialmente disponible, puede dar resultados significativamente diferentes entre proveedores. Por lo que, si es utilizado, se debe comprobar contra medio M17 preparado según este procedimiento o mediante pruebas de promoción de crecimiento microbiano.

NOTA 2 El medio de cultivo base no debe fundirse más de una vez.

8.3.4.3 Reactivos para ajustar el pH

8.3.4.3.1 Solución de hidróxido de sodio, $c(\text{NaOH}) = 0,1 \text{ mol/L}$ aproximadamente

8.3.4.3.2 Ácido clorhídrico diluido, $c(\text{HCl}) = 0,1 \text{ mol/L}$ aproximadamente

8.5.4.3.3 Ácido acético (CH₃COOH), 100% (glacial).

8.3.4.4 Reactivo para teñir, solución etanólica de azul de metileno, 6 g/L

8.3.4.5 Reactivo para limpiar la superficie del envase, etanol al 70 % (v/v)

8.3.5 Materiales

Todo el material e instrumentos que tengan contacto con las muestras bajo estudio, el diluyente, las diluciones o los medios de cultivo, deberán esterilizarse mediante:

a) Horno, durante 2 h a 170 a 175°C ó 1 h a 180°C, o

b) Autoclave, durante 15 minutos como mínimo a 121 ± 1,0°C.

El material de vidrio puede sustituirse por material desechable que cumpla con las especificaciones deseadas. No debe usarse material de vidrio dañado por esterilización repetida y éste debe ser químicamente inerte.

8.3.5.1 Botellas de dilución, con capacidad de 50 mL a 250 mL, o tubos de prueba de 18X180 mm con tapón de goma o sintético.

8.3.5.2 Frascos o botellas, con tapón de goma con capacidad de 150 mL a 250 mL.

8.3.5.3 Tubos de prueba, con tapón, con capacidad para contener aproximadamente 20 mL de medio de cultivo.

8.3.5.4 Pipetas graduadas, para uso bacteriológico, esterilizadas y calibradas, capaces de entregar 1 mL ± 0,02 mL y 10 mL ± 0,2 mL.

8.3.5.5 Cajas petri, de vidrio o de plástico incoloras, de 90 mm y 140 mm de diámetro, y profundidad interna de 10 mm mínimo. El fondo no deberá tener irregularidades que interfieran con el conteo de colonias.

8.3.5.6 Espátula, de vidrio o metal, esterilizada.

8.3.5.7 Utensilios para la obtención de muestras: cuchillos, cucharas, espátulas, tijeras, etc.

8.3.6 Equipo

8.3.6.1 Horno para esterilizar que alcance una temperatura mínima de 170 °C.

8.3.6.2 Olla de presión o autoclave con termómetro y manómetro, calibrada con termómetro de máximas y mínimas.

8.3.6.3 Incubadora, capaz de operar a 37 °C + 1 °C.

8.3.6.4 Gabinete de incubación anaerobia o jarras de anaerobiosis, capaz de mantenerse a 37 °C + 1 °C y proporcionar una atmósfera de 90 % nitrógeno y 10 % bióxido de carbono.

8.3.6.5 Mezclador, tipo mezclador peristáltico de bolsas de plástico estériles, o mezclador rotatorio capaz de funcionar a una frecuencia mínima de 20 000 revoluciones/min, con tubos de centrífuga de fondo redondeado de 200 mL estériles hechos del cristal consolidado, o envases metálicos de capacidad apropiada.

8.3.6.6 Mezclador de tubos tipo vortex.

8.3.6.7 Contador de colonias de campo oscuro, con luz adecuada, placa de cristal cuadrada y lente amplificador.

8.3.6.8 Lente amplificador x 8 a x 10.

8.3.6.9 Baños de agua, capaces de operar entre 44 °C y 47 °C, a 45 °C ± 1 °C, a 50 °C ± 1 °C y capaz de contener agua hirviendo.

8.3.6.10 PH-metro, con compensador de temperatura y exactitud de ± 0,1 unidades de pH a 25 °C ± 1 °C.

8.3.6.11 Microscopio óptico.

8.3.6.12 Balanza con sensibilidad de 0,1 g.

8.3.7 Muestreo

Es importante que el laboratorio reciba muestras que sean representativas y que no hayan sufrido alteración durante su transporte o almacenamiento.

8.3.8 Preparación de la muestra

Tomar las siguientes precauciones antes de abrir el envase del yogur. Limpie la superficie externa que rodea el área de la cual la muestra debe ser tomada, a fin de retirar cualquier material que pudiera contaminar la muestra.

La superficie debe limpiarse con etanol al 70 % para prevenir contaminación adicional. Abra el envase asépticamente.

8.3.9 Procedimiento

8.3.9.1 Preparación de la porción de prueba

8.3.9.1.1 Yogur sin fruta

Mezclar cuidadosamente el contenido del envase de muestra. Pesar 10 g + 0,1 g de la muestra de prueba en un recipiente adecuado.

8.3.9.1.2 Yogur con fruta

Mezclar por completo el contenido del envase de muestra durante 1 minuto, utilizando el mezclador. Pesar 10 g ± 0,1g de la muestra de prueba en un recipiente adecuado.

8.3.9.2 Examen microscópico

Realizar un examen microscópico preliminar, observando varios campos de un frotis de la muestra, teñido previamente con azul de metileno, a fin de estimar la densidad de los dos tipos de bacterias presentes en la muestra, cocos y bacilos, y seleccionar el rango de diluciones apropiadas para el recuento de cada tipo.

8.3.9.3 Preparación de la dilución primaria

Agregar el diluyente a la porción de prueba hasta que la masa de la porción de ensayo y diluyente sea de 50 g. Mezclar por 1 minuto con el mezclador.

Diluir a 100 g con el diluyente para obtener una dilución 10^{-1} .

8.3.9.4 Preparación de diluciones decimales

Preparar la muestra y las diluciones decimales necesarias para el conteo de microorganismos, de acuerdo a lo establecido en la NOM-110-SSA1-1994 “Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico”.

8.3.9.5 Duración del procedimiento

El tiempo transcurrido entre la preparación de la dilución primaria y el momento en el que se vierte el medio de cultivo no debe exceder de 20 minutos.

8.3.9.6 Inoculación e incubación

8.3.9.6.1. Proceder por duplicado (para ambos *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* y *S. thermophilus*), transferir con una pipeta estéril 1 mL de cada dilución a cajas Petri.

8.3.9.6.2. Para *L. delbrueckii subsp. bulgaricus*, vaciar 15 mL de medio MRS acidificado, mantenido a 45 °C, dentro de cada caja Petri.

8.3.9.6.3 Para *thermophilus*, vaciar 15 mL de medio M17, mantenido entre 44 °C y 47 °C, dentro de cada caja Petri.

8.3.9.6.4. Inmediatamente después del vaciado, mezclar cuidadosamente el inóculo con el medio por rotación de las cajas Petri. Permitir que la mezcla solidifique dejando las cajas petri sobre una superficie horizontal fresca.

