



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

“DESARROLLO DE DULCE DE LECHE TIPO GLORIA,
REDUCIDO EN GRASA,
DESLACTOSADO, SIN AZÚCAR Y ADICIONADO CON
PREBIÓTICOS COMO ALIMENTO FUNCIONAL”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

INGENIERO EN ALIMENTOS

PRESENTAN:

ARROYO SONDÓN PAMELA

SOLÍS PEÑA JOSÉ MANUEL

ASESOR: DRA. SARA ESTHER VALDÉS MARTÍNEZ

CO-ASESOR: DRA. CAROLINA MORENO RAMOS

CUAUTITLAN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis 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.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLÁN
ASUNTO: VOTO APROBATORIO



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

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

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

Desarrollo de dulce de leche tipo gloria, reducido en grasa, desalactosado, sin azúcar y adicionado con prebióticos como alimento funcional.

Que presenta el pasante: José Manuel Solís Peña

Con número de cuenta: 409071818 para obtener el Título de la carrera: Ingeniería 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 HABLARÁ EL ESPÍRITU”

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 08 de Octubre de 2015.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dra. Sara Esther Valdés Martínez	
VOCAL	M. en C. María Guadalupe Amaya León	
SECRETARIO	M. en C. Julieta González Sánchez	
1er. SUPLENTE	I.A. Alberto Solís Díaz	
2do. SUPLENTE	Dra. Guicela Ramírez Bernal	

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

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 CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

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

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

Desarrollo de dulce de leche tipo gloria, reducido en grasa, desalactosado, sin azúcar y adicionado con prebióticos como alimento funcional.

Que presenta la pasante: Pamela Arroyo Sondón

Con número de cuenta: 306135534 para obtener el Título de la carrera: Ingeniería 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 HABLARÁ EL ESPÍRITU”

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 08 de Octubre de 2015.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dra. Sara Esther Valdés Martínez	
VOCAL	M. en C. María Guadalupe Amaya León	
SECRETARIO	M. en C. Julieta González Sánchez	
1er. SUPLENTE	I.A. Alberto Solís Díaz	
2do. SUPLENTE	Dra. Guicela Ramírez Bernal	

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

IHM/mmgm*

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer primero a Dios por guiarme en su propósito, por llenarme de esperanza y fuerzas para seguir adelante y cumplir uno de mis sueños, el conseguir mi título universitario. Por mi familia, por medio de la cual el me dio aliento para seguir y no desmayar.

Quiero agradecer a mis padres Manuel y Patricia por siempre impulsarme a seguir adelante a pesar de las circunstancias. Por respaldarme en todas mis decisiones, buenas o malas. Por ser esos pilares que me sostuvieron en los momentos tan difíciles que pasamos en estos años. Por enseñarme que no importa lo que la gente piense de ti, lo importante es que Dios sabe la verdad de ti y que siempre hay que ponerlo en primer lugar. Por guiarme por el mejor camino por el cual me pudieron instruir. Muchas gracias. Los amo con todo mi corazón.

Quiero agradecer a mi hermana Sirery y a Rodrigo por apoyarme desde el principio y en este último empujón. Por siempre estar cuando los he necesitado. Por ser mis hermanos y por darme a mi hermosa sobrina Constanza y los que faltan. Los amo.

Quiero agradecer a mis abuelitos Hugo y Cristina, por siempre ser tan apapachadores, los llevo en mi corazón y siempre llevaré el ejemplo alentador de mi abu Cristi de una mujer incansable, luchadora, que me enseñó que no importa de dónde vengas, tu género, los obstáculos que uno pueda pasar; las mujeres somos fuertes y capaces de cumplir nuestros sueños. Lo logré abu, creíste en mí y lo hice. Un beso a los dos allá en el cielo.

Quiero agradecer a cada uno de mis tíos y tías, Clemen, Julián, Hugo, Janeth y Sady por siempre apoyarme y hacerme reír en esos momentos que uno está tan estresado que no puede más. En especial a mi tío Hugo que sin tu apoyo económico ese último año, no hubiera podido solventar mis gastos estudiantiles, a mi tío Julián por siempre apoyarme en lo espiritual, a mi tía Clemen por siempre sacarme de mis tristezas, angustias y demás, a mi tía Janeth por siempre ser tan chispa y a mi tía Sady por orar en esos tiempos de tribulación y por tu cariño tan meloso.

Quiero agradecer a la Dra. Sara E. Valdés por buscar lo mejor para sus alumnos, por impulsarnos a hacer lo que nos apasiona y por tenernos tanta paciencia, y por su continuo interés en que tengamos un buen futuro como Ingenieros en Alimentos.

Quiero agradecer a la Dra. Carolina Moreno por ayudarnos a enfrentar a esos gigantes que a veces se levantan contra nosotros y por su amor a la enseñanza.

AGRADECIMIENTOS

A mi madre, **Margarita Solís Peña**, pues ya que hoy, he obtenido este logro gracias a tu apoyo incondicional y a los grandes sacrificios que has hecho con el fin de educarme. Por haber sido madre y padre a la vez, nunca terminare de agradecerte todo lo que has hecho por mí, por eso y mucho más Gracias.

A mis abuelos, **Felipe Solís Paz y Elvira Peña Navarro** por haberme cuidado y educado como si fuera uno más de tus hijos.

A mi amada **U.N.A.M.** por brindarme las herramientas y el conocimiento necesario para el día de hoy levantar la cabeza con orgullo al ser egresado de esta maravillosa institución.

A mi asesora **Dra. Sara Esther Valdés Martínez** y a mi Co-asesora **Dra. Carolina Moreno** Ramos por sus enseñanzas y el tiempo dedicado a la revisión de este trabajo.

A los sinodales, muchas gracias por dedicar parte de su tiempo para revisar este trabajo.

A todos los profesores de la **FES Cuautitlán**, que a lo largo de mi trayectoria académica me transmitieron sus conocimientos incondicionalmente, siempre entregando lo mejor de sí.

A todos mis amigos de la carrera: **Ademir, Huguito, Yadir, Darki, Marco, Absalón, Ricardo, Aldo, Toño, Itzel, Citlalli, Luz, China, Marieli, Sonia, Araceli, Dacia, Karen**. Por sus consejos, enseñanzas y momentos inolvidables que pase a su lado.

A mis compañeros del taller: **Alina, Martín, Anita, Maggie, Wence** por la convivencia durante el taller.

A mi compañera **Pamela Arroyo Sondón**, por tu amistad, haberme aguantado tantos años... y por realizar este trabajo a tu lado.

“El Señor es mi fortaleza y mi escudo; confío en él con todo mi corazón”

Salmo 28:7ª

“Mira que te mando que te esfuerces y seas valiente; no temas ni desmayes, porque Jehová tu Dios estará contigo en dondequiera que vayas”

Josué 1:9

“Todos los hombres sueñan, pero no de igual manera. Aquellos que sueñan por las noches, en los polvorientos rincones de sus mentes, despiertan al día siguiente para encontrarse que todo fue vanidad...

Pero los soñadores de día son hombres peligrosos, porque ellos pueden actuar en sus sueños con los ojos abiertos, para hacerlos posibles. Esto fue lo que hice.

T.E. Lawrence

“Lawrence of Arabia”

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE TABLAS	12
ÍNDICE DE FIGURAS	13
ÍNDICE DE DIAGRAMAS	13
ÍNDICE DE GRÁFICOS	13
RESUMEN	15
CAPÍTULO 1: ANTECEDENTES	16
1.1 Generalidades de la Leche	16
1.1.1 Definición de Leche	16
1.1.2 Definición Fisicoquímica de Leche	16
1.2 Clasificación de Leche	16
1.3 Composición Química de Leche	17
1.3.1 Agua.....	18
1.3.2 Grasa.....	18
1.3.3 Proteínas	19
1.3.4 Lactosa.....	20
1.3.5 Vitaminas y Minerales	20
1.4 Características de Leche.....	22
1.4.1 Características Organolépticas	22
1.4.2 Características Fisicoquímicas	22
1.5 Consumo y Producción Nacional de Leche y Productos Lácteos	23
1.6 Conservación de la Leche	25
1.7 Pasteurización	26
1.8 Descremado	27
1.9 Productos a Base de Leche.....	30
1.10 Definición de Dulce de Leche	30
1.11 Clasificación de Dulces de Leche	30
1.12 Ingredientes y Aditivos en la Fabricación de Dulces de Leche.....	30
1.12.1 Azúcar o Sacarosa.....	30
1.12.2 Glucosa	31
1.12.3 Fructosa.....	31
1.12.4 Stevia	32

1.12.5	Bicarbonato de Sodio	32
1.12.6	Nuez.....	32
1.12.7	Café.....	32
1.12.8	Agua.....	33
1.12.9	Goma Xantana	33
1.13	Alimentos Funcionales	33
1.14	Fibra Dietaria	35
1.14.1	Inulina.....	36
1.15	Caramelización y Reacción de Maillard.....	39
1.15.1	Caramelización	39
1.15.2	Reacción de Maillard.....	40
1.15.3	Etapas de la Reacción de Maillard.....	41
1.16	Microbiología	45
1.16.1	Análisis Microbiológico de Alimentos	46
1.16.2	Microorganismos Indicadores y Criterios Microbiológicos.....	49
1.16.3	Indicadores de Calidad Microbiológica de Estudio	53
1.16.4	<i>Salmonella spp.</i>	54
1.16.5	Coliformes	54
1.16.6	<i>Escherichia coli</i>	55
1.16.7	<i>Staphylococcus aureus</i>	57
1.16.8	Mohos y Levaduras	57
1.16.9	Mesófilos aerobios	59
1.16.10	<i>Lactobacillus</i> y su Uso Como Probióticos.....	59
1.17	Justificación	63
CAPITULO 2: OBJETIVOS.....		65
2.1	Objetivo general.....	65
2.2	Objetivo particular 1	65
2.3	Objetivo particular 2	65
2.4	Objetivo particular 3	65
2.5	Objetivo particular 4	65
2.6	Objetivo particular 5	65
2.7	Objetivo particular 6	65

2.8	Objetivo particular 7	65
CAPITULO 3: METODOLOGÍA		66
3.1	Actividades preliminares	66
3.1.1	Pruebas de Andén	66
3.2	Acondicionamiento de leche de vaca	68
3.2.1	Descremado de la leche	68
3.2.2	Deslactosado de la leche	68
3.3	Materiales Biológicos para la elaboración del Dulce de Leche Tipo Gloria	69
3.4	Diagramas de Proceso para la Elaboración de Dulces de Leche Tipo Gloria	69
3.4.1	Descripción Del Diagrama de Proceso	71
3.5	Análisis Químico Proximal	74
3.5.1	Materias Primas (Leche y Nuez)	74
3.5.2	Dulce de Leche Tipo Gloria.....	75
3.6	Análisis Microbiológico	77
3.6.1	Materias Primas (Leche y nuez)	77
3.6.2	Dulce de Leche Tipo Gloria.....	79
3.7	Análisis Sensorial	79
3.7.1	Prueba de Intervalos	79
3.7.2	Prueba Hedónica	81
3.8	Funcionalidad de la Inulina	83
CAPITULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN		85
4.1	Pruebas de Andén	86
4.1.1	Acidez	86
4.1.2	pH	86
4.1.3	Alcohol.....	87
4.1.4	Densidad.....	87
4.1.5	Azúl de metileno o reductasas microbianas	88
4.2	Acondicionamiento de la leche de vaca.....	89
4.2.1	Descripción del diagrama de acondicionamiento de leche	89
4.3	Análisis Químico Proximal de Materias Primas (Leche y Nuez)	90
4.3.1	Leche	90
4.3.2	Nuez.....	92

4.4	Análisis Microbiológico de Materias Primas (Leche y Nuez).....	93
4.4.1	Leche	93
4.4.2	Nuez.....	97
4.5	Análisis Sensorial para Selección de Formulación Final del Dulce de Leche.....	101
4.6	Prueba de Aceptación o Rechazo del Producto Final (Prueba hedónica).....	106
4.7	Análisis Químico Proximal del Dulce de Leche.....	107
4.8	Análisis Microbiológico del Dulce de Leche	113
4.8.1	Coliformes totales	113
4.8.2	<i>Salmonella spp</i>	114
4.8.3	<i>Staphylococcus aureus</i>	114
4.9	Análisis de Funcionalidad de Inulina	115
	Conclusiones	118
	Recomendaciones	120
	REFERENCIAS CITADAS	121
	ANEXO 1: Pruebas de Andén.....	126
	ANEXO 2: Técnicas de Análisis Químico Proximal.....	131
	ANEXO 3: Técnicas de Análisis Microbiológico	142
	ANEXO 4: Metodología Para el Recuento de <i>Lactobacillus paracasei. Subsp., paracasei</i>	159

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de Leche	17
Tabla 2. Composición química de la leche.	18
Tabla 3. Especificaciones de leche pasteurizada, ultra pasteurizada y micro filtradas ultra.	23
Tabla 4. Usos de Inulina en Productos Alimenticios.	37
Tabla 5. Microorganismos y parásitos peligrosos según la gravedad del peligro.	49
Tabla 6. Organismos altamente correlacionados con la calidad del producto.	51
Tabla 7. Microorganismos indicadores de calidad para la leche bronca.	53
Tabla 8. Microorganismos indicadores de calidad para la nuez.	53
Tabla 9. Microorganismos indicadores de calidad para el dulce de leche.	54
Tabla 10. Pruebas bioquímicas que facilitan la identificación de algunas cepas de <i>E. coli</i>	56
Tabla 11. Cepas de microorganismos utilizadas como probióticos	61
Tabla 12. Pruebas de andén realizadas a la leche bronca.	66
Tabla 13. Calidad que debe tener la leche bronca basada en la prueba de azul de metileno.	68
Tabla 14. Condiciones a las que fue realizada la centrifugación de leche de vaca.	68
Tabla 15. Técnicas utilizadas para el análisis químico proximal de leche y nuez.	74
Tabla 16. Técnicas oficiales del AQP realizado al dulce de leche.	76
Tabla 17. Pruebas microbiológicas realizadas a leche y Nuez.	77
Tabla 18. Pruebas microbiológicas realizadas al dulce de leche tipo gloria.	79
Tabla 19. Formulaciones del Dulce de Leche Tipo Gloria Funcional	80
Tabla 20. Formulación final del Dulce de Leche Tipo Gloria Funcional.	82
Tabla 21. Frecuencia de siembra y recuento de <i>Lactobacillus casei</i>	84
Tabla 22. Resultados experimentales de acidez para la leche.	86
Tabla 23. Resultados experimentales de pH en la leche de vaca.	86
Tabla 24. Resultados experimentales de la prueba de alcohol.	87
Tabla 25. Valores experimentales de densidad en la leche de vaca.	87
Tabla 26. Resultados experimentales de la prueba de azul de metileno.	88
Tabla 27. Contenido de lípidos de la leche después del proceso de centrifugación.	90
Tabla 28. Resultados experimentales del AQP de leche.	91
Tabla 29. Resultados experimentales de humedad de la nuez por el método de estufa.	93
Tabla 30. Resultados de pruebas microbiológicas realizadas a la leche de vaca.	93
Tabla 31. Resultados de pruebas microbiológicas realizadas a la nuez.	97
Tabla 32. Resultados de la prueba sensorial, ordenados de acuerdo a las medidas de posición.	102
Tabla 33. Resultados del análisis de la humedad realizado al dulce de leche con sacarosa.	108
Tabla 34. Resultados experimentales de grasa realizado al dulce de leche con sacarosa.	108
Tabla 35. Resultados experimentales de cenizas del dulce de leche con sacarosa.	109
Tabla 36. Resultados experimentales de fibra del dulce de leche con sacarosa.	110
Tabla 37. Resultados experimentales de humedad del dulce de leche con fructosa.	110
Tabla 38. Resultados experimentales de grasa del dulce de leche con fructosa.	111
Tabla 39. Resultados experimentales de cenizas en el dulce de leche con fructosa.	112
Tabla 40. Resultados experimentales de fibra del dulce de leche con fructosa.	113
Tabla 41. Resultados de pruebas microbiológicas realizadas al dulce de leche.	113

Tabla 42. Resultados de crecimiento del cultivo probiótico <i>Lactobacillus paracasei subsp. Paracasei</i>	116
---	-----

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Base de Schiff.	41
Figura 2. Obtención de la Glucosil-glicina.	42
Figura 3. Fructosilamina.	42
Figura 4. Transposiciones de Amadori y Heyns.	44
Figura 5. Polimerización y formación de sustancias coloreadas.	45
Figura 6. Formato utilizado en la Prueba de Intervalos	81
Figura 7. Formato utilizado en la Prueba Hedónica	82
Figura 8. Colonias características de Coliformes totales sobre el agar RVBA.	94
Figura 9. Caja Petri control y Caja Petri enriquecida en <i>Salmonella</i> , para la leche.	96
Figura 10. Crecimiento de colonias típicas de <i>S. aureus</i> en la leche.	97
Figura 11. Crecimiento de grupo Coliforme en las diluciones 10^{-2} en la nuez, mediante el método de recuento en placa.	98
Figura 12. Dilución 10^{-2} con crecimiento de <i>S. aureus</i> y placa Petri control, respectivamente.	99
Figura 13. Caja Petri control y placa con la dilución 10^{-3} para el recuento de bacterias mesofílicas aerobias.	100
Figura 14. Desarrollo de colonias de mohos sobre el agar papa-dextrosa acidificado.	101
Figura 15. Cajas Petri enriquecidas en Coliformes totales para el dulce de leche.	114

ÍNDICE DE DIAGRAMAS

Diagrama 1. Métodos de conservación de leche fluida.	28
Diagrama 2. Productos lácteos.	29
Diagrama 3. Modo de transmisión de enfermedades alimentarias.	48
Diagrama 4. Microorganismos y virus de interés en el área de alimentos.	52
Diagrama 5. Cuadro Metodológico utilizado para la elaboración del dulce de leche tipo gloria.	64
Diagrama 6. Diagrama de Proceso para la Elaboración del Dulce de Leche Tipo Gloria con Sacarosa.	70
Diagrama 7. Diagrama de Proceso para la Elaboración del Dulce de Leche Tipo Gloria con Fructosa.	73
Diagrama 8. Proceso de acondicionamiento de la leche de vaca.	89

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Producción a nivel nacional (millones de litros) de leche de vaca de enero a mayo del 2015.	24
Gráfico 2. Producción Industrializada de productos lácteos (miles de toneladas).	24
Gráfico 3. Producción y consumo interno de leche en México (millones de litros).	25
Gráfico 4. Panel de consumidores para la prueba sensorial.	102
Gráfico 5. Gráfico de caja y bigotes para el parámetro de Dulzor.	103
Gráfico 6. Gráfico de caja y bigotes para el parámetro de Cremosidad.	103

Gráfico 7. Gráfico de caja y bigotes para el parámetro de Sabor.	103
Gráfico 8. Gráfico de caja y bigotes para el parámetro de Pegajosidad.	103
Gráfico 9. Niveles de preferencia de los consumidores.	105
Gráfico 10. Composición del jurado para la prueba de aceptación o rechazo.	106
Gráfico 11. Resultados del sensorial de aceptación del producto final.	106
Gráfico 12. Crecimiento de <i>Lactobacillus paracasei subsp. Paracasei.</i> , en escala logarítmica.	116

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue elaborar un dulce de leche tipo gloria, reducido en grasa, deslactosado, sin azúcar y adicionado con prebióticos como alimento funcional. Objetivo que fue cumplido en su totalidad. En primera instancia se realizaron las pruebas de Andén (Densidad, Azul de metileno, pH, Acidez, Alcohol) a leche de vaca con el fin de validar su calidad fisicoquímica.

Esta leche al ser bronca, se pasteurizó y se acondicionó para el proceso de transformación, fue descremada, con lo que se redujo en 48.56% el contenido de lípidos de la misma, a su vez se deslactosó, con este proceso se logró una hidrólisis del 85% de la lactosa.

Se realizó el AQP pertinente a leche de vaca con el fin de verificar su composición química, obteniéndose lo siguiente: Carbohidratos (5.3%), proteínas (2.77%), Cenizas (0.94%), grasa (4.53%) y humedad (86.43%).

La NOM-243-SSA1-2010, exige que se realicen análisis microbiológicos de rutina a leche de vaca, estos son: Coliformes totales, Coliformes fecales (*E.Coli*), *Salmonella spp.*, *Staphylococcus aureus*, dichas pruebas fueron realizadas a leche de vaca y en ninguna se rebaso el límite permitido por esta Norma Oficial Mexicana. A la vez, además de las pruebas microbiológicas mencionadas anteriormente, se le realizó mesófilos aerobios, mohos y levaduras, parámetros exigidos por la NOM-FF-093-SCFI-2011, en ninguna de estas pruebas se rebaso los límites indicados en dicha norma.

Se realizó un análisis sensorial para elegir la mejor formulación de acuerdo a la percepción de los consumidores, se utilizó una prueba de intervalos, con la cual se pudo medir el nivel de preferencia en 4 parámetros fundamentales (Cremosidad, Pegajosidad, Sabor, Dulzor), para 3 formulaciones distintas que determinaron la aceptación de este tipo de producto. Seguido de esta prueba, con la formulación seleccionada, se sometió esta a otro análisis sensorial, para evaluar la aceptabilidad o rechazo que tendría el producto de ser introducido al mercado, se utilizó una escala hedónica, de esta prueba se puede destacar que el 90% de los consumidores estaría de acuerdo en comprar el producto, mientras que únicamente el 10% indicó que le sería indiferente comprarlo.

Se realizó el análisis químico proximal a los 2 tipos de dulce de leche, el primero contiene leche entera, sin deslactosar y sacarosa en su formulación, destacando los siguientes resultados: Carbohidratos (55.33%), grasa (12.48%) y fibra (2.97%). El otro dulce de leche elaborado contiene leche descremada, deslactosada y fructosa en su formulación, del AQP, realizado se pueden destacar los siguientes resultados: Carbohidratos (57.81%), grasa (9.69%) y fibra (3.18%). A este último se realizó un análisis microbiológico de Coliformes totales, *Salmonella spp.*, y *Staphylococcus aureus*. Ninguna de ellas rebaso los límites permisibles exigidos en la NOM-243-SSA1-2010. Por último para comprobar la funcionalidad de la inulina como prebiótico, se inocularon 2 muestras del dulce de leche funcional con un cultivo de *Lactobacillus paracasei subsp. Paracasei*, la primera de ellas contiene únicamente el cultivo en su formulación y la otra incluye inulina y dicho cultivo. Se midió el crecimiento de este microorganismo durante un periodo de 32 días, se mantuvo el crecimiento de este m.o. en 5.37×10^6 durante 20 días y 6.39×10^6 durante 24 días, respectivamente. Con lo que se comprobó la acción prebiótica de la inulina.

CAPÍTULO 1: ANTECEDENTES

1.1 Generalidades de la Leche

En este capítulo se presentan las características principales que definen a la leche de vaca, tanto su composición química, como su estructura fisicoquímica y los diversos nutrientes que ésta contiene.

1.1.1 Definición de Leche

- **Leche para consumo humano**

“Leche que debe ser sometida a tratamientos térmicos u otros procesos que garanticen la inocuidad del producto; además puede ser sometida a operaciones tales como clarificación, homogeneización, estandarización u otras, siempre y cuando no contaminen al producto y cumpla con las especificaciones de su denominación¹”.

- **Definición General**

“Es el producto obtenido de la secreción de las glándulas mamarias de las vacas, sin calostro el cual debe ser sometido a tratamientos térmicos u otros procesos que garanticen la inocuidad del producto; además puede someterse a otras operaciones tales como clarificación, homogeneización, estandarización u otras, siempre y cuando no contaminen al producto y cumpla con las especificaciones de su denominación¹”.

1.1.2 Definición Fisicoquímica de Leche

La leche es un sistema biológico muy complejo en el que se presentan tres estados físicos de dispersión de sus múltiples constituyentes:

- a) **Solución verdadera:** donde se encuentran disueltas la lactosa, así como las sales minerales (calcio y fósforo), los cationes, los aniones, el azúcar, proteínas solubles (las globulinas y la lacto albúmina) y las vitaminas hidrosolubles (vitamina C).
- b) **Dispersión coloidal:** donde las micelas de proteínas insolubles, las caseínas α , γ , β , κ se encuentran distribuidas.
- c) **Emulsión:** se encuentran distribuidos glóbulos de grasa en el agua; y éstos glóbulos contienen sustancias liposolubles como los precursores de la vitamina A y D, además de fosfolípidos como la lecitina y esterole^{2,3}.

1.2 Clasificación de Leche

La NOM-155-SCFI-2003, clasifica la leche por tipo de grasa, tipo de proceso, por sabor y por funcionalidad, si es que ésta ha sido adicionada con algún aditivo, a continuación se presentan dichas clasificaciones.

En la Tabla 1 se muestra la clasificación de leche:

Tabla 1. Clasificación de Leche

CLASIFICACIÓN		
POR TIPO DE GRASA	Grasa butírica	Entera Semidescremada Parcialmente descremada Descremada
	Grasa vegetal	Con grasa vegetal
POR TIPO DE PROCESO	Primario	Rehidratada Reconstituida Deslactosada
	Secundario	Pasteurizada Ultra pasteurizada Micro filtrada Ultra Evaporada Condensada Azucarada Deshidratada o en polvo Concentrada
POR SABOR		Con sabor a... Sabor a...
POR FUNCIONALIDAD		Con prebióticos Con probióticos Con Omegas Con cardioprotectores

Fuente: NOM-155-SCFI-2003, Leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado-Denominaciones, especificaciones fisicoquímicas, información comercial y métodos de prueba, pág. 11 www.ordenjuridico.gob.mx/Publicaciones/CDs2007/CDAgropecuaria/pdf/83NOM.pdf 13 de Septiembre de 2013.

1.3 Composición Química de Leche

“La composición de la leche refleja el hecho de que es la única fuente de alimento para los mamíferos muy jóvenes. De aquí que esté compuesta por una mezcla compleja de lípidos, proteínas, carbohidratos, vitaminas y minerales⁴”.

En la Tabla 2 se muestra la composición química de la leche de vaca entera:

Tabla 2. Composición química de la leche.

Constituyente	Contenido (%)
Agua	85.4-87.7
Grasa	3.4-5.1
Proteínas	3.3-3.9
Lactosa	4.9-5.0
Cenizas	0.68-0.74

Fuente: Fennema Owen R. (2000). *Química de los alimentos*. 2ª. Ed. Acribia, Zaragoza, España, pp. 1000.

1.3.1 Agua

El contenido de **agua** de la leche de las diferentes especies de mamíferos puede variar del 36 al 90.5%; sin embargo normalmente representa el 87% del contenido total de la leche. Dicha variación se debe a la alteración de cualquiera de sus otros componentes: proteínas, lactosa y, sobre todo, grasa. Por su importante contenido de agua, la leche permite que la distribución de sus componentes sea relativamente uniforme y de esta forma cualquier cantidad de leche, por pequeña que sea, contiene casi todos los nutrimentos disponibles^{4,6}.

1.3.2 Grasa

Los **lípidos** figuran entre los constituyentes más importantes de la leche y sus derivados, ya que confieren características únicas de sabor, contenido nutrimental y propiedades físicas. La grasa de la leche es una buena fuente de energía y un excelente medio de transporte de las vitaminas liposolubles A, D, E, y K. El caroteno, precursor de la vitamina A, da a la leche el color “crema”. Debido a que las vitaminas se encuentran en pequeñas cantidades, es aconsejable fortificar la leche con vitamina D y también con vitamina A. Algunos de los productos que son fabricados a partir de la grasa de leche son la mantequilla, los helados y las cremas^{4,6}.

La fracción grasa de la leche se presenta en forma de glóbulos microscópicos de unas 4.4 μ diámetro en forma de emulsión. Tanto el contenido total de lípidos como el de ácidos grasos puede variar considerablemente como respuesta a cambios en la dieta, raza del animal y el estado de lactancia entre un 3 y un 6%, aunque típicamente el contenido de grasa puede estar entre 3.5% y 4.7%. El factor que más influye en el contenido de lípidos en la leche es, en definitiva, la especie animal⁴.