8.3.9.6.5. Incubar las cajas Petri preparadas en posición invertida. Apilar no más de seis cajas Petri. Las filas deben separadas unas de otras, así como de las paredes y puerta de la incubadora.

8.3.9.6.6 Incubar las cajas Petri para el recuento de *L. delbrueckii subsp. Bulgaricus* en jarra o gabinete de anaerobiosis a 37 °C durante 72 horas.

8.3.9.6.7 Incubar las cajas Petri para el recuento de *S. Thermophilus* a 37 °C durante 48 horas.

8.3.9.7 Recuento de colonias

8.3.9.7.1 Después del periodo especificado de incubación contar las colonias que presenten las características de cada microorganismo (*L. delbrueckii subsp. bulgaricus*

and *S. thermophilus*) en las placas que tengan entre 15 y 300 colonias (Ver NOTAS informativas sobre el procedimiento).

NOTA Si ocurren problemas en el recuento de *L. delbrueckii subsp. Bulgaricus* cuando se utiliza medio MRS, puede utilizarse el medio LBA desarrollado por NIZO1; ver NOTAS informativas sobre el procedimiento.

8.3.9.7.2 Examinar las placas bajo luz tenue. Para facilitar el conteo, es conveniente utilizar el equipo contador de colonias. Tomar el cuidado para no confundir las partículas de la muestra sin disolver o material precipitado con colonias en forma de punta de alfiler. Examinar los elementos dudosos cuidadosamente, usando lente de aumento, para distinguir las colonias de la materia extraña.

8.3.9.8 Confirmación

Seleccionar de las placas utilizadas para el conteo el número de colonias que sea igual a la raíz cuadrada del total de colonias contadas. Hacer un frotis de estas colonias y teñirlo por el método de Gram, y confirmar que no son formadoras de esporas, son bacilos Gram-positivo, catalasa negativo (en el caso de aquellas que crecieron en el medio MRS), y cadenas de cocos o diplococos Gram-positivo, catalasa negativo (en el caso de aquellas que crecieron en el medio M17).

8.3.10 Cálculos y expresión de resultados

8.3.10.1 Cálculos

8.3.10.1.1 Utilizar las cuentas obtenidas de las placas que contienen entre 15 y 300 colonias.

8.3.10.1.2 Calcular el número de cada microorganismo característico en la muestra utilizando la siguiente ecuación:

$$N = \frac{C}{(n1 + 0,1 n2) d}$$

Donde

N: es número de microorganismos característico por gramo muestra

1 NIZO Food Research, Kernhemseweg 2, Postbus 20 6710 BA, Ede, The Netherlands.

C: es el valor numérico de la suma de colonias contadas en todas las placas

n1: es el número de placas contadas utilizando la primera dilución.

n2: es el número de placas contadas utilizando la segunda dilución

d: es el valor numérico de la masa, en gramos, de la muestra no diluida presente en la placa con la primera dilución.

EJEMPLO un factor de dilución 10⁻² significa que 10⁻² g o 10⁻² mL de la muestra sin diluir (en el estado diluido) se han colocado en la placa.

NOTA la primera dilución es la dilución con el contenido más alto de muestra.

En caso de tres diluciones, calcule el número de cada microorganismo característico en la muestra de la prueba usando la ecuación siguiente.

$$N = \frac{C}{(n1 + 0,1 n2 + 0,01 n3) d}$$

Donde n3 es el número contado en las placas utilizando la tercera dilución.

8.3.10.2 Expresión de resultados

8.3.10.2.1 Redondear el resultado obtenido en el punto anterior dos cifras significativas.

Para tres cifras significativas, redondear la tercera cifra al cero más cercano. Si la tercer cifra es 5 redondear hacia abajo en caso de que la segunda cifra sea número par, y hacia arriba si la segunda cifra es número impar.

EJEMPLO

Redondear: 234 a 230, 235 a 240, 225 a 220, 245 a 240

8.3.10.2.2 Si existen solamente cuentas menores de 10, reportar el número de microorganismos por gramo como “menores de 10 x 1/d”

(siendo d el valor correspondiente a la dilución más baja).

8.3.10.2.3 Si existen solamente cuentas que exceden de 300, estimar la cuenta de las placas que contengan lo más cercano posible a 300 colonias y multiplicar por el recíproco de la dilución más alta. Reportar el valor como “número mínimo estimado de microorganismos por gramo”.

8.3.10.2.4 El resultado debe ser expresado como un número del 1 al 9,9 multiplicado por la dilución decimal apropiada.

8.3.10.2.5 El número total de microorganismos característicos, N , por gramo de muestra es igual a:

$$N = NL + NS$$

Donde

NL es el valor del número de *L. delbrueckii subsp. Bulgaricus* por gramo, calculado en 8.3.10.1.2;

NS es el valor del número de *S. thermophilus* por gramo, calculado en 8.3.10.1.2.

8.3.10.3 Ejemplos del cálculo

8.3.10.3.1 *L. delbrueckii subsp. bulgaricus*

Asumiendo que la cuenta de *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* dio los resultados siguientes (dos cajas Petri por cada dilución fueron incubadas):

Dilución 10-5: 295 y 245 colonias;

Dilución 10-6: 33 y 40 colonias;

Entonces

$$N = \frac{C_1 + C_2}{d} + \frac{C_3 + C_4}{d} = \frac{295 + 245}{10^{-5}} + \frac{33 + 40}{10^{-6}} = 613 \times 10^5 = 278,6 \times 10^8$$

$$(n_1 + 0,1 n_2) d (2 + 0,1 \times 2) 10^{-5} 2,2 \times 10^{-5}$$

De acuerdo con 8.3.10.2.1, esto es igual a 280×10^8 por gramo. El número estimado de *L. delbrueckii subsp. bulgaricus*, de acuerdo con 8.3.10.2.4, es por tanto $2,8 \times 10^7$ por gramo.

8.3.10.3.2 *S. thermophilus*

De forma similar fue obtenido, para *S. thermophilus*, un número estimado de $4,9 \times 10^8$ por gramo de yogurt.

El número total de microorganismos característicos es igual a:

$$N = (2,8 \times 10^7) + (4,9 \times 10^8) = 5,18 \times 10^8 \text{ por gramo el cual, cuando es redondeando de acuerdo con 8.3.10.2.4 da:}$$

$$N = 5,2 \times 10^8 \text{ por gramo de muestra.}$$

8.3.11 Precisión

8.3.11.1 Repetibilidad

La experiencia indica que si la diferencia entre dos pruebas independientes de la misma muestra excede el 30%, el procedimiento debe ser reexaminado para determinar las fuentes de error.

8.3.12 Informe de prueba

El informe de prueba debe especificar:

- toda la información requerida para la completa identificación de la muestra;
- el método de muestreo utilizado, si se conoce;
- el método de prueba utilizado, con la referencia de esta Norma Mexicana;
- todos los detalles de operación no especificados en este procedimiento, o considerados como opcionales, junto con los detalles de cualquier incidente que pudiera haber afectado el resultado;
- el resultado obtenido de la prueba o, si la repetibilidad ha sido comprobada, citar el resultado final obtenido.

NOTAS informativas sobre el procedimiento

Ninguno de los dos medios de cultivo recomendados (MRS acidificado y M17) son totalmente selectivos.