La composición grasa de la leche está conformada en su mayoría por triglicéridos (aproximadamente 98%), diacilglicerol (2%), colesterol (menos del 0.5%), fosfolípidos (alrededor del 1%) y ácidos grasos libres (0.1%). Debido a que la grasa de leche se encuentra relativamente emulsificada, es de fácil digestión^{4,3}.

En la leche de vaca, los ácidos grasos saturados constituyen el 70% del peso total de la grasa, siendo el ácido palmítico el más común ya que representa el 30% de la grasa láctea por peso, seguido por el

ácido mirístico y esteárico, que constituyen el 11 a 12% del peso. El 10.9% de los ácidos grasos saturados son de cadena corta. El contenido de ácido butírico y caproico en promedio es del 4.4%, y apenas representan el 2.4% del total de ácidos grasos⁴.

El ácido butírico es un ácido graso saturado de cuatro átomos de carbono, único en lácteos, y es considerado de mayor importancia porque se le cree responsable del sabor característico de la crema y de la mantequilla, así como del sabor rancio^{4, 6}. Este ácido graso es el principal sustrato de los microorganismos presentes en el colon para la obtención de energía, comparado con la glucosa, glutamina y cuerpos cetónicos⁴.

Aproximadamente el 2.7% de los ácidos grasos de la leche son ácidos grasos *trans*, con una o más dobles ligaduras. La grasa de la leche también contiene ácidos grasos linoléicos conjugados (ALC). Existen evidencias experimentales que implican a estos ácidos grasos en la reducción de peso y volumen del adenocarcinoma de mama y colon en modelos animales; también se ha indicado que pueden estimular la actividad de la enzima carnitin-palmitoiltransferasa en el músculo, lo que indica que pueden favorecer la pérdida de peso, ya que producen la movilización del tejido adiposo y conservan las reservas proteínicas⁴.

1.3.3 Proteínas

La función primaria de las **proteínas lácteas** es el aporte suficiente de aminoácidos indispensables y de nitrógeno orgánico para la síntesis y reparación de tejidos y otras proteínas de importancia biológica. La leche de vaca es considerada una excelente fuente de proteínas de alto valor biológico, ya que contiene los diez aminoácidos indispensables⁴.

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

- **Caseínas:** están constituidas por las fracciones α , β , κ y γ caseínas, que se distinguen entre sí por su composición de aminoácidos y propiedades funcionales. Las caseínas se encuentran suspendidas en la leche a través de micelas, formadas por complejos macromoleculares de fosfoproteínas y glucoproteínas en suspensión coloidal. El papel nutrimental de la caseína es el suministro de aminoácidos, calcio y fósforo inorgánico⁴.
- **Proteínas del suero de leche:** también conocidas como seroproteínas, se consideran proteínas solubles y se clasifican principalmente en albúminas y globulinas, entre las que se incluyen α -lacto albúminas, β -lacto globulinas, inmunoglobulinas, proteasas-peptonas y otros compuestos nitrogenados minoritarios no específicos como lactoferrina y lisozima. Las seroproteínas son consideradas proteínas de alto valor biológico que cuentan con un amplio perfil de aminoácidos que incluye aminoácidos azufrados como la cisteína y la metionina,

aminoácidos de cadena ramificada y lisina y triptófano, con lo que se compensan las deficiencias de la caseína⁴.

Industrialmente, las proteínas del suero de leche se utilizan en la fabricación de fórmulas infantiles, alimentos para deportistas y como fuente de aminoácidos de cadena ramificada (leucina, isoleucina, valina) para las fórmulas especializadas⁴.

1.3.4 Lactosa

La **lactosa** es el principal carbohidrato de la leche, y la contiene en un 4.5% aproximadamente. Es un 85% menos dulce que la sacarosa o azúcar común y contribuye, junto con las sales, en el sabor global de la leche, siendo las cantidades de lactosa y sales inversamente proporcionales. La lactosa es fácilmente transformada en ácido láctico por la acción de bacterias^{4,3}.

La lactosa (4-O-β-D-galactopiranosil-D-glucopiranososa) se encuentra exclusivamente en la leche de los mamíferos y está constituida por una molécula de galactosa y otra de glucosa, unidas mediante un enlace glucosídico β (1,4)³. Algunos grupos étnicos no la toleran, fundamentalmente porque el jugo intestinal de su sistema digestivo carece de la enzima β-D-galactosidasa, llamada lactasa. Esta condición llamada intolerancia a la lactosa, produce síntomas muy desagradables, como náusea, cólico, flatulencias y diarrea con espuma, que suelen presentarse entre una y dos horas después de consumir un producto que la contenga^{3,5,6}.

La cantidad de leche que se sintetiza en los mamíferos depende de la lactosa producida. Para el ser humano, la lactosa constituye la única fuente de galactosa, un importante constituyente de los tejidos nerviosos⁴.

La lactosa es el principal factor en el control de la fermentación y maduración de los productos lácteos, contribuye al valor nutritivo de la leche y subproductos, está relacionada con la textura y solubilidad de algunos alimentos congelados y juega un papel muy importante en el color y sabor de los productos tratados con altas temperaturas⁶.

1.3.5 Vitaminas y Minerales

Las **vitaminas** son sustancias orgánicas necesarias para mantener la vida. Están presentes en pequeñas cantidades en la mayoría de los alimentos y regulan la utilización de los carbohidratos, grasas, proteínas y minerales⁶. La **leche** contiene una gran cantidad de vitaminas en diferente proporción, y están agrupadas en liposolubles e hidrosolubles⁶, las cuales se desarrollan a continuación:

- **Vitaminas liposolubles:** tanto la leche como los productos lácteos son considerados una importante fuente alimentaria de vitamina A; dicha vitamina interviene en funciones relacionadas con la visión, expresión génica, desarrollo embrionario, crecimiento, reproducción e inmuno competencia. Tanto la vitamina A como sus precursores llamados

carotenoides principalmente β -caroteno- están presentes en distintas cantidades en la fracción grasa de la leche⁴.

La vitamina D interviene en la absorción del calcio y fósforo en el intestino y resulta indispensable para el buen mantenimiento del esqueleto a lo largo de la vida. Se encuentra en muy bajas concentraciones en el caso de leche y derivados a los que no se les ha adicionado esta vitamina⁴.

La vitamina E también llamada tocoferol es considerada un antioxidante que protege a las membranas de las células del daño por radicales libres. Además, participa en la respuesta inmunitaria. Incluso algunos estudios la consideran como un factor de protección de algunos tipos de cáncer y enfermedades cardiovasculares. Esta vitamina está presente en la leche en bajas concentraciones al igual que la vitamina K⁴. El contenido de dichas vitaminas depende de la dieta de la vaca³.

- **Vitaminas hidrosolubles:** tanto la leche como sus derivados contienen la gran mayoría de las vitaminas solubles en distintas cantidades, aunque destacan el contenido de vitamina B₂ (riboflavina) y niacina; la leche aporta en menor cantidad vitamina B₁ (tiamina), vitamina B₆ (piridoxina) y ácido fólico⁴. Estas vitaminas se encuentran en el suero³.

La leche aporta elementos **minerales** indispensables para el organismo humano y es la fuente más importante de calcio biodisponible de la dieta. Su buena absorción se da gracias a la presencia de lactosa y de vitamina D y a su unión con los fosfopéptidos derivados de la hidrólisis de la caseína, además de que la adecuada relación calcio: fósforo (mayor a la unidad) favorece su absorción en el intestino humano³. Por ello se considera que la leche de vaca es la mejor fuente de calcio tanto para el crecimiento de los huesos en jóvenes como para el mantenimiento de la integridad ósea en los adultos⁴.

La leche de vaca contiene alrededor de 7 gramos de minerales por litro en promedio. La distribución y concentración de estos elementos en la mezcla de fases que la constituyen varía de acuerdo al mineral de que se trate⁴.

En la **fase acuosa continua** se encuentran disueltas, conjuntamente con lactosa y compuestos nitrogenados solubles, sales minerales u orgánicas como citratos, fosfatos y cloruros de calcio, potasio, magnesio, sodio y trazas de hierro^{4,3}.

En la **fase coloidal** están en suspensión micelas de caseína insoluble que contienen aproximadamente un 20% de calcio y fósforo unidos a su estructura y sales compuestas de fosfato de calcio coloidal, citratos y magnesio en proporciones fijas, que contribuyen a estabilizar las micelas. Los glóbulos de grasa emulsionados contienen un 1% de fosfolípidos y en sus membranas se fijan hierro, cobre, zinc y manganeso^{4,3}.

Más de la mitad del hierro y alrededor del 80% del zinc y cobre se fijan a micelas de caseína y entre el 15 y 30% del hierro, zinc y cobre se unen a las proteínas solubles⁴.

La alimentación del bovino y los cambios estacionales no influyen de manera significativa en la concentración de minerales en la leche, por lo tanto el contenido mineral casi no varía a lo largo del año. El contenido de calcio, fósforo y magnesio no depende de la ingestión porque el animal puede recurrir a sus reservas óseas; tampoco se modifican las concentraciones de sodio, potasio y cloro aun cuando aumente la ingestión⁴.

1.4 Características de Leche

En seguida se abordan las distintas características (organolépticas y fisicoquímicas) que distinguen a la leche de vaca.

1.4.1 Características Organolépticas

Color: la leche es un líquido blanquecino amarillento y opaco, color característico que se debe principalmente a la dispersión de la luz por las micelas de fosfocaseinato de calcio. Los glóbulos grasos también dispersan la luz pero contribuyen muy poco en el color blanco de la leche. Por último, el caroteno y la riboflavina contribuyen al color amarillento⁶.

Asimismo, el color de la leche varía según el proceso al que haya sido sometida; por ejemplo, la pasteurización mediante el uso de temperaturas altas intensifica su blancura y opacidad, la esterilización la cambia a café claro, y el descremado deja a la leche descremada de color blanco azulado⁶.

Olor: la leche recién ordeñada tiene un ligero olor a medio ambiente donde es obtenida, pero luego desaparece. El olor de la leche comercial es no perceptible; salvo que sea un olor ajeno a ella. Entre estos olores ajenos están los que provienen de algunos alimentos, medio ambiente, utensilios y de los microorganismos⁶.

Sabor: la leche fresca normal tiene un sabor ligeramente dulce debido principalmente a su alto contenido de lactosa; todos los elementos, e inclusive las proteínas que son insípidas, participan en forma directa o indirecta en la sensación del sabor que percibe el consumidor⁶.

1.4.2 Características Fisicoquímicas

En la Tabla 3 se muestran las características fisicoquímicas de la leche de vaca.

Tabla 3. Especificaciones de leche pasteurizada, ultra pasteurizada y micro filtradas ultra.

Especificaciones	Límite		
	Entera	Parcialmente descremada	Descremada
Densidad a 15°C, (g/mL)	1.029 mín.	1.029 mín.	1.031 mín.
Grasa butírica g/L	30 mín.	28 máx. 6 mín.	5 máx.
Acidez (expresada como ácido láctico) g/L	1.3 mín. 1.7 mín.	1.3 mín. 1.7 mín.	1.3 mín. 1.7 mín.
Sólidos no grasos de la leche g/L	83 mín.	83 mín.	83 mín.
Punto crioscópico °C (°H)	Entre -0.510 (-0.530) y -0.536 (-0.560)	Entre -0.510 (-0.530) y -0.536 (-0.560)	Entre -0.510 (-0.530) y -0.536 (-0.560)
Lactosa g/L	43 mín. 50 máx.	43 mín. 50 máx.	43 mín. 50 máx.
Proteínas propias de la leche g/L	30 mín.	30 mín.	30 mín.
Caseína g/L	21 mín.	21 mín.	21 mín.

Fuente: NOM-155-SCFI-2003, Leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado-Denominaciones, especificaciones fisicoquímicas, información comercial y métodos de prueba, pág. 11 www.ordenjuridico.gob.mx/Publicaciones/CDs2007/CDAgropecuaria/pdf/83NOM.pdf 13 de Septiembre de 2013.

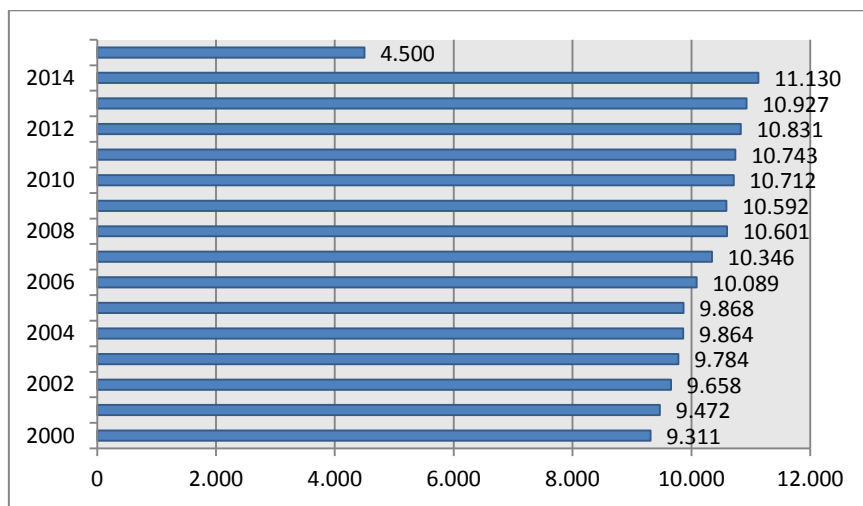
1.5 Consumo y Producción Nacional de Leche y Productos Lácteos

El conocimiento de la magnitud de la producción y consumo de leche y productos lácteos muestra la importancia de la leche y sus derivados en la dieta del mexicano, ya que no solo se consume más leche de la que se produce en el país, sino que muestra que hay diferentes maneras en las que se puede transformar la leche para su consumo y conservación.

Aunque no hay datos estadísticos específicos sobre la producción industrializada de dulces a base de leche tipo gloria, se estima que en general la producción industrializada de dulces a base de leche corresponde a menos del 8% de la producción de derivados y/o productos lácteos (ver Gráfico 2).

En el Gráfico 1, se muestra la producción nacional de leche fluida:

Gráfico 1. Producción a nivel nacional (millones de litros) de leche de vaca de enero a mayo del 2015.