La mayoría de las cepas de *S. thermophilus* no forman colonias visibles en el medio MRS acidificado en diluciones normalmente utilizadas para la cuenta de *L. delbrueckii subsp. bulgaricus*. Sin embargo, cuando el número de lactobacilos en la muestra de yogur es considerablemente más baja que el número de estreptococos, tienen que utilizarse diluciones menores para la cuenta de *L. delbrueckii subsp. bulgaricus*.

Bajo estas condiciones, algunos *S. thermophilus* pueden formar colonias muy pequeñas o puntiformes en placas de MRS acidificado. Estas colonias pueden ser fácilmente diferenciadas a simple vista de las colonias de *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* (que son de tamaño más grande) y pueden adicionalmente comprobarse microscópicamente. Además, algunas cepas de *L. delbrueckii subsp. Bulgaricus* muestran pobre o nulo crecimiento en medio MRS y algunas veces se dificulta diferenciarlas de *S. thermophilus*.

Cuando las cepas de *S. thermophilus* crecen muy lentamente o no son capaces de crecer, se recomiendan algunas condiciones específicas tales como:

- incrementar la temperatura de incubación (39 °C a 42 °C y 45 °C aeróbicamente);
- disminuir el contenido en -glicerofosfato;
- modificar el pH;
- tener mucho cuidado durante la agitación

Cuando las cepas de *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* crecen muy lentamente o no son capaces de crecer, se recomiendan algunas condiciones específicas tales como:

- incubación por más de tres días, hasta 5 o 6 días;
- incrementar la temperatura de incubación (40 °C a 42 °C y 45 °C por 48 h anaeróbicamente);
- modificar el pH;
- tener mucho cuidado durante la agitación;
- ambiente gaseoso (enriquecimiento de CO₂, únicamente CO₂, etc).

L. delbrueckii subsp. Bulgaricus cuando crece anaeróbicamente en el yogur, no puede ser enumerado en medio MRS. Este problema no ocurre al usar medio LB (ver nota en 8.3.9.7.1) bajo condiciones anaeróbicas a 50 °C + 0,5 °C por 72 h.

Por otra parte, la mayoría de las cepas de *L. delbrueckii subsp. Bulgaricus* no forman colonias visibles en placas de medio M17 a las diluciones normalmente utilizadas para el conteo de *S. thermophilus*.

Algunas cepas de *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* pueden, sin embargo, formar pequeñas colonias puntiformes en medio M17 especialmente con muestras de yoghurt que presentan alto número de lactobacilos comparado con el número de estreptococos. Estas pequeñas colonias tienen generalmente aspecto lanoso y pueden distinguirse fácilmente a simple vista (y mejor con lente de aumento) de las colonias lisas, lenticulares y grandes de *S. thermophilus* y adicionalmente comprobarse microscópicamente.

La selección del medio, la preparación de la muestra, los procedimientos de incubación y conteo son los puntos más críticos de este ensayo. Una vez que los técnicos se familiarizan con el método, la exactitud mejora significativamente.

Método para la Cuenta de Microorganismos Coliformes Totales en Placa. (NOM-243-SSA12010)

B.10.1 Fundamento del método

El método permite determinar el número de microorganismos coliformes presentes en una muestra, utilizando un medio selectivo (agar rojo violeta bilis) en el que se

desarrollan bacterias a 35°C en aproximadamente 24 h, dando como resultado la producción de gas y ácidos orgánicos, los cuales viran el indicador de pH y precipitan las sales biliares.

B.10.2 Materiales

B.10.2.1 Pipetas bacteriológicas para distribuir 10 y 1 mL (o si es necesario de 11 y 2 mL), con tapón de algodón. Las pipetas pueden ser graduadas en volúmenes iguales a una décima de su volumen total.

B.10.2.2 Frascos de vidrio de 250 mL con tapón de rosca.

B.10.2.3 Tubos de 16 X 150 mm con tapón de rosca.

B.10.2.4 Utensilios esterilizables para la obtención de muestras: cuchillos, pinzas, tijeras, cucharas, espátulas, etc.

B.10.2.5 Cajas Petri.

B.10.2.6 Todo el material e instrumentos que tengan contacto con las muestras bajo estudio debe esterilizarse mediante: Horno, durante 2 h a 170 - 175°C, o 1 h a 180°C; o en autoclave, durante 15 minutos como mínimo a $121 \pm 1,0^\circ\text{C}$.

B.10.2.7 El material de vidrio puede sustituirse por material desechable que cumpla con las especificaciones deseadas. No debe usarse material de vidrio dañado por las esterilizaciones repetidas y éste debe ser químicamente inerte.

B.10.3 Aparatos e instrumentos

B.10.3.1 Horno para esterilizar que alcance una temperatura mínima de 170°C.

B.10.3.2 Autoclave con termómetro y manómetro, calibrada con termómetro de máximas y mínimas.

B.10.3.3 Baño de agua con control de temperatura y circulación mecánica, provista con termómetro calibrado con divisiones de $0,1^\circ\text{C}$ y que mantenga la temperatura a $45 \pm 1,0^\circ\text{C}$.

B.10.3.4 Licuadora de una o dos velocidades controladas por un reóstato o bien un homogeneizador peristáltico (Stomacher).

B.10.3.5 Vasos para licuadora con tapa esterilizables o bolsas estériles para homogeneizador peristáltico.

B.10.3.6 Incubadora con termostato que evite variaciones mayores de $\pm 1,0^\circ\text{C}$, provista con termómetro calibrado.

B.10.3.7 Contador de colonias de campo oscuro, con luz adecuada, placa de cristal cuadrada y lente amplificador.

B.10.3.8 Registrador mecánico o electrónico.

B.10.3.9 Microscopio óptico.

B.10.3.10 Potenciómetro con una escala mínima de 0,1 unidades de pH a 25 °C.

B.10.4 Reactivos

Los reactivos que a continuación se mencionan, deben ser grado analítico y cuando se indique agua debe entenderse como agua destilada.

B.10.4.1 Soluciones Diluyentes

B.10.4.1.1 Solución Reguladora de Fosfatos (solución concentrada)

FORMULA

INGREDIENTES CANTIDADES

Fosfato monopotásico 34,0 g

Agua 1,0 l

Preparación:

Disolver el fosfato en 500 mL de agua y ajustar el pH a 7,2 con solución de hidróxido de sodio 1,0N. Llevar

con agua a un litro. Esterilizar a $121 \pm 1,0^{\circ}\text{C}$ durante 15 minutos. Conservar en refrigeración (solución concentrada).

Tomar 1,25 mL de la solución concentrada y llevar a un litro con agua (solución de trabajo). Distribuir en porciones de 99, 90 y 9 mL según se requiera. Esterilizar durante 15 minutos a $121 \pm 1,0^{\circ}\text{C}$. Después de la esterilización, el pH y los volúmenes finales de la solución de trabajo deben ser iguales a los iniciales.

B.10.4.1.2 Agua Peptonada

FORMULA

INGREDIENTES CANTIDADES

Peptona 1,0 g

NaCl 8,5 g

Agua 1,0 l

Preparación:

Disolver los componentes en un litro de agua. Ajustar el pH a 7,0 con hidróxido de sodio 1,0 N. Distribuir en porciones de 99, 90 y 9 mL o en cualquier volumen múltiplo de nueve según se requiera. Esterilizar durante

15 minutos a $121 \pm 1,0^{\circ}\text{C}$. Después de la esterilización, los volúmenes finales de la solución de trabajo deben ser iguales a los iniciales.

Si este diluyente no es usado inmediatamente, almacenar en lugar obscuro a una temperatura entre 0 a 5°C por un tiempo no mayor de un mes, en condiciones tales que no alteren su volumen o composición.

B.10.4.2 Medio de Cultivo Agar-rojo-violeta-bilis-lactosa (RVBA)

FORMULA

INGREDIENTES CANTIDADES

Peptona 7,0 g

Extracto de levadura 3,0 g

Lactosa 10,0 g

Sales biliares 1,5 g

Cloruro de sodio 5,0 g

Rojo neutro 0,03 g

Cristal violeta 0,002 g

Agar 15,0 g

Agua 1,0 l

Preparación:

Mezclar los componentes en el agua y dejar reposar durante algunos minutos. Mezclar perfectamente y ajustar el pH a 7,4 con ácido clorhídrico 0,1N o con hidróxido de sodio 0,1N a 25°C , de forma que después del calentamiento se mantenga en este valor. Calentar con agitación constante y hervir durante 2 minutos. Enfriar inmediatamente el medio en un baño de agua hasta que llegue a 45°C . Evitar el sobrecalentamiento del medio. No debe esterilizarse en autoclave. Usar el medio dentro de las tres primeras horas después de su preparación. En el caso de utilizar medio de cultivo deshidratado, seguir las instrucciones del fabricante.

B.10.5 Preparación de la Muestra

La preparación de la muestra debe ser de acuerdo a lo establecido en el numeral 9 de este apéndice normativo.

B.10.6 Procedimiento

B.10.6.1 Colocar en cajas Petri por duplicado 1 mL de la muestra líquida directa o de la dilución primaria, utilizando para tal propósito una pipeta estéril.

B.10.6.2 Repetir el procedimiento tantas veces como diluciones decimales se requiera sembrar, utilizando una pipeta estéril diferente para cada dilución.

B.10.6.3 Vertir de 15 a 20 mL del medio RVBA fundido y mantenido a $45 \pm 1,0^{\circ}\text{C}$ en baño de agua. En el caso de utilizar cajas de Petri de plástico se vierte de 10 a 15 mL del medio. El tiempo transcurrido entre la preparación de la dilución primaria y el momento en que se vierte el medio de cultivo, no debe exceder de 20 minutos.

B.10.6.4 Mezclar cuidadosamente el inóculo con el medio con seis movimientos de derecha a izquierda, seis movimientos en el sentido de las manecillas del reloj, seis movimientos en el sentido contrario al de las manecillas del reloj y seis de atrás para adelante, sobre una superficie lisa y nivelada. Permitir que la mezcla solidifique dejando las cajas Petri reposar sobre una superficie horizontal fría.

B.10.6.5 Preparar una caja control con 15 mL de medio para verificar la esterilidad. Incluir un control adicional que considere la esterilidad de la solución diluyente adicionando 1 mL directo de esta solución en el mismo medio de cultivo.

B.10.6.6 Después de que está el medio completamente solidificado en la caja, verter aproximadamente 4 mL del medio RVBA a $45 \pm 1,0^{\circ}\text{C}$ en la superficie del medio inoculado. Dejar que solidifique.

B.10.6.7 Invertir las placas y colocarlas en la incubadora a 35°C , durante 24 ± 2 horas.

B.10.6.8 Después del periodo especificado para la incubación, contar las colonias con el contador de colonias.

B.10.6.9 Seleccionar las placas que contengan entre 15 y 150 colonias. Las colonias típicas son de color rojo oscuro, generalmente se encuentran rodeadas de un halo de precipitación debido a las sales biliares, el cual es de color rojo claro o rosa, la morfología colonial es semejante a lentes biconvexas con un diámetro de 0,5 a 2,0 mm.

B.10.6.10 Para el caso de polvos, inocular 5 placas con 2 mL de la dilución 1:10, contar las colonias encontradas en cada placa y reportar la suma de UFC/g

B.10.7 Expresión de los Resultados

B.10.7.1 Cálculo del Método

B.10.7.1.1 Placas que contienen entre 15 y 150 colonias características.

Separar las placas que contienen el número antes mencionado de colonias características en dos diluciones consecutivas. Contar las colonias presentes. Calcular el número de coliformes por mililitro o por gramo de producto, multiplicando el número de colonias por el inverso de la dilución correspondiente, tomando los criterios de la NOM-092-SSA1-1994. Método para la Cuenta de Bacterias Aerobias en Placa.

B.10.7.1.2 Placas que contienen menos de 15 colonias características.

Si cada una de las placas tiene menos de 15 colonias características, reportar el número obtenido seguido de la dilución correspondiente.

B.10.7.1.3 Placas con colonias no características.

Si en las placas no hay colonias características, reportar el resultado como: menos de un coliforme por 1/d por gramo, en donde d es el factor de dilución.

B.10.8 Informe de la Prueba

Informar: UFC/g o mL en placa de agar rojo violeta bilis, incubados a 35°C durante 24 ± 2 h. En caso de emplear diluciones y no observar crecimiento, informar utilizando como referencia la dilución más baja utilizada, por ejemplo dilución 10-1. En caso de no observar crecimiento en la muestra sin diluir se informa: "no desarrollo de coliformes por mL. "

Determinación de *Staphylococcus aureus* (NOM-183-SSA1-2002)

B.11.1 Fundamento

Este método permite hacer una estimación del contenido de *Staphylococcus aureus* en alimentos, se efectúa directamente en placas de medio de cultivo selectivo y diferencial,

con la confirmación mediante las pruebas de coagulasa y termonucleasa. Este método es adecuado para el análisis de alimentos en los cuales se esperen más de 100 células de *Staphylococcus aureus* por g.

B.11.2 Materiales y Equipo

Todos los instrumentos que se utilicen para trabajar la muestra deben esterilizarse mediante horno, durante 2 h de 170-175°C o como alternativa en autoclave durante 15 min como mínimo a 121°C ±1.

B.11.2.1 Cuchillos, pinzas, tijeras, cucharas, espátulas y separador de huevo.

B.11.2.2 Tubos de cultivo de 16 mm x 150 mm o frascos de 125 a 250 mL de capacidad, con tapón de rosca.

B.11.2.3 Tubos de cultivo de 10 mm x 75 mm, con tapón de rosca.

B.11.2.4 Cajas Petri de 90 a 100 mm de diámetro.

B.11.2.5 Pipetas bacteriológicas de 1 mL y 10 mL de capacidad graduadas en 0,1 mL y 1 mL respectivamente y diámetro de 2 a 3 mm.

B.11.2.6 Pipetas Pasteur.

B.11.2.7 Probetas.