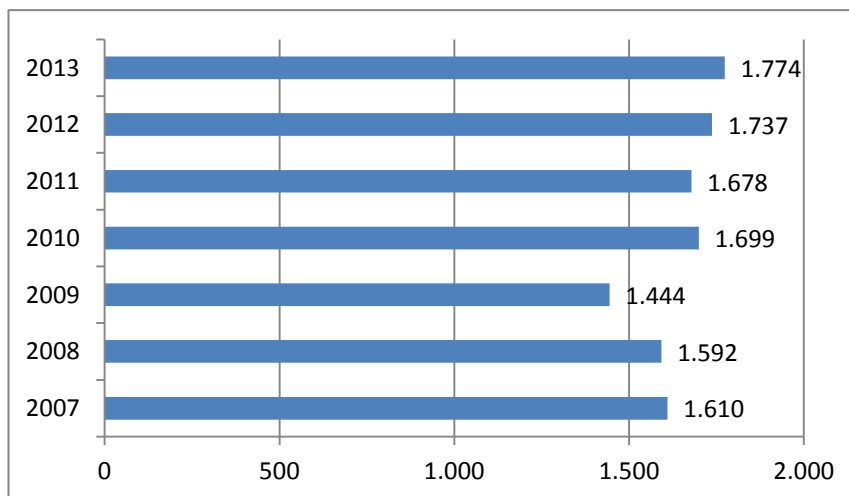


Fuente: Servicio de Información Estadística Agroalimentaria y Pesquera (SIAP), SAGARPA, http://www.canilec.org.mx/estadisticas_produccion.php 15 de Julio de 2015.

La producción industrializada de leche es la mayormente consumida en el país, ya que es de fácil acceso tanto en los centros comerciales, como en las tienditas de la esquina. La leche puede ser encontrada en diferentes presentaciones de leche fluida (entera, semidescremada, descremada, saborizada, deslactosada, adicionada con prebióticos, etc.) así como en un producto de ésta (yogurt, queso, dulces de leche, etc.)⁷.

En el Gráfico 2, se observa cómo ha incrementado con los años la producción industrial en nuestro país:

Gráfico 2. Producción Industrializada de productos lácteos (miles de toneladas).

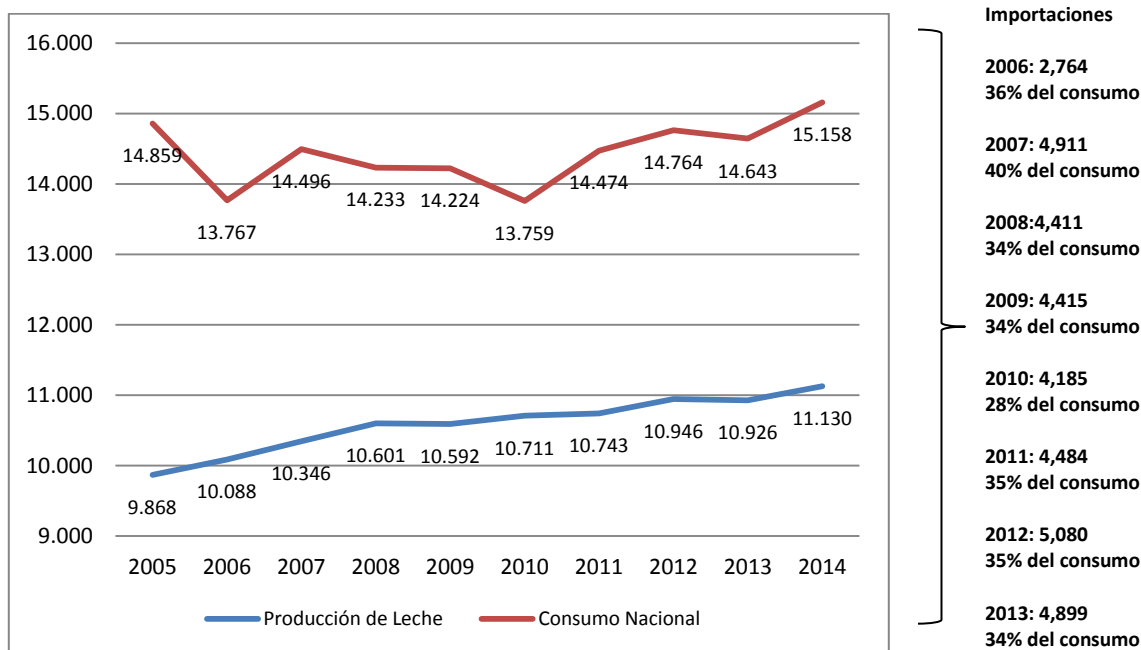


Fuente: Servicio de Información Estadística Agroalimentaria y Pesquera (SIAP), SAGARPA, http://www.canilec.org.mx/estadisticas_industrial.php 15 de Julio de 2015.

Para obtener el valor de la gráfica se incluye la producción de quesos (Chihuahua, Panela, Oaxaca, Fresco, entre otros), mantequilla, margarina, yogurt (con frutas/cereales, para beber), crema, leche en polvo (entera y descremada), leche pasteurizada y ultra pasteurizada (entera y descremada en ambos casos), así como rehidratada.

El Gráfico 3 muestra con claridad las diferencias cuantitativas que existen entre ambas variables, (producción y consumo):

Gráfico 3. Producción y consumo interno de leche en México (millones de litros).



Fuente: Servicio de Información Estadística Agroalimentaria y Pesquera (SIAP), SAGARPA, Administración General de Aduanas http://www.canilec.org.mx/estadisticas_consumo.php 15 de Julio de 2015.

Por su parte, el consumo, ha tenido un avance mucho mayor en relación a la producción nacional, situación que convierte a nuestro país en deficitario en la producción de leche. La condición deficitaria se seguirá manteniendo e irá en aumento debido a las limitaciones propias que como país tenemos en recursos naturales, principalmente agua. La deficiencia nacional es cubierta por medio de la exportación de leche de otros países⁷.

1.6 Conservación de la Leche

Los distintos medios de conservación de la leche, son muy variados, van desde procesos muy sencillos como la pasteurización hasta procesos más sofisticados como la liofilización. Incluso cuando el consumidor va al supermercado y compra leche (entera, pasteurizada, en polvo, ultra pasteurizada, leches saborizadas, etc.) y sus derivados (yogurt, queso, dulces, fórmulas, natillas, crema, mantequilla, etc.), está comprando sin saberlo productos lácteos que pasaron por un proceso de conservación.

Todo proceso de conservación sin importar de qué producto alimenticio se trate, tiene la finalidad de alargar su vida de anaquel o diversificar a la materia prima, para satisfacer las necesidades del ser humano.

El principal método de conservación de la leche es la pasteurización, ya que el principal factor que afecta la calidad de la leche, son los microorganismos presentes de forma natural o accidental en ella, por lo que es necesario que la leche sea sometida a un tratamiento térmico, que garantice que la leche sea inocua⁴.

1.7 Pasteurización

Según la NOM-155-SCFI-2003, se le llama **pasteurización**, al tratamiento térmico al que se somete la leche, fórmula láctea o el producto lácteo combinado, consistente en una relación de temperatura y tiempo que garantice la destrucción de organismos patógenos y la inactivación de algunas enzimas de los alimentos¹.

Básicamente, la pasteurización de la leche tiene dos objetivos: uno para conservar la salud, al obtenerse un producto inocuo para el consumo humano; y otro, para mejorar y mantener la calidad de la leche y de los productos lácteos, gracias a que, durante la pasteurización se destruyen algunas enzimas indeseables y muchos microorganismos que deterioran la leche. De este modo, se aumenta la vida de anaquel de la leche⁴.

El grado de inactivación de los microorganismos depende de la combinación de temperatura y tiempo; los requerimientos mínimos de temperatura y tiempo de pasteurización de la leche están basados en aquellos requeridos para destruir las bacterias patogénicas más termo resistentes: *Coxiella burnetii* y *Mycobacterium tuberculosis*^{4,6,8}.

De acuerdo a su relación temperatura-tiempo, existen dos tipos de pasteurización: lenta y rápida, también llamadas “**pasteurización por lotes**” (**batch**) y “**pasteurización continua**”, respectivamente. La pasteurización rápida también se conoce como HTST (High Temperature Short Time) por sus siglas en inglés, que significan “alta temperatura tiempo corto^{4,6}”:

- En la **pasteurización lenta**, la leche se somete a una temperatura de 63°C, por un periodo mínimo de 30 minutos u otra relación de tiempo y temperatura equivalente. El proceso se lleva a cabo en una tina con tapa y con agitador y debe de contar, por lo menos, con un sistema para registro y control de la temperatura y tiempo del proceso y con un termómetro de mercurio o su equivalente^{4,6}.
- En la **pasteurización rápida o continua (HTST)**, la leche se somete a una temperatura de 72°C, por un período mínimo de 15 segundos, u otra relación de tiempo y temperatura equivalente. El equipo consta de una serie de intercambiadores de calor, compuestos de múltiples placas metálicas onduladas, rectangulares o circulares de disposición generalmente vertical, unidas entre sí por juntas de goma y dispuestas en un bastidor. El espacio que separa cada dos

placas consecutivas (de unos 3 o 4 mm) es recorrido por la leche; el elemento calefactor, agua o vapor a baja presión, circula a contracorriente por los espacios paralelos inmediatos. El equipo cuenta también con un sistema de control y registro automático de la temperatura y tiempo del proceso y no permite el paso del producto si no se ha alcanzado la temperatura mínima establecida que se registra por medio de un termómetro de mercurio o su equivalente colocado el final de la “zona de mantenimiento” del equipo. La temperatura registrada en el sistema de control y registro del proceso debe ser igual o menor de 1.0°C con respecto a la temperatura que indique dicho termómetro^{4,6}.

Otro tipo de conservación de la leche, es por medio de la separación sus componentes, como por ejemplo el descremado, el cual se describe a continuación:

1.8 Descremado

El descremado consiste en la separación de la crema y de la leche descremada a partir de la leche entera. El descremado de la leche es efectuado gracias a la diferencia en gravedad específica de la grasa ($G_{eg} = 0.93$) y de leche descremada ($G_{ed} = 1.035$), aprovechando la inestabilidad de la emulsión en que se encuentra la grasa de la leche. Por las razones antes mencionadas es posible el descremado natural o por gravedad, y el mecánico o por centrifugación^{4,6}.

- **Descremado natural**, también es conocido como descremado espontáneo, por gravedad o por reposo. Esta forma de descremado es muy ineficiente, ya que puede perderse del 10 al 20% de la grasa disponible. Su método toma de 24 a 36 horas de reposo⁶.
- **Descremado mecánico**, este sistema tiene tres ventajas importantes: la rapidez del desnatado, la calidad de la crema obtenida y la eficiente separación de la grasa. Para facilitar la operación de la máquina descremadora es conveniente que la leche se encuentre entre 26 y 35°C de temperatura, aunque también hay descremadoras diseñadas para trabajar con leche a 4°C de temperatura⁶.

Cuanto mayor es la velocidad de la descremadora, mayor es el contenido graso de la crema. El aumento de velocidad permite mayor flujo de leche descremada y por ende menor cantidad de ésta con la crema, lo cual hace que el porcentaje de grasa en la crema sea mayor⁶.

- **Descremadora abierta**, en éste tipo de descremadoras la concentración de grasa en la crema es hecha por medio del tornillo regulador; cuanto más cerca del eje esté el tornillo, más concentrada en grasa es la crema y viceversa. Por otra parte, la leche descremada contiene mucha espuma que tarda en desaparecer⁶.

- **Descremadora semi cerrada**, también llamadas descremadoras semi herméticas, la entrada de la leche entera es abierta y las salidas de crema y de leche descremada son cerradas, o mejor dicho, van por tuberías hasta los tanques de almacenamiento. No hay espuma⁶.
- **Descremadora hermética**, es éste tipo de descremadoras, las entradas y salidas son cerradas, o sea que la leche entera entra bajo presión y la salida de la crema y leche descremada se hace directamente por las canalizaciones o líneas de tuberías, bajo presión. En este sistema no se forma espuma en la leche descremada y la capacidad de las descremadoras puede llegar a 25 000 litros por hora, además de permitir la normalización o regulación del contenido de grasa en la leche fluida, por recombinación de la crema y de la leche descremada⁶.
Todas las descremadoras herméticas son también clarificadoras además de estandarizadoras, y por ello se les conoce como las máquinas tri-procesadoras⁶.

A continuación, en los diagramas 1 y 2 se observan las diferentes formas en que se puede conservar la leche de vaca, por medio de diferentes procesos mediante los cuales se cambian las características originales de leche.

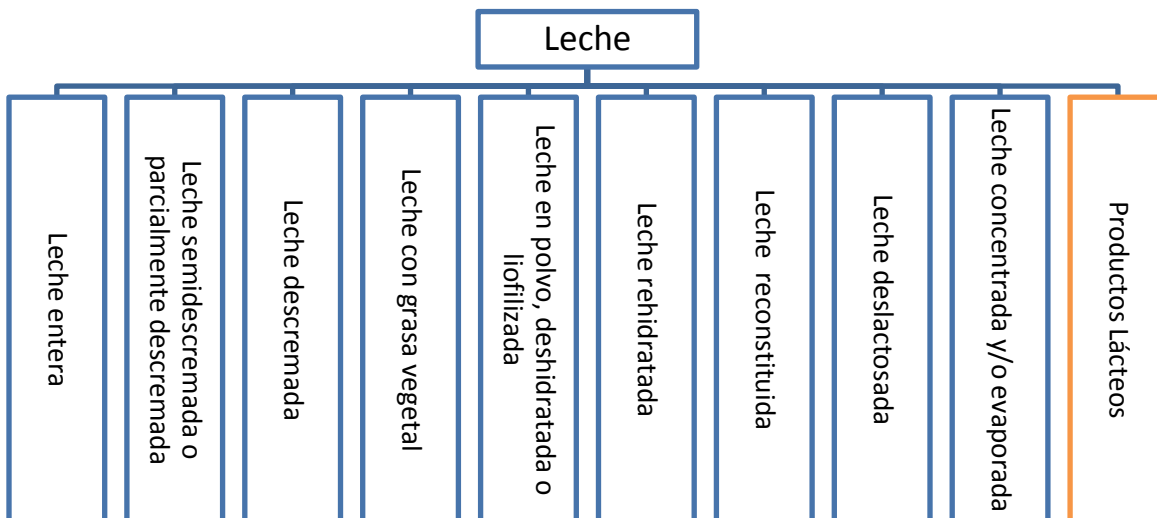


Diagrama 1. Métodos de conservación de leche fluida.