B.11.2.8 Varillas de vidrio de 3,5 mm de diámetro aproximadamente y 20 cm de largo dobladas en ángulo recto, o varillas de plástico estériles desechables.

B.11.2.9 Matraz Erlenmeyer con perlas de vidrio

B.11.2.10 Cámara húmeda: consiste en una caja Petri en la cual se coloca una varilla de vidrio en forma de "V" rodeada de algodón humedecido con agua.

B.11.2.11 Horno para esterilizar que alcance 180°C.

B.11.2.12 Autoclave con termómetro.

B.11.2.13 Baño de agua con regulador de temperatura de 35 ± 0,5°C.

B.11.2.14 Baño de agua con regulador de temperatura de 45 ± 0,5°C.

B.11.2.15 Balanza con capacidad no mayor de 2,500 g y sensibilidad de 0,1 g.

B.11.2.16 Incubadora a 35 ± 1°C.

B.11.3 Reactivos

En caso de disponerse de fórmulas comerciales deshidratadas, para su preparación se deben seguir las instrucciones impresas en la etiqueta respectiva.

Cuando se mencione agua debe entenderse que se trata de "agua destilada".

Los reactivos a emplear en el método objeto de esta norma deben ser grado analítico.

B.11.3.1 Soluciones Diluyentes

B.11.3.1.1 Solución Reguladora de Fosfatos (Solución concentrada)

FORMULA

INGREDIENTES	CANTIDADES
--------------	------------

Fosfato monopotásico	34,0 g
----------------------	--------

Agua	1,0 l
------	-------

Preparación

Disolver el fosfato en 500 mL de agua y ajustar el pH a 7,2 con solución de hidróxido de sodio 1N, aforar con agua a 1 l. Esterilizar durante 15 min a 121°C ±1, conservar en refrigeración (solución concentrada).

Tomar 1,25 mL de la solución concentrada y llevar a 1 l con agua (solución de trabajo).

Distribuir en porciones de 99, 90 y 9 mL según se requiera. Esterilizar a 121°C ±1 durante 15 min. Después de la esterilización, los volúmenes finales y el pH de la solución de trabajo deben ser iguales a los iniciales.

B.11.3.1.2 Agua Peptonada

FORMULA

INGREDIENTES	CANTIDADES
--------------	------------

Peptona	1,0 g
---------	-------

Cloruro de sodio	8,5 g
Agua	1,0 l

Preparación

Disolver los componentes en un litro de agua. Ajustar el pH a 7,0 con solución de hidróxido de sodio 1N.

Distribuir en porciones de 99, 90 y 9 mL según se requiera. Esterilizar a 121°C ±1 durante 15 min. Después de la esterilización los volúmenes finales y el pH de la solución de trabajo deben ser iguales a los iniciales.

B.11.3.2 Medios de Cultivo

B.11.3.2.1 Medio de Baird-Parker

FORMULA

INGREDIENTES	CANTIDADES
Medio base (11.3.2.2)	95,0 mL
Solución de telurito de potasio (11.3.2.3)	1,0 mL
Emulsión de yema de huevo (11.3.2.4)	5,0 mL

Preparación

Cuando el medio base esté a 45°C, agregar los demás ingredientes y mezclar. Colocar de 15 a 20 mL del medio completo, enfriar y dejar solidificar. Las placas pueden almacenarse por 48 h a temperatura de 0 a 5°C.

B.11.3.2.2 Medio base de Baird-Parker

FORMULA

INGREDIENTES	CANTIDADES
Triptona	10,0 g
Extracto de levadura	1,0 g
Extracto de carne	5,0 g
Glicina	12,0 g
Cloruro de litio	5,0 g
Piruvato de sodio	10,0 g
Agar	20,0 g
Agua	1,0 l

Preparación

Disolver los ingredientes o el agar base en agua y calentar con agitación constante y hervir durante 1 min.

Esterilizar a 121°C ±1 durante 15 min. Enfriar y mantener el medio a 45°C.

En el caso de usar medio base deshidratado, seguir las indicaciones del fabricante.

B.11.3.2.3 Solución de Telurito

FORMULA

INGREDIENTES	CANTIDADES
Telurito de potasio	1,0 g
Agua	100,0 mL

Preparación

Disolver el telurito de potasio en agua y esterilizar. La solución puede ser almacenada por varios meses a temperatura de 0 a 5°C.

B.11.3.2.4 Emulsión de Yema de huevo

Preparación

Lavar con agua y jabón los huevos frescos que sean necesarios y limpiarlos con una solución de tintura de yodo (solución alcohólica al 2%) o sumergirlos en solución de cloruro mercúrico (1:1000). Enjuagar con agua estéril y secar con gasa estéril. En campana de flujo laminar o en condiciones asépticas, abrir los huevos y vaciarlos en un separador de claras estéril. Transferir las yemas a una probeta hasta un volumen de 60

mL y completar a 90 mL con solución salina isotónica. Verter la emulsión a un matraz Erlenmeyer con perlas de vidrio estéril y agitar fuertemente para formar la emulsión. Filtrar a través de gasa. Las placas deben utilizarse dentro de las 48 h siguientes a su preparación.

B.11.3.2.5 Solución Salina fisiológica

FORMULA

INGREDIENTES	CANTIDADES
Cloruro de sodio	0,85 g
Agua	100,0 mL

Preparación

Disolver el ingrediente en agua y esterilizar a 121°C ±1 durante 15 min.

B.11.3.2.6 Caldo de Infusión cerebro-corazón (BHI)

FORMULA

INGREDIENTES	CANTIDADES
Infusión de cerebro de ternera	200,0 mL
Infusión de corazón de res	250,0 mL
Peptona de gelatina	10,0 g
Cloruro de sodio	5,0 g
Fosfato disódico dodecahidratado	2,5 g
Glucosa	2,0 g
Agua	1,0 l

Preparación

Disolver los ingredientes en agua y calentar ligeramente si es necesario. Distribuir y esterilizar durante 15 min a 121°C ±1.

B.11.3.2.7 Acido Desoxirribonucleico helicoidal de timo de ternera.

FORMULA

INGREDIENTES	CANTIDADES
Acido desoxirribonucleico helicoidal de timo de ternera o equivalente	0,03 g
Agar	1,00 g
Cloruro de calcio anhidro (Solución 0,01 M) (11.3.2.8)	0,10 mL
Cloruro de sodio	1,00 g
Azul de toluidina (Solución 0,1 M) (11.3.2.9)	0,30 mL
Tris-(hidroximetil-aminometano) (Tris solución 0,05 M, pH 9) (11.3.2.10)	100,00 mL

Preparación

Disolver los ingredientes, excepto el azul de toluidina agitando hasta completar la disolución del ácido desoxirribonucleico y calentar a ebullición. Agregar el azul de toluidina. Distribuir en frascos pequeños con tapón de hule. No es necesario esterilizar. Este medio es estable a temperatura ambiente hasta 4 meses y funciona perfectamente aun después de fundirlo varias veces. Tomar un porta objetos limpio y agregar 3 mL del medio fundido esparciéndolo por la superficie. Cuando el agar solidifique, hacer orificios con la punta de una pipeta Pasteur. Conservar en refrigeración para evitar la deshidratación.

B.11.3.2.8 Solución de Cloruro de calcio anhidro 0,01 M

Cloruro de calcio PM = 110,99

Disolver 0,1199 g de cloruro de calcio en 100 mL de agua.

B.11.3.2.9 Solución de Azul de toluidina 0,1 M

Disolver 3,05 g de azul de toluidina en 100 mL de agua.

B.11.3.2.10 Solución Amortiguadora 0,05 M Tris-(hidroximetilaminometano)

(Tris pH 9) PM = 121,1

Disolver 6,055 g de Tris en 100 mL de agua.

Determinación de Salmonella spp. (NOM-243-SSA1-2010)

B.12.1 Fundamento

La presente técnica para la detección de Salmonella spp. en alimentos, describe un esquema general que consiste de 5 pasos básicos:

Preenriquecimiento, es el paso donde la muestra es enriquecida en un medio nutritivo no selectivo, que permite restaurar las células de Salmonella dañadas a una condición fisiológica estable.

Enriquecimiento selectivo, empleado con el propósito de incrementar las poblaciones de Salmonella spp. e inhibir otros organismos presentes en la muestra.

Selección en medios sólidos, en este paso se utilizan medios selectivos que restringen el crecimiento de otros géneros diferentes a Salmonella spp. y permite el reconocimiento visual de colonias sospechosas.

Identificación bioquímica, este paso permite la identificación genérica de los cultivos de Salmonella spp. y la eliminación de cultivos sospechosos falsos.

Serotipificación, es una técnica serológica que permite la identificación específica de un cultivo.

B.12.2 Materiales y Equipo

B.12.2.1 Horno para esterilizar que alcance los 180°C

B.12.2.2 Incubadora con termostato para evitar variaciones mayores de $\pm 0,1^\circ\text{C}$ y termómetro

B.12.2.3 Autoclave con termómetro o manómetro, probado con termómetro de máximas

B.12.2.4 Baño maría con termostato y termómetro

B.12.2.5 Balanza granataria con sensibilidad de 0,1 g, o Balanza de precisión o analítica

B.12.2.6 Licuadora de una o dos velocidades controladas por un reóstato, con vasos esterilizables (vidrio o aluminio)

B.12.2.7 Mecheros Bunsen o Fisher

B.12.2.8 Potenciómetro

B.12.2.9 Matraces Erlenmeyer de 500 mL

B.12.2.10 Recipientes de boca ancha, de capacidad apropiada para contener las muestras simples y compuestas

B.12.2.11 Angulos de vidrio

B.12.2.12 Cucharas, bisturíes, cuchillos y pinzas

B.12.2.13 Tubos de ensaye de 16 x 150 mm y de 20 x 100 mm

B.12.2.14 Tubos para serología de 10 x 75 mm o de 13 x 100 mm

B.12.2.15 Pipetas bacteriológicas de 10,0 y 5,0 mL, graduadas en 0,1 mL y protegidas con tapón de algodón

B.12.2.16 Pipetas de 1 mL, con graduaciones de 0,01 mL.

B.12.2.17 Cajas de petri estériles de vidrio o desechables

B.12.2.18 Rejillas para tubos de ensaye

B.12.2.19 Asa de platino o nicromel de aproximadamente 3 mm de diámetro

B.12.2.20 Papel pH (intervalo de 6-8) con graduaciones máximas de 0,4 unidades de pH para cambios de color

B.12.2.21 Todo el material que tenga contacto con las muestras bajo estudio debe esterilizarse mediante: Horno, durante 2 horas a 170-175°C o autoclave, durante 15 min como mínimo a 121°C $\pm 1^\circ\text{C}$

B.12.2.22 Perilla

B.12.2.23 Vórtex**B.12.2.24 Estomacher (opcional)****B.12.3 Reactivos**

En caso de disponerse de fórmulas comerciales deshidratadas, se deben seguir las instrucciones impresas en la etiqueta respectiva para su preparación.

Las sustancias químicas usadas para preparar los medios de cultivo y los reactivos deben ser grado analítico.

B.12.3.1 Medios de Pre-enriquecimiento**B.12.3.1.1 Agua de Peptona tamponada**

FORMULA

INGREDIENTES	CANTIDADES
Peptona	10,0 g
Cloruro sódico	5,0 g
Fosfato sódico dibásico	3,5 g
Fosfato potásico monobásico	1,5 g
Agua	1,0 l

Preparación

Disolver los componentes en agua, calentando si es necesario. Ajustar el pH, si es necesario, después de la esterilización a 7,0. Distribuir en recipientes de vidrio esterilizables con la capacidad necesaria para obtener las porciones necesarias para la prueba. Esterilizar por 20 min a $121 \pm 1^\circ\text{C}$.

B.12.3.1.2 Caldo Lactosado

FORMULA

INGREDIENTES	CANTIDADES
Extracto de carne	3,0 g
Peptona	5,0 g
Lactosa	5,0 g
Agua destilada pH final: $6,9 \pm 0,2$	1,0 l

Preparación

Disolver los ingredientes en agua, calentando a 65°C . Distribuir en porciones de 225mL, en frascos de 500 mL. Esterilizar durante 15 min a $121^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$.

B.12.3.2 Caldo de Enriquecimiento**B.12.3.2.1 Caldo Selenito-cistina**

FORMULA

INGREDIENTES	CANTIDADES
Triptona o polipeptona	5,00 g
Lactosa	4,00 g
Fosfato disódico	10,00 g
Selenito ácido de sodio	4,00 g
L-cistina	0,01 g
Agua destilada pH final: $7,0 \pm 0,2$ a 25°C	1,00 l

Preparación

Disolver los ingredientes en un litro de agua destilada estéril y distribuir en volúmenes de 10 y 225 mL en recipientes estériles, según se requiera. El caldo así preparado es transparente. De preferencia usarlo el mismo día de su preparación. Si se desea conservar el medio por varios días, puede exponerse al calor en autoclave por 5 min a $110^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$, tomando entonces un color salmón.

B.12.3.2.2 Caldo Tetrionato

FORMULA

INGREDIENTES	CANTIDADES
--------------	------------

Proteosa peptona o triptona	5,0 g
Sales biliares	1,0 g
Carbonato de calcio	10,0 g
Tiosulfato de sodio pentahidratado	30,0 g
Agua destilada pH final: 7,0 ± 0,1	1,0 l

Preparación

Disolver los ingredientes en un litro de agua destilada estéril. Distribuir, agitando constantemente, en porciones de 10 y 225 mL, en recipientes estériles. Guardar en refrigeración. Antes de usar el medio, agregar 2 mL de una solución yodo-yoduro y 1 mL de solución de verde brillante al 0,1% por cada 100 mL de caldo. El medio una vez adicionado de yodo no debe calentarse y debe usarse el mismo día de su preparación

B.12.3.2.3 Vassiliadis-Rappaport

Solución A

FORMULA

INGREDIENTES	CANTIDADES
Triptona	5,0 g
Cloruro de sodio	8,0 g
Fosfato de potasio dihidrogenado	1,6 g
Agua destilada	1,0 l

Disolver los componentes en agua por calentamiento cercano a 70°C.