Esta es solo una sugerencia de como puede clasificarse la leche, pues ya que existen diversas formas de clasificarla, pero una forma sencilla y practica es clasificarla en bae a los metodos de conservacion a los que esta puede sometese, tal y como se muestra en el Diagrama 1.

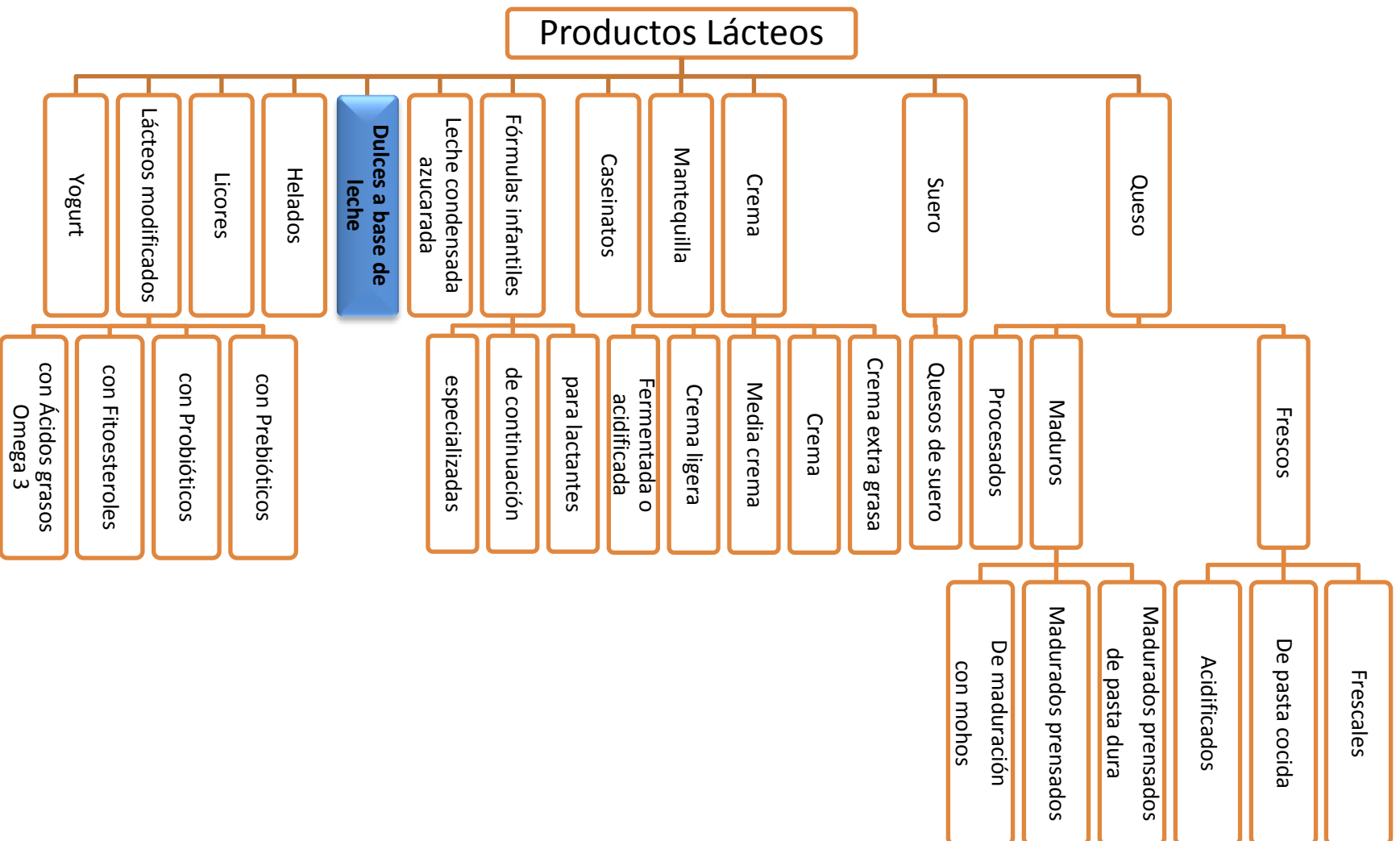


Diagrama 2. Productos lácteos.

1.9 Productos a Base de Leche

Antes de hablar de lo que es un dulce de leche, se debe de tener por entendido, que este es un producto derivado de la leche entera de origen animal. Y todos y cada uno de estos productos se diferencian por los aditivos que se agregan en cada una de las diferentes formulaciones y por sus procesos de elaboración.

1.10 Definición de Dulce de Leche

La definición de dulce de leche, de acuerdo a la NOM- 185-SSA1-2002, dice: “Productos elaborados por tratamiento térmico de la leche y edulcorantes, pudiendo ser adicionados de aditivos para alimentos e ingredientes opcionales⁹”.

1.11 Clasificación de Dulces de Leche

A continuación se muestra la clasificación de los dulces de leche en base a su diferencia de humedad, ya que dependiendo del contenido de humedad que tenga un dulce, sus características organolépticas y físicas serán diferentes.

- **Productos de baja humedad (menos del 12%) o endurecidos:** caramelos, chiclosos, jamoncillos, etc⁹.
- **Productos de humedad intermedia (12-20%) que se procesan mediante evaporación:** glorias, cajeta y obleas con cajeta, etc⁹.
- **Productos de alta humedad (más de 20%), procesados por coagulación, aireación y procesos enzimáticos:** flanes, gelatinas, chongos, mousse, arroz con leche, etc⁹.

1.12 Ingredientes y Aditivos en la Fabricación de Dulces de Leche

En la industria alimentaria se utilizan una gran variedad de ingredientes y aditivos, que tienen diferentes funcionalidades, desde muy básicas como proporcionar color, sabor u olor, hasta aditivos que otorgan propiedades específicas como viscosidad, consistencia, estabilidad, retención de humedad.

Particularmente en la fabricación de dulces de leche los aditivos se enfocan en mantener las propiedades específicas que los caracterizan, como son consistencia, cremosidad, pegajosidad, color, sabor, brillo, es decir propiedades que son visualmente atractivas al consumidor y que en algunos casos determinan el éxito comercial del producto⁴. En seguida se describen los diferentes ingredientes y aditivos que se utilizan para la elaboración del dulce de leche.

1.12.1 Azúcar o Sacarosa

La sacarosa es el azúcar que se consume todos los días y es el más importante desde el punto de vista económico. El azúcar se obtiene por la concentración de jugos de caña o de betabel. Es un disacárido formado por la unión de la glucosa con la fructosa^{2,3}.

La sacarosa es un compuesto estructural. Es altamente cristalizable, con lo cual se confiere opacidad a las masas y textura granulosa en pulpas de fruta o en dulces de leche².

Es un agente básico para la cristalización y proporciona la rigidez necesaria a los productos. El balance adecuado de azúcar ayuda a mantener la textura necesaria².

1.12.2 Glucosa

La glucosa es el azúcar (monosacárido) más importante de la naturaleza, es un monosacárido o azúcar simple. En unión con otro monosacárido aparece en los disacáridos y es la unidad básica de oligosacáridos y moléculas de polisacáridos como los almidones o celulosa. Desde el punto de vista de la nutrición, la glucosa es el único azúcar asimilable para la célula viva. A la glucosa se le conoce también como dextrosa por ser una sustancia ópticamente activa y desviar la luz polarizada hacia la derecha. *Dexter* en latín significa derecha^{2,3}.

La glucosa utilizada en la elaboración de dulces de leche, también se le conoce como jarabe de maíz hidrolizado, de acuerdo a la materia prima que se utiliza (maíz) y el proceso que se realiza para obtenerlo (hidrólisis ácida de almidón de maíz). Hasta conseguir un grado de conversión deseado medido como dextrosa equivalente (DE). Las glucosas comerciales generalmente se expresan por medio de su densidad como grados Baumé (°Bé). La glucosa más común es de 45°Bé². Las glucosas se clasifican según su grado de conversión en:

- **Glucosa de alta maltosa o bajo DE < 30:** ideal para trabajo en días lluviosos o en clima húmedo².
- **Glucosa estándar o de (DE) moderado (de 42 a 45 DE):** es la más común y usual².
- **Dextrosa mono hidrato de alto DE 80:** se usa en panadería como alimento de levadura².

Algunas ventajas funcionales sobre el alimento con el uso de glucosa son:

- Previene la cristalización desordenada en las masas de confitería. (Control de cristalización)².
- Suaviza a los productos haciéndolos más tersos y agradables al paladar².
- Tiene mayor capacidad de disolución que los disacáridos y en solución retardan la cristalización².
- En mezclas viscosas como jarabes o cajetas mantiene tersos los productos y les proporciona brillo².
- Es humectante y proporciona características de frescura y suavidad².
- Regula el poder edulcorante en mezclas con sacarosa².

1.12.3 Fructosa

La fructosa es el azúcar más dulce en la naturaleza, es extraído de frutas y aparece abundantemente en la miel. También se conoce como levulosa del latín *laevus* que significa izquierda^{2,3}.

Por su alto poder edulcorante se usa como sustituto de azúcar en dietas para no diabéticos para disminuir las calorías. Si una cucharadita de azúcar es suficiente para endulzar el café, con media cucharadita de fructosa se logra lo mismo. Ambas producen 4 calorías por gramo; sin embargo, se usa menos fructosa².

La fructosa mantiene niveles de dulzor de 130 con respecto a los 100 de la sacarosa y la alta fructosa alcanza hasta 170 de dulzor; por ello, se usa principalmente en la industria refresquera para abatir costos². La fructosa es conocida por tener las mismas **ventajas** que tiene la glucosa con respecto a la humectancia en productos de confitería, brillo, en que ambas dan una textura suave y tersa, controlan la cristalización; pero una **desventaja** es que a altas temperaturas baja su poder edulcorante, por lo cual se tiene que agregar algún otro edulcorante que compense el dulzor².

1.12.4 Stevia

El Stevia (Esteviosido) es un disacárido presente en las hojas del arbusto *Stevia rebaudiana* Bertoni. El compuesto puro puede ser aislado de las hojas secas y es aproximadamente 300 veces más dulce que la sacarosa, pero tiene un pequeño resabio amargo. Los esteviosidos inhiben el crecimiento de microorganismos orales y reduce las caries dentales^{10, 11}.

1.12.5 Bicarbonato de Sodio

Se entiende por bicarbonato de sodio grado técnico, el producto constituido principalmente por el compuesto químico NaHCO_3 ¹⁰.

El bicarbonato de sodio es una sal blanca, cristalina y alcalina con un alto rango de aplicaciones; ya que se utiliza para neutralizar diferentes sustancias y soluciones¹².

1.12.6 Nuez

La nuez se utiliza en pequeños trozos, y estos aportan textura al dulce y sabor.

Según la NMX-FF-084-SCFI-2009, se define al contenido comestible de nuez, como semilla del fruto del nogal que se encuentra dentro de una cáscara indehisciente o endocarpio leñoso, formada generalmente de dos lóbulos carnosos comestibles. Coloquialmente se le conoce como “almendra de nuez”, “corazón de nuez”, “carne de nuez” o “semilla de nuez”¹³.

Según la NMX-FF-084-SCFI-2009, la nuez pecanera es definida como: fruto de *Carya illinoensis* (Wangenh) K.Koch, producto de la dehiscencia longitudinal de una cápsula de varios carpelos o ruezno, que presenta endocarpio seco y endurecido, con tonalidades de color café variable y pintas negras. Coloquialmente se le designa como “Pecana” o “Pacana”¹³.

1.12.7 Café

El café se utiliza para dar sabor y color al dulce; este se utilizó por medio de una solución.

Según la NMX-F-586-SCFI-2008 define al **café instantáneo granulado** como: Café instantáneo obtenido por un proceso en el cual las partículas secas de café instantáneo son fundidas para formar partículas más grandes¹⁴.

1.12.8 Agua

Si la leche es importante en la fabricación de dulces, también lo es el agua, principal componente de muchos confites y dulces. Es el medio en el que los aditivos e ingredientes están dispersos. El agua empleada para su elaboración, debe ser inodora e insípida. El agua tiene un gran número de funciones biológicas basadas en su capacidad física para transportar sustancias, disolver otras y mantenerlas tanto en solución como en suspensión coloidal y también su reactividad química³.

1.12.9 Goma Xantana

La goma xantana no se considera un gelificante; debido a que se usa más para controlar la viscosidad de algunos productos porque forma geles débiles y delgados. Se obtiene microbiológicamente en un proceso de fermentación industrial. Se hidrata rápidamente en agua fría con agitación y se utiliza para dar viscosidad, como espesante, estabilizante, emulsificante y espumante. Su aplicación se recomienda en la producción de artículos cocinados, aderezos, salsas, productos elaborados a base de jitomate, bebidas, productos lácteos y fruta procesada^{2, 15}.

Tiene la propiedad de retener el agua en forma homogénea, por lo que se utiliza para controlar la sinéresis en algunos productos. Estabiliza suspensiones coloidales y no la afectan las fuerzas iónicas del medio en niveles de pH entre 0 y 13 donde aparecen la mayor parte de los alimentos. Tampoco la afectan los cambios de temperatura (termo resistente)².

1.13 Alimentos Funcionales

Los Alimentos Funcionales son alimentos que promueven la salud; ya que ejercen una acción beneficiosa sobre algunos procesos fisiológicos y/o reducen el riesgo de padecer una enfermedad¹⁶.

Estos alimentos, en los 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 a mantener la salud y bienestar, y/o a la disminución del riesgo de enfermar, o ambas cosas¹⁶.

Un alimento funcional está enriquecido en determinados nutrientes o presenta reducción de algunos componentes o sustitución por otros más favorables para la salud y siempre a partir de consumos normales¹⁶.

Los alimentos funcionales no son fármacos pero si tiene un perfil nutricional muy interesante, en especial, para determinados grupos de población o en situaciones concretas como el embarazo, la menopausia, adultos mayores, etc¹⁷.