Solución B

FORMULA

INGREDIENTES	CANTIDADES
Cloruro de magnesio hexahidratado	400,0 g
Agua destilada	1,0 l

Disolver el cloruro de magnesio en agua. Como esta sal es muy higroscópica es conveniente disolver el contenido entero de cloruro de magnesio desde un recipiente recientemente abierto de tal modo que la concentración de la solución sea de 0,4 g/mL. Conservar en frasco ámbar a temperatura ambiente.

Solución C

FORMULA

INGREDIENTES	CANTIDADES
Oxalato de verde de malaquita	0,4 g
Agua destilada	100,0 mL

Disolver el oxalato de verde de malaquita en agua. Conservar en frasco ámbar a temperatura ambiente.

Medio completo

FORMULA

INGREDIENTES	CANTIDADES
Solución A	1000 mL
Solución B	100 mL
Solución C	10 mL

Preparación

Adicionar 1000 mL de la solución A, 100 mL de la solución B y 10 mL de la solución C. Ajustar el pH si es necesario, de tal manera que después de la esterilización sea de 5,2. Distribuir antes de usar dentro de tubos en cantidades de 10 mL. Almacenar en refrigeración.

B.12.3.2.4 Caldo de Soya tripticasa

FORMULA

INGREDIENTES CANTIDADES

Tripticasa o triptosa	17,0 g
Fitona	3,0 g
Glucosa	2,5 g
Cloruro de sodio	2,5 g
Agua destilada pH final: $7,3 \pm 0,2$	1,0 l

Preparación

Disolver los ingredientes en 1 litro de agua destilada, calentando lentamente hasta su disolución completa.

Distribuir porciones de 225 mL dentro de matraces de 500 mL y esterilizar en autoclave durante 15 min a $121^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

B.12.3.2.6 Caldo Soya tripticasa estéril adicionado con sulfito de potasio

Adicionar al caldo soya tripticasa 5 g de sulfito de potasio por cada 1000 mL de medio, quedando una concentración final de sulfito de potasio del 0,5%. Adicionar el sulfito de potasio antes de esterilizar en autoclave en la forma habitual.

B.12.3.3 Medios de Aislamiento

B.12.3.3.1 Agar verde brillante (VB)

FORMULA

INGREDIENTES	CANTIDADES
Extracto de levadura	3,0000 g
Polipeptona (Proteosa peptona No. 3)	10,0000 g
Cloruro de sodio	5,0000 g
Lactosa	10,0000 g
Sacarosa	10,0000 g
Rojo de fenol	0,0800 g
Agar	20,0000 g
Verde brillante	0,0125 g
Agua destilada pH final: $6,9 \pm 0,2$	1,0000 l

Preparación

Suspender los ingredientes en un litro de agua destilada y calentar a ebullición, hasta disolución completa.

Ajustar el pH. Esterilizar en autoclave por 15 min a $121^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. El sobrecalentamiento del medio disminuye su selectividad. Enfriar el medio a 50°C y distribuirlo en cajas de petri estériles. El aspecto del medio es oscuro, de color marrón.

B.12.3.3.2 Agar con sulfito de bismuto

FORMULA

INGREDIENTES	CANTIDADES
Extracto de carne de res	5,000 g
Mezcla de peptonas	10,000 g
Glucosa	5,000 g
Fosfato disódico (anhidro)	5,000 g
Sulfato ferroso (anhidro)	0,300 g
Sulfito de bismuto	8,000 g
Verde brillante	0,025 g
Agar	20,000 g
Agua destilada pH final: $7,6 \pm 0,2$	1,000 l

Preparación

Suspender los ingredientes en un litro de agua. Calentar hasta su disolución completa, agitando frecuentemente. Ajustar el pH. Enfriar a 45°C y verter en cajas de petri estériles, distribuyendo de manera homogénea el precipitado propio del medio. El

aspecto de las placas es opaco, de color verde pálido y deben usarse el mismo día de su preparación. Si la coloración es parda, no deben utilizarse. El medio no debe esterilizarse en autoclave; el sobrecalentamiento afecta su selectividad.

B.12.3.3.3 Agar xilosa lisina desoxicolato (XLD)

FORMULA

INGREDIENTES	CANTIDADES
Xilosa	3,75 g
L-lisina	5,00 g
Lactosa	7,50 g
Sacarosa	7,50 g
Cloruro de sodio	5,00 g
Extracto de levadura	3,00 g
Rojo de fenol	0,08 g
Agar	15,00 g
Desoxicolato de sodio	2,50 g
Citrato férrico-amónico	0,80 g
Tiosulfato de sodio	6,80 g
Agua destilada pH final: $6,9 \pm 0,2$	1,00 l

Preparación

Suspender los ingredientes en un litro de agua destilada, y calentar en baño de agua a 55°C, agitando frecuentemente, hasta disolución completa. Ajustar el pH. Enfriar a 50°C y verter en cajas de petri estériles.

No se esterilice. El sobrecalentamiento produce una precipitación; la reactividad del medio puede ser satisfactoria, pero las colonias suelen ser muy pequeñas. El aspecto del medio es claro y de color rojo brillante.

B.12.3.3.4 Agar para Salmonella y Shigella (SS)

FORMULA

INGREDIENTES	CANTIDADES
Extracto de carne	5,000 g
Polipeptona	5,000 g
Lactosa	10,000 g
Sales biliares	8,500 g
Citrato de sodio dihidratado	8,500 g
Tiosulfato de sodio pentahidratado	8,500 g
Citrato férrico	1,000 g
Agar	13,500 g
Rojo neutro	0,025 g
Verde brillante	0,330 mg
Agua destilada pH final: $7,0 \pm 0,2$	1,000 l

Preparación

Suspender los ingredientes en un litro de agua destilada estéril y calentar a ebullición hasta disolución completa. Ajustar el pH. No esterilizar en autoclave. Enfriar a 50°C y distribuir en cajas de petri estériles en condiciones asépticas. El aspecto del medio fundido es claro y de color rosado.

Nota: La polipeptona se puede sustituir por 2,5 g de peptona de caseína y 2,5 g de peptona de carne.

B.12.3.3.5 Agar Entérico Hektoen

FORMULA

INGREDIENTES	CANTIDADES
Proteosa peptona	12,000 g

Extracto de levadura	3,000 g
Lactosa	12,000 g
Sacarosa	12,000 g
Salicina	2,000 g
Sales biliares	9,000 g
Cloruro de sodio	5,000 g
Tiosulfato de sodio	5,000 g
Citrato amónico férrico	1,500 g
Azul de bromotimol	0,064 g
Fuscina ácida	0,100 g
Agar	13,500 g
Agua pH final: 7,5 ± 0,2	1,000 l

Preparación

Suspender los ingredientes en agua destilada, hervir con agitación hasta completa disolución del agar. No sobrecalentar. Dejar enfriar a 55-60°C y distribuir en cajas de petri estériles en condiciones asépticas.

**Método para la Cuenta de Mohos y Levaduras en Alimento.
(NOM-111-SSA1-1994)**

B.17.1 Fundamento

El método se basa en inocular una cantidad conocida de muestra de prueba en un medio selectivo específico, acidificado a un pH 3,5 e incubado a una temperatura de 25 ± 1°C, dando como resultado el crecimiento de colonias características para este tipo de microorganismos.

B.17.2 Reactivos y materiales

B.17.2.1 Reactivos

Los reactivos que a continuación se mencionan deben ser de grado analítico y cuando se indique agua debe entenderse como agua destilada.

i) Medios de cultivo.

Agar papa - dextrosa, comercialmente disponible en forma deshidratada.

Preparación del medio de cultivo.

Seguir instrucciones del fabricante y después de esterilizar, enfriar en baño de agua a 45 ± 1°C, acidificar

a un pH de 3,5 ± 0,1 con ácido tartárico estéril al 10% (aproximadamente 1,4 mL de ácido tartárico por 100 mL de medio). Después de adicionar la solución, mezclar y medir el pH con potenciómetro. Dejar solidificar una porción del medio. Hacer esto en cada lote de medio preparado. A fin de preservar las propiedades gelificantes del medio, no calentar después de agregar el ácido tartárico.

B.17.2.1.1 Soluciones.

i) Solución reguladora de fosfatos (solución concentrada)

Fórmula

Ingredientes	Cantidades
Fosfato de potasio monobásico	34,0 g
Agua	1,0 l

Preparación:

Disolver el fosfato en 500 mL de agua y ajustar el pH a 7,2 con hidróxido de sodio 1 N. Llevar a 1,0 l de agua.

Esterilizar a 121°C durante 15 minutos. Conservar en refrigeración (solución concentrada).

Tomar 1,25 mL de la solución concentrada y llevar a 1,0 l con agua (solución de trabajo).

Distribuir en porciones de 99, 90 y 9 mL según se requiera.

Esterilizar a $121 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 15 minutos.

ii) Solución estéril de ácido tartárico al 10%

Fórmula

Ingredientes	Cantidades
Acido tartárico	10 g
Agua destilada	100, mL

Preparación:

Disolver el ácido en el agua y esterilizar a $121 \pm 1,0^\circ\text{C}$ por 15 minutos o por filtración a través de membrana de $0,45\ \mu\text{m}$.

B.17.2.2 Materiales.

B.17.2.2.1 Pipetas bacteriológicas para distribuir 10 y 1 mL (o si es necesario de 1 mL y 2 mL), con tapón de algodón. Pueden utilizarse pipetas graduadas en volúmenes iguales a una décima de su volumen total.

B.17.2.2.2 Cajas Petri.

B.17.2.2.3 Frascos de vidrio de 250 mL con tapón de rosca.

B.17.2.2.4 Tubos de 16 x 150 mm con tapón de rosca.

B.17.2.2.5 Utensilios esterilizables para la obtención de muestras: cuchillos, pinzas, tijeras, cucharas, espátulas, etc.

B.17.2.2.6 Todo el material e instrumentos que tengan contacto con las muestras bajo estudio, deben esterilizarse mediante:

Horno, durante 2 h de 170 a 175°C o por 1h a 180°C o autoclave, durante 15 minutos como mínimo a $121 \pm 1,0^\circ\text{C}$. 98 (Segunda Sección) DIARIO OFICIAL Lunes 27 de septiembre de 2010

B.17.2.3 Aparatos e Instrumentos

B.17.2.3.1 Horno para esterilizar que alcance una temperatura mínima de 170°C .

B.17.2.3.2 Incubadora con termostato que pueda ser mantenido a $25 \pm 1,0^\circ\text{C}$ provista con termómetro calibrado.

B.17.2.3.3 Autoclave que alcance una temperatura mínima de $121 \pm 1,0^\circ\text{C}$.

B.17.2.3.4 Baño de agua con control de temperatura y circulación mecánica, provista con termómetro calibrado con divisiones de $0,1^\circ\text{C}$ y que mantenga la temperatura a $45 \pm 1,0^\circ\text{C}$.

B.17.2.3.5 Contador de colonias de campo oscuro, con luz adecuada, placa de cristal cuadrada y lente amplificador.

B.17.2.3.6 Registrador mecánico o electrónico.

B.17.2.3.7 Microscopio óptico.

B.17.2.3.8 Potenciómetro con una escala mínima de 0,1 unidades de pH a 25°C .

B.17.3 Preparación de la Muestra

La preparación de la muestra debe ser de acuerdo a lo señalado en el numeral B.4.1 (Procedimiento para la preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico) de este apéndice normativo.

B.17.3.1 Procedimiento

B.17.3.1.1 Colocar por duplicado en cajas Petri 1 mL de la muestra líquida directa o de la dilución primaria, utilizando para tal propósito una pipeta estéril.

B.17.3.1.2 Repetir el procedimiento tantas veces como diluciones decimales se requiera sembrar, utilizando una pipeta estéril diferente para cada dilución.

B.17.3.1.3 Verter de 15 a 20 mL de agar papa dextrosa acidificado, fundido y mantenido a $45 \pm 1^\circ\text{C}$ en un baño de agua. El tiempo transcurrido entre la preparación

de la dilución primaria y el momento en que es vertido el medio de cultivo, no debe exceder de 20 minutos.

B.17.3.1.4 Mezclar cuidadosamente el medio con seis movimientos de derecha a izquierda, seis en el sentido de las manecillas del reloj, seis en el sentido contrario y seis de atrás para adelante, sobre una superficie lisa. Permitir que la mezcla se solidifique dejando las cajas Petri reposar sobre una superficie horizontal fría.

B.17.3.1.5 Preparar una caja control con 15 mL de medio, para verificar la esterilidad.

B.17.3.1.6 Invertir las cajas y colocarlas en la incubadora a $25 \pm 1^\circ\text{C}$.

B.17.3.1.7 Contar las colonias de cada placa después de 3, 4 y 5 días de incubación. Después de 5 días, seleccionar aquellas placas que contengan entre 10 y 150 colonias. Si alguna parte de la caja muestra crecimiento extendido de mohos o si es difícil contar colonias bien aisladas, considerar los conteos de 4 días de incubación y aun de 3 días. En este caso, informar el periodo de incubación de 3 o 4 días en los resultados del análisis.

B.17.3.1.8 Si es necesario, cuando la morfología colonial no sea suficiente, examinar microscópicamente para distinguir las colonias de levaduras y mohos de las bacterias.

B.17.4 Expresión de Resultados

Cálculo del Método

Considerar las cuentas de placas con 10 a 150 colonias como las adecuadas para el informe.

Multiplicar por el inverso de la dilución, tomando en consideración los criterios del numeral B.4.2 de este apéndice (Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa), para la expresión de resultados.

B.17.5 Informe de la Prueba

Informar:

Unidades formadoras de colonias por gramo o mililitro (UFC/g o mL) de mohos en agar papa – dextrosa acidificado, incubadas a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 5 días.

Unidades formadoras de colonias por gramo o mililitro (UFC/g o mL) de levaduras en agar papadextrosa acidificado, incubadas a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 5 días