En síntesis las características específicas de un alimento funcional son¹⁷:

- Ser un alimento convencional cotidiano
- Ser consumido por parte de un régimen normal
- Estar compuesto de ingredientes naturales y no sintéticos, a concentraciones no encontradas en la naturaleza o presentes en los alimentos que normalmente no los contienen.
- Tener efectos positivos sobre una o dos funciones claras, además del valor nutritivo, siendo estos efectos el poder aumentar el bienestar y la salud o reducir los riesgos de enfermedad o aportar un beneficio para la salud.

A su vez las condiciones generales que debe cumplir un alimento funcional son¹⁸:

- Debe producir efectos fisiológicos benéficos sobre el estado de salud físico o mental, y/o reducción del riesgo de enfermedad.
- Las citadas propiedades sobre la salud deben estar demostradas mediante una sólida y verdadera base científica.
- El componente alimentario responsable de sus efectos fisiológicos debe ser caracterizado por sus propiedades físicas y químicas, así como identificado y cuantificado por los métodos analíticos disponibles.
- El compuesto citado tendrá que haber sido evaluado en colectivos humanos en relación con su absorción, distribución, metabolismo, excreción y mecanismos de acción.
- Debe ser efectivo en todos los miembros de una población o grupo específico de la misma, que tendrá que estar claramente definido, por edad, constitución genética, etc.
- Debe mantener las características propias de un alimento, es decir, no puede presentarse en forma de píldoras, capsulas, comprimidos, polvos, etc., permitiendo integrarse en la dieta normal.
- Las cantidades de consumo necesarias para manifestar sus efectos benéficos tienen que ser las habituales en un patrón normal de alimentación.

Los alimentos funcionales ayudan a complementar un estilo de vida y de alimentación, para ofrecer una mejor calidad de vida en los próximos años. Existen ingredientes específicos muy novedosos para cada plataforma de salud. Algunos de ellos son el calcio, las fibras, el omega-3, los antioxidantes, el té verde, las proteínas de soya y de leche, los probióticos y prebióticos, entre otros¹⁹. Un alimento funcional no quiere decir que este sea un alimento natural, un alimento funcional debe haber sido procesado en el sentido de manipular el contenido en “componentes saludables”, por eliminación, reducción o adición de los mismos¹⁸.

El éxito de un ingrediente funcional está en que el consumidor pueda tener el beneficio que se le ofrece, cuando en alimento se consuma frecuentemente. La clave está en escoger ingredientes funcionales altamente eficaces, donde la dosis diaria recomendada pueda usarse en pocas porciones para que pueda dar el beneficio en la salud prometido. Por ejemplo, no es lo mismo lanzar un producto con fibra a lanzar un producto que promueva una mejor salud digestiva. Estos últimos son los alimentos funcionales. Cuando se ofrece un beneficio de salud, no es suficiente adicionar un nutriente en mayor cantidad que los productos de la competencia. La ventaja de un ingrediente funcional es que puede usarse en bajas dosis y lograr un gran beneficio¹⁹.

Recientemente algunas fibras alimentarias (inulina, mucílago, hemicelulosa, almidón, etc.) han sido ampliamente estudiadas por su funcionalidad prebiótica en el organismo del ser humano, y que además otorga beneficios (retención de humedad, estabilizante, dulzor, viscosidad) en el producto al cual va destinado su uso¹⁶.

1.14 Fibra Dietaria

La National Academy of Sciences (NAS) y Food and Nutrition Board de los Estados Unidos, en el año 2002, definieron los términos Fibra Dietaria, Fibra Funcional y Fibra Total. Se entendió como **Fibra Dietaria** “a aquellos glúcidos no digeribles y la lignina intactos presentes en las plantas”. Por otra parte, describieron **Fibra Funcional** como “aquellos hidratos de carbono no digeribles aislados para los cuales se han acumulado evidencias de efectos fisiológicos benéficos en la salud de los seres humanos”. Y por último, a **Fibra Total** como “la suma de la fibra dietaria y la fibra funcional”¹⁶. El Codex Alimentarius, en el año 2005 definió **fibra dietética** como “los polímeros de carbohidratos con un grado de polimerización mayor o igual a 3, que no son digeridos y/o absorbidos en el intestino delgado”¹⁶.

La OMS recomienda una ingestión diaria de 27 a 40 gramos de fibra dietética diarios, mientras la FDA propone a individuos adultos un consumo de 25 gramos de fibra por día, basado en una dieta de 2000 kcal/día. La recomendación nutricional de Fructanos, Inulina y Oligofructosa posee diferencias actualmente. En Estados Unidos el consumo diario recomendado es de 1 a 4 g/día, mientras que en Europa se sugiere un consumo de 3 a 11 g/día¹⁶.

Las fibras alimentarias se clasifican en:

- 1 Las **fibras alimentarias insolubles** (FAI): son aquellas parcialmente fermentables en el intestino por las bacterias colónicas no forman dispersión en agua¹⁶.
- 2 Las **fibras alimentarias solubles** (FAS): o totalmente fermentables, son aquellas que forman geles en contacto con el agua. Comprenden a las gomas, mucílagos, pectinas, almidón resistente 2 y 3, algunas hemicelulosas, galactooligosacáridos (GOS), **inulina** y fructooligosacáridos (FOS)¹⁶.

Las fibras alimentarias solubles se encuentran fundamentalmente en frutas, legumbres y cereales como cebada y avena. Su solubilidad en agua condiciona la formación de geles viscosos en el intestino, favoreciendo la absorción de agua y sodio. Desde el punto de vista fisiológico intestinal, estas fibras retrasan el vaciamiento gástrico o también llamado tránsito intestinal, por lo que se les atribuye efecto astringente, hipolipemiente y disminución de la respuesta glucémica. A su vez, se caracterizan por ser rápidamente degradadas por la micro flora del colon. Las fibras más solubles y más pequeñas tienen un mayor y más rápido grado de fermentación. Los efectos fisiológicos atribuidos más importantes de estos subproductos consisten en disminuir el pH intraluminal, estimular la reabsorción de agua y sodio, fundamentalmente a nivel de colon ascendente y potenciar la absorción de cationes bivalentes¹⁶.

El consumo de fibra dietaria se ha asociado con propiedades de alimentos funcionales debido a que proveen condiciones que favorecen la salud intestinal, la prevención de cáncer de colon rectal y

enfermedades cardiovasculares y el mantenimiento del peso. Los nutriólogos y diferentes organizaciones sanitarias, incluyendo la Organización Mundial de la Salud (OMS) respecto al consumo de fibra, recomiendan una ingesta mínima de 30 g de fibra al día, de la cual, al menos un 30 % debe ser fibra soluble²⁰.

1.14.1 Inulina

La inulina es un fructano poli disperso que consiste en una mezcla de oligómeros y polímeros mayores formados por uniones β -(2-1) fructosil-fructosa. La inulina puede ser sintetizada a partir de la raíz de la achicoria y desde la sacarosa a través de la acción de la β -fructo-furanosidasa (origen: *Aspergillus Níger*)¹⁶. La inulina y sus derivados (oligofructosa, fructooligosacáridos) son generalmente llamados fructanos, que están constituidos básicamente por cadenas lineales de fructosa. La inulina posee un sabor neutral suave, es moderadamente soluble en agua y otorga cuerpo y palatividad. Tiene diversas aplicaciones en la industria de alimentos, puede ser utilizada como sustituta del azúcar, reemplazante de las grasas, agente texturizante y/o estabilizador de espuma y emulsiones. Por este motivo son incorporados a los productos lácteos, fermentados, jaleas, postres aireados, mousses, helados y productos de panadería¹⁶.

La propiedad de la inulina más extensivamente estudiada es su comportamiento como prebiótico, definido por su capacidad selectiva de estimular el crecimiento de un grupo de bacterias en el colon (bifidobacterias y lactobacilos), con la consecuente disminución de otras especies que pueden ser perjudiciales (ejemplo: *E. coli* y bacterias de la especie *Clostridium spp.*). Entre otras propiedades beneficiosas a la salud de la inulina, se mencionan: el refuerzo de las funciones inmunológicas (ante cáncer o tumores), el aumento de la biodisponibilidad de minerales, la mejora del metabolismo de las grasas y de la respuesta glicémica²¹. Los beneficios en la salud de la inulina como prebiótico son: aporte de fibra dietética, bajo valor calórico, hipoglucemiante, mejorador de la biodisponibilidad de calcio y magnesio. Se presentan evidencias promisorias de su actuación en la regulación de parámetros lipídicos, reducción del riesgo de cáncer, refuerzo de la respuesta inmune y protección contra desórdenes intestinales²¹.

En una amplia variedad de productos alimenticios se usa la inulina y sus derivados como: espesante, emulsificante, gelificante, sustituto de azúcares y de grasas, humectante, depresor del punto de congelación. También se emplean en la industria química-farmacéutica y de procesamiento como excipiente, aditivo, agente tecnológico o coadyuvante; en la industria de la alimentación animal, y se está considerando su uso como constituyente de los empaques por su carácter de material bioactivo. Se ha propuesto catalogar a los fructanos como “fibra funcional”, en base a una nueva clasificación de la fibra dietética que considera el efecto fisiológico en el individuo. A través de esta revisión se evidenció el vasto alcance de estos compuestos en la industria alimentaria y las razones por las que resultan ser ingredientes claves en el pujante mercado de los alimentos funcionales²¹.

Los fructanos por su configuración química no pueden ser hidrolizados por las enzimas digestivas del hombre y de animales, por lo que permanecen intactos en su recorrido por la parte superior del tracto gastrointestinal, pero son hidrolizados y fermentados en su totalidad por las bacterias de la parte inferior del tracto gastrointestinal (intestino grueso, colón). De esta manera, este tipo de compuestos se comportan como fibra dietética. Los fructanos aportan un valor calórico reducido (1,5

kcal/g) si se comparan con los carbohidratos digeribles (4 kcal/g). En la Tabla 3 se presenta un resumen de las características de la inulina, la oligofruktosa y una inulina purificada o llamada de “alto desempeño” o HP (*high performance*)²¹.

a) Usos de la Inulina Como Ingrediente

La inulina y sus derivados ofrecen múltiples usos como ingredientes en la formulación de productos (Tabla 4). La inulina tiene propiedades similares a las del almidón, mientras que la oligofruktosa presenta propiedades más parecidas a la sacarosa. La inulina mejora la aceptabilidad de yogures elaborados con leche descremada, impartándole una mayor cremosidad, también actúa como agente espesante, retiene el agua y estabiliza geles. Los geles se pueden formar por efecto mecánico o térmico, y el obtenido por el segundo método presenta mejor textura y firmeza. La capacidad de formar gel es determinante en su uso como sustituto de grasas en productos lácteos, untables, aderezos, salsas y otros productos en los que las propiedades funcionales que otorgan las grasas son indispensables para lograr los efectos sensoriales deseados por los consumidores²¹.

Tabla 4. Usos de Inulina en Productos Alimenticios.

Aplicación	Funcionalidad
Productos lácteos	Cuerpo y palatabilidad, capacidad de formar gel, emulsificantes, sustituto de azúcares y grasas, sinergismo con edulcorantes.
Postres congelados	Textura, depresión en el punto de congelación, sustituto de azúcares y grasas, sinergismo con edulcorantes.
Productos untables	Estabilidad de emulsión, textura y capacidad de ser untado, sustituto de grasas.
Productos horneados	Disminución de a_w , sustituto de azúcares.
Cereales de desayuno	Crujencia, capacidad de expansión.
Preparación con frutas (no ácidas)	Cuerpo y palatabilidad, capacidad de formar (no ácidas) gel, estabilidad de emulsión, sustituto de azúcares y grasas, sinergismo con edulcorantes.
Aderezos de ensaladas	Cuerpo y palatabilidad, sustituto de grasas.
Productos cárnicos	Textura, estabilidad de emulsión, sustituto de grasas.
Chocolate	Sustituto de azúcares, humectante.

FUENTE: Franck, A. *Technological functionality of inulin and oligofruktose*. *British J Nutr* 2002; 87: 287-291.

En la elaboración de panes de trigo con adición de inulina para sustituir la grasa vegetal no se modificaron las características reológicas de la masa antes de hornear y la calidad sensorial del producto terminado. El uso de inulina en la formulación de pastas dio como resultado productos con propiedades sensoriales sin diferencias significativas de aquellas elaboradas con solo trigo. Se han

logrado formulaciones a base de chocolate (tortas, muses), barras energéticas y cereales extruidos con un desempeño similar o incluso mejorado en sabor, color y textura²¹.

b) La Inulina y sus Beneficios a la Salud

El uso de la inulina o sus derivados para cumplir funciones tecnológicas, simultáneamente aporta beneficios a la salud, el primero de ellos es su función de fibra dietética, con los efectos fisiológicos atribuibles a este tipo de compuestos, como son la disminución de los niveles lipídicos y glucosa en sangre y la acción laxante. Otro beneficio comprobado ligado al anterior, es la capacidad de la inulina de modular la flora intestinal, esto se debe a su efecto prebiótico. Estudios *in vivo* muestran que solo 4 g de inulina o de sus compuestos relacionados diarios son efectivas para incrementar el número de bacterias beneficiosas en el colon. La inulina y derivados tienen un aporte calórico reducido (máximo de 1,5 kcal/g), atribuibles a la resistencia a la digestión y posterior hidrólisis y fermentación por la flora intestinal selectiva del intestino grueso. Solo los ácidos grasos de cadena corta obtenidos como producto metabólico de la actividad bacteriana en el intestino grueso contribuyen a proveer energía al individuo. El valor calórico de 1,5 kcal/g es usado para propósitos legales de información en el etiquetado. Por su efecto hipoglucemiante, la inulina se recomienda en la dieta de individuos con diabetes. Investigaciones con ratas y humanos indican un incremento de la absorción de calcio y otros minerales cuando se usa inulina y sus derivados en la dieta, con consecuencias positivas en el contenido y densidad de los huesos. En adolescentes, la dosis necesaria para observar esos resultados fue 8 g/día de inulina durante 8 semanas²¹.

También está demostrado el efecto positivo de la inulina y sus derivados en la absorción de magnesio. Con respecto al cáncer, se demostró que la administración de prebióticos (inulina y oligofruktosa) disminuye el crecimiento de cáncer de colon en ratas. El mecanismo aún no está claro, pero los resultados parecen señalar como responsable a la acción combinada de dos factores: el aumento de los ácidos grasos de cadena corta (producto de la fermentación de los prebióticos) y la disminución de la proliferación de las enzimas envueltas en la patogénesis del cáncer. Se observó la inhibición del cáncer mamario en ratas cuya dieta fue suplementada con inulina. Estos efectos positivos en la salud han originado que se recomiende la inulina como factor adyuvante en las terapias de cáncer²¹.

La inulina junto con otro carbohidrato no digerible, el galactooligosacárido, logra cumplir una función muy importante en el mejoramiento de las formulaciones alimenticias infantiles. La leche materna contiene una mezcla compleja de carbohidratos no digeribles que cumplen con la función de prebiótico, lo cual justifica la adición de oligosacáridos a fórmulas lácteas que se administran a los niños. Existen otras funciones promisorias de la inulina que aún están en estudio, entre ellas el aumento a la resistencia a infecciones intestinales, atenuación de enfermedades inflamatorias del intestino, estimulación del sistema inmune, con la consecuente resistencia a las infecciones. Sin embargo, es importante considerar que estudios en seres humanos han demostrado que dosis mayores a 30g/día de inulina y oligofruktosa ocasionan efectos gastrointestinales adversos. Es importante destacar que tanto la inulina como sus derivados fueron aceptados como ingredientes GRAS (generalmente reconocido como seguro) por la FDA desde 1992, lo cual indica que pueden usarse sin restricciones en formulaciones alimenticias incluso en las destinadas para infantes. Los importantes beneficios de la inulina y derivados han sido ampliamente explotados en el mercado e incluso utilizados para alegaciones contundentes en las campañas de mercadeo²¹.

Un reporte de las FAO señala la necesidad de una regulación internacional que estandarice las condiciones bajo las cuales se pueden usar las alegaciones en nutrición y salud, ya que existen algunas que aún no han sido sólidamente comprobadas a nivel científico²³.

c) Otras Aplicaciones de la Inulina y Derivados

La inulina y sus derivados también se están usando en la alimentación animal, para disminuir malos olores en las heces fecales de animales domésticos como perros y gatos). También se ha ensayado utilizar los oligosacáridos inulina y oligofruktosa en la sustitución del uso de antibióticos profilácticos en pollos, conejos y cochinos. La inulina y derivados se están usando en la industria farmacéutica como material excipiente en tabletas, coadyuvante en vacunas y también como ingrediente estructurante en detergentes. Adicionalmente, en la industria química y de procesamiento se usa la inulina y la carboximetil inulina (CMI), como agente quelante y anti-incrustante de tuberías, contenedores, cámaras de reacción y separación y demás equipos. La inulina y derivados han sido calificados como materiales bioactivos que pueden ser incorporadas en los empaques de los alimentos para dar origen a “empaques bioactivos”. Los materiales bioactivos son aquellos que modifican positivamente la funcionalidad de procesos fisiológicos del organismo, tales como los prebióticos, los fotoquímicos y las vitaminas²¹.

La dosis máxima permitida para adicionar un alimento formulado con inulina es para dosis simple hasta 10 g/día y en dosis múltiples hasta 20g/día. En dosis mayores a las permitidas puede provocar intolerancias luego de su consumo, como efectos osmóticos (diarrea), ruidos intestinales y flatulencia como consecuencia del proceso de fermentación¹⁶.

1.15 Caramelización y Reacción de Maillard

1.15.1 Caramelización

Los azúcares presentes en un alimento también pueden sufrir modificaciones que conducen a coloraciones pardas aunque estén ausentes los aminoácidos, como consecuencia de los tratamientos térmicos a temperaturas muy próximas a sus puntos de fusión. El fenómeno, conocido con el nombre de *Caramelización*, puede ser frecuente en algunos alimentos procesados donde, además de los correspondientes pardeamientos, se desarrollan sabores y sabores característicos²⁴.

La Caramelización, también llamada pirolisis es una reacción química en la que los azúcares se calientan por encima de su punto de fusión; se efectúa tanto a pH ácido como alcalino y se acelera con la adición de ácidos carboxílicos y de algunas sales; se presenta en los alimentos que son tratados térmicamente de manera drástica, como la leche condensada y azucarada, derivados de la panificación, frituras, dulces a base de leche. Los mecanismos de reacción son muy complejos y no conocidos completamente, aunque caben destacar las transformaciones por isomerización y deshidratación de los carbohidratos. Se generan furfural y derivados que se polimerizan formando pigmentos denominados melanoidinas y otros compuestos de bajo peso molecular y con gran poder odorante, así como sustancias con dobles enlaces, que absorben la luz visible y dan coloración²⁵.

De forma resumida, durante la Caramelización se produce un equilibrado de formas anómericas y anillos, la inversión de la sacarosa a fructosa y glucosa, la condensación y el enlazamiento intramolecular, la isomerización de aldosas a cetosas, así como reacciones de deshidratación, fragmentación y formación de polímeros insaturados²⁶.

1.15.2 Reacción de Maillard

Durante el procesamiento, almacenamiento y preparación de los alimentos, se forman coloraciones pardas u oscuras, las cuales se deben a reacciones de naturaleza enzimática o no enzimática. Entre las últimas se encuentran las reacciones de Caramelización de los azúcares y la reacción de Maillard o reacción de pardeamiento no enzimático⁵.

Con este nombre se designa un grupo muy complejo de transformaciones que traen consigo la producción de melanoidinas coloreadas que van desde amarillo claro hasta café oscuro, o incluso negro; para que se lleven a cabo se requiere de un azúcar reductor (cetosa o aldosa) y un grupo amino libre proveniente de un aminoácido o una proteína³.

Se trata de un fenómeno bastante común, vinculado a ciertos procesos tecnológicos de elaboración de alimentos, así como al periodo de su almacenamiento. En la práctica resulta de primordial interés, porque además de afectar a las cualidades organolépticas, también puede perjudicar el valor nutritivo de los productos alimenticios, hasta el punto que puede ser considerado la mayoría de las veces como un factor limitante de la vida útil comercial de los alimentos procesados²⁴.

Por el contrario, existen ejemplos en los que estas reacciones químicas se buscan como algo deseado y favorable: la formación de la corteza del pan, la elaboración de papas fritas, tostado de granos de café, flavor de carnes asadas, fabricación de cereales, **dulces a base de leche**, etc²⁴.

Aunque esta reacción se puede efectuar en diferentes condiciones esta principalmente influenciada por los siguientes parámetros:

- **pH.** A un pH alcalino se incrementa la velocidad y se alcanza un máximo a pH⁶; sin embargo, hay que recordar que existen muy pocos alimentos en forma natural con pH > 7 (como el huevo). Por el contrario el mecanismo se inhibe en condiciones muy ácidas que por lo general no se encuentran en los alimentos³.
- **Temperatura.** Las temperaturas elevadas aceleran la reacción, pero debido a que su energía de activación es baja, también se observa en temperaturas de refrigeración³.
- **Actividad acuosa.** Los alimentos de humedad intermedia son los más propensos; los valores de actividad acuosa (A_w) en los que se favorece la reacción son de 0.6 a 0.9. Una actividad acuosa menor no permite la movilidad de los reactantes y se inhibe el mecanismo y una mayor a 0.9 produce el mismo efecto ya que el agua, por ser el producto de la propia reacción, ejerce una acción inhibitoria, de acuerdo con la ley de acción de masas, ya que diluye los reactantes³.
- **Tipo de aminoácido.** El tipo de aminoácido es decisivo, puesto que estos son más reactivos en medida en que se incrementa el tamaño de la cadena y tengan más de un grupo amino.

Por esta razón la lisina, con su amino en posición ϵ es el más activo; también pueden intervenir otros, como la arginina, la histidina y el triptófano³.

- **Tipo de azúcar reductor.** Los azúcares reductores que más favorecen la reacción de Maillard son en primer término las pentosas y, en segundo término, las hexosas; asimismo las aldosas actúan más fácilmente que las cetosas, y los monosacáridos son más efectivos que los disacáridos, con base en esto la xilosa es el azúcar más activo, seguido de la galactosa, la glucosa, la fructosa, lactosa y maltosa, la sacarosa no interviene por no tener poder reductor, a menos que se hidrolice previamente³.
- **Metales.** Los metales como el cobre y el hierro tienen un efecto catalizador sobre la formación de melanoidinas, lo que indica el carácter de óxido-reducción de la última etapa de este mecanismo³.

1.15.3 Etapas de la Reacción de Maillard

Consiste en 4 etapas principales que son: condensación del azúcar con el grupo amino, transposición de los productos de condensación, reacción de los productos de la transposición y polimerización y formación de melanoidinas y sustancias coloreadas²⁴.

a) Condensación del Azúcar Reductor con el Grupo Amino

Consiste en que el carbonilo libre de un azúcar reductor se condensa con el grupo amino libre de un aminoácido o una proteína. El azúcar debe tener una estructura abierta para que su carbonilo sea atacado nucleofílicamente por el par de electrones del nitrógeno del grupo amino, y formar así la base de Schiff correspondiente³.

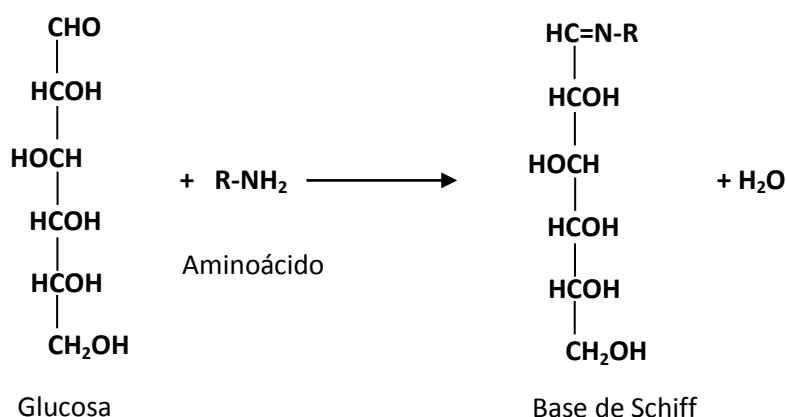


Figura 1. Base de Schiff.

Fuente: Badui Dergal Salvador. (2006). *Química de los alimentos*. 4ª. Ed. Pearson. Naucalpan de Juárez, México, pág. 64.

A su vez, la base de Schiff se cicla y genera una glucosilamina que puede ser, según intervenga una aldosa o una cetosa, alsosamina o cetosamina, respectivamente. Por ejemplo, si esta proviene de la glucosa y la glicina, el compuesto resultante se llamaría glucosil – glicina³:

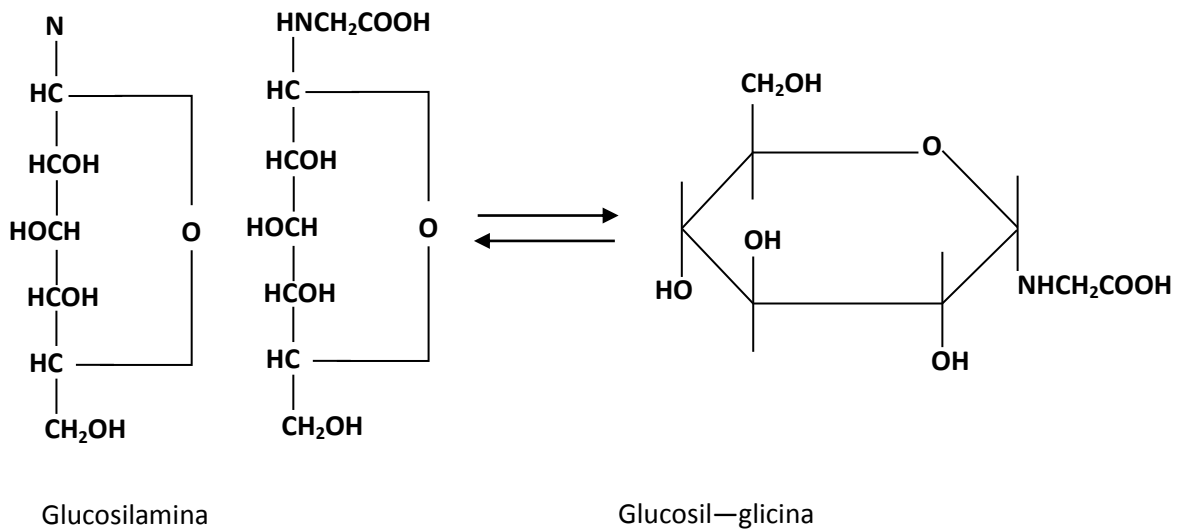


Figura 2. Obtención de la Glucosil-glicina.

Fuente: Badui Dergal Salvador. (2006). *Química de los alimentos*. 4ª. Ed. Pearson. Naucalpan de Juárez, México, pág. 64.

La fructosa también aunque con mayor dificultad, también puede condensarse y formar la fructosilamina correspondiente³:

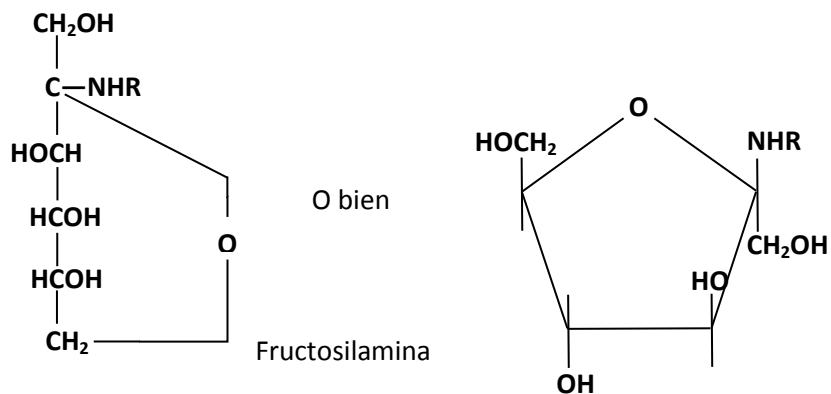


Figura 3. Fructosilamina.

Fuente: Badui Dergal Salvador. (2006). *Química de los alimentos*. 4ª. Ed. Pearson. Naucalpan de Juárez, México, pág. 65.

Hasta este momento no hay producción de sustancias coloreadas ni de compuestos insaturados que absorban radiaciones³.

La condensación puede producirse con cualquiera de los azúcares reductores presentes en un alimento: aldosas, cetosas, disacáridos, ácidos urónicos, etc. las pentosas suelen ser más reactivas que las hexosas, las aldosas más que las cetosas²⁴.

El proceso químico de la condensación depende del pH de un modo bastante complejo: la velocidad de la reacción se inhibe por los pH ácidos, mientras que la reacción se acelera por la catálisis ácida de los protones.

La condensación está favorecida, de acuerdo con la ley de acción de masas, en aquellos productos alimenticios que se comercializan parcialmente deshidratados²⁴.

b) Transposición de los Productos de Condensación

Tanto las aldosaminas como las cetosaminas hasta ahora producidas, son inestables y están sujetas a diversos cambios químicos; las primeras se isomerizan a cetosas por el mecanismo de Amadori. Mientras que las segundas se transforman en aldosas por la transposición de Heyns. Por ejemplo, la glucosilamina cambia a fructosamina o 1-amino-1-desoxi fructosa, mientras que las cetosilaminas a 2-amino-2-desoxialdosa. Las dos isomerizaciones son reversibles y hasta aquí no se sintetizan aun sustancias coloreadas³.

Se han detectado compuestos de Amadori con restos de aminoácido diferentes en muchos alimentos calentados y almacenados, como por ejemplo en frutas y hortalizas desecadas, **en productos lácteos**, granos de cacao o salsa de soja. Los compuestos de Amadori solo son productos intermedios formados durante la reacción de Maillard. A pesar de lo limitado de su estabilidad, se utilizan bajo ciertas condiciones como indicadores analíticos del grado de tratamiento térmico de los alimentos²⁷.

Las concentraciones de los compuestos de Amadori y de Heyns varían dependiendo de las condiciones de la reacción (pH, temperatura, tiempo, tipo y concentración de los productos). Como resultado, existe un cambio en el espectro de compuestos y por consiguiente en el color, sabor, olor y otras propiedades de los alimentos en cada caso²⁷.

c) Reacción de los Productos de Isomerización

De acuerdo con el pH, la actividad acuosa y la temperatura, los compuestos formados pueden sufrir modificaciones muy profundas. En esta fase aparecen algunos olores, se incrementa el poder reductor, se observan ligeras tonalidades amarillas y aumenta la absorción de las radiaciones ultravioleta.

Las principales reacciones que suceden son la deshidratación de los azúcares por isomerización enólica, también se producen compuestos como el maltol, etilmaltol y el acetil-furano³. Se presentan igualmente mecanismos de fragmentación de los azúcares enólicos.

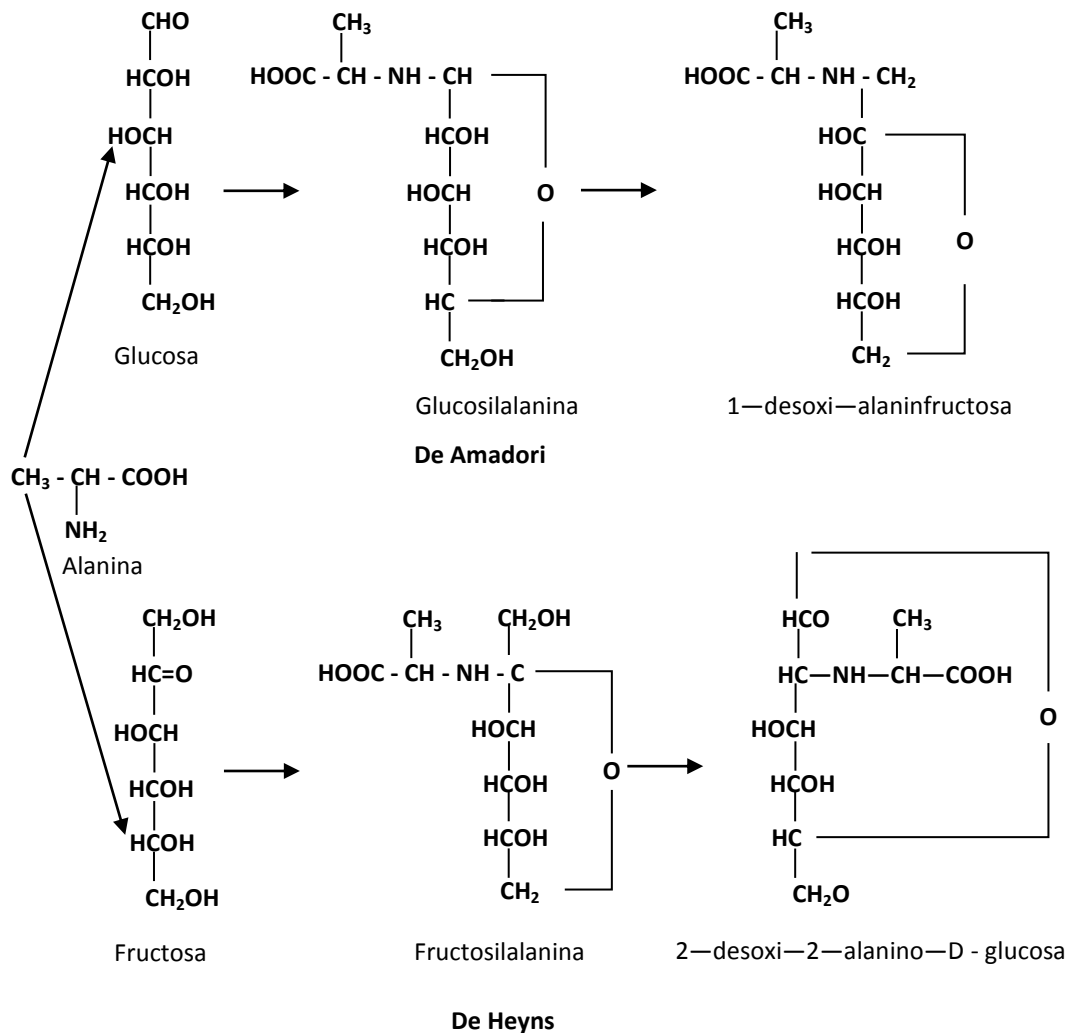


Figura 4. Transposiciones de Amadori y Heyns.

Fuente: Badui Dergal Salvador. (2006). Química de los alimentos. 4ª. Ed. Pearson. Naucalpan de Juárez, México, pág. 66.

La mayoría de las sustancias formadas son insaturadas y muy reactivas, por lo que a su vez siguen diversas rutas químicas que dependen de las condiciones de acidez, temperatura, etc., para que prevalezcan³.

d) Polimerización y formación de sustancias coloreadas

La fase final de esta reacción es la polimerización de un gran número de compuestos insaturados que trae consigo la síntesis de las sustancias coloreadas llamadas melanoidinas; a pesar de que su concentración es baja, ejercen un efecto muy marcado en la apariencia del alimento. El color se debe a una amplia absorción del espectro visible por parte de diversos cromóforos.

Para la síntesis del polímero influyen decididamente algunas moléculas como el furfural, el hidroximetil-furfural, las osulas, las desoxiosulas, los aldehídos, las pirazinas, los imidazoles, cetonas y

reductonas; como muchos de ellos contienen grupos carbonilos, se favorece la condensación aldólica³.

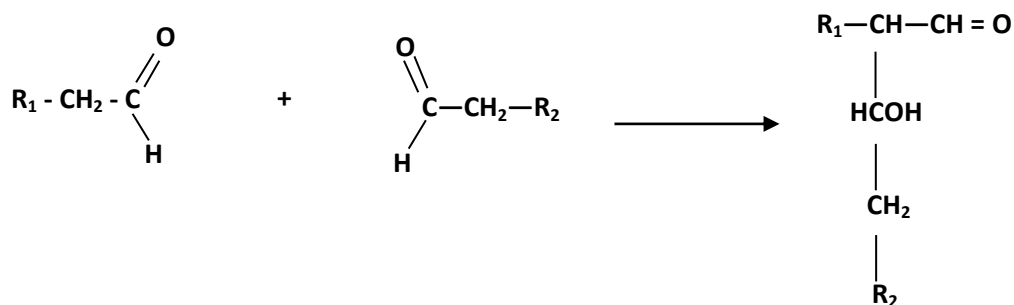


Figura 5. Polimerización y formación de sustancias coloreadas.

Fuente: Badui Dergal Salvador. (2006). *Química de los alimentos*. 4ª. Ed. Pearson. Naucalpan de Juárez, México, pág. 69.

A su vez, estos dímeros pueden seguir polimerizándose con otros aldehídos libres o con grupos amino. Como se puede deducir, el número de compuestos que se genera en la reacción de Maillard en su conjunto es muy grande; muchos de ellos contienen grupos aldehído y grupos cetona por lo que muestran una capacidad reductora muy alta³.

La reacción de Maillard resulta pues esencial para la química de los alimentos, puesto que en ella, los carbohidratos y las proteínas, componentes importantes de los alimentos, reaccionan entre ellos²⁸.

Se le debe de agradecer la formación del color a la reacción de Maillard que sucede entre azúcares reductores y aminoácidos. Al mismo tiempo se liberan aromas característicos, por lo que la reacción de Maillard desempeña un papel central en la aparición del color y del aroma en los alimentos sometidos al calor²⁸.

1.16 Microbiología

El campo de la microbiología de los alimentos se encuentra entre los más diversos de las áreas de estudio dentro de la disciplina de la microbiología. Su estudio abarca una gran variedad de microorganismos que incluyen los responsables de las alteraciones, probióticos, fermentativos y bacterias patógenas, mohos, levaduras, virus y parásitos; los alimentos son muy diferentes entre sí, por lo que tienen una composición dispar, es decir variable; por lo que existe un amplio espectro de factores ambientales, nutricionales y metabólicos, que influyen en la supervivencia y el desarrollo microbiano²⁹.

Los alimentos no son productos absolutamente estériles, sus poblaciones microbianas varían, desde un escaso número en la mayoría de las conservas, a cifras importantes en alimentos fermentados. En ocasiones pueden vincular agentes microbianos patógenos o sus toxinas, con riesgo para la salud del consumidor³⁰.

Entre las cualidades deseables que debe poseer un alimento cabe destacar que este exento de microorganismos patógenos. Aunque sea imposible lograr tolerancia cero para todos los alimentos elaborados bajo Buenas Prácticas de Manufactura (BPM), la producción de alimentos con el número más bajo posible de estos microorganismos es una meta deseable. En la actualidad hay menos fabricantes pero producen más productos, lo que conduce a que los alimentos se almacenen un tiempo más largo y después se transporten antes de que lleguen a los consumidores. Se necesitan nuevas estrategias para garantizar la seguridad de los alimentos.

Las estrategias clásicas para controlar la calidad microbiológica confiaban esencialmente en las determinaciones microbiológicas tanto de materias primas como de productos finales pero, para muchos productos, el tiempo que se requería para obtener los resultados era demasiado largo. El desarrollo y uso de ciertos métodos rápidos ha sido de gran valor²⁹.

Los microorganismos localizados en el medio ambiente (entorno) donde se procesan alimentos contribuyen a la microbiota de los mismos. Un entorno extremadamente contaminado conduce a la obtención de un producto de baja calidad.

Cabe esperar un riesgo de contaminación secundaria del alimento con patógenos si estos se aíslan habitualmente en el entorno de la fábrica. Por ello, se deben tomar muestras con frecuencia para realizar análisis microbiológicos del ambiente en vez del alimento. Esto permite al investigador evaluar una fuente de contaminación secundaria en el procesado de alimentos²⁹.

1.16.1 Análisis Microbiológico de Alimentos

En este punto se abordan las características generales, a considerar antes de plantear un análisis microbiológico a los alimentos, pues es necesario conocer todos los factores que afectan al crecimiento microbiano, pues si no se tienen en consideración, esto puede conllevar a que los distintos análisis microbiológicos no se realicen de la forma correcta o que se obtengan resultados no confiables, de igual forma es necesario conocer las limitaciones de las diversas técnicas de análisis microbiano.

Por otra parte el conocer las distintas enfermedades que se pueden originar al consumir alimentos contaminados microbiológicamente, permite darnos una idea de las consecuencias en la salud humana que puede ocasionar el no realizar un análisis microbiológico, o no realizarlo de la forma correcta a los alimentos, pues dichas consecuencias pueden ser leves como un simple malestar estomacal, un salpullido, o inclusive la muerte provocadas por una enfermedad de transmisión alimentaria (ETA).

1.16.1.1 Factores Intrínsecos y Extrínsecos que influyen sobre el Crecimiento Microbiano

Los alimentos son ecosistemas compuestos del ambiente y los organismos que viven en este. El ambiente de los alimentos se compone de factores intrínsecos inherentes en el alimento (pH,

actividad de agua, el potencial redox y nutrientes) y factores extrínsecos (temperatura, composición gaseosa y la presencia de otras bacterias)³⁰.

Los alimentos pueden ser heterogéneos a escala micrométrica. La heterogeneidad y los gradientes de pH, oxígeno, nutrientes, etc., son factores clave en la conservación de los alimentos. Además, los alimentos pueden contener múltiples microambientes. Esto se puede ejemplificar en los brotes de intoxicaciones alimentarias causados por el anaerobio estricto *Clostridium botulinum* en alimentos aeróbicos. Se ha detectado *C. Botulinum* en papas, cebollas y ensalada de col³⁰.

1.16.1.2 Limitaciones del Recuento en Placa

Todos los métodos basados en la microbiología del recuento en placa y los cultivos puros tienen las mismas limitaciones. El recuento en placa se basa en la hipótesis de que todas las células formaran una colonia y que cada colonia se origina a partir de una única célula.

Aceptando por el momento el supuesto de que una célula mono cultivada individual es un objeto de estudio apropiado, la capacidad de una célula dada para formar una colonia depende de una amplia variedad de factores entre los que se incluyen el estado fisiológico de la célula, el medio de cultivo utilizado para el recuento, temperatura de incubación, etc²⁹.

Una unidad formadora de colonia (UFC) idealmente sería una única célula, pero en realidad podría tratarse de una cadena de 10, o un agregado de 100³⁰.

1.16.1.3 Enfermedades Microbianas de Origen Alimentario

Una enfermedad transmisible por los alimentos, también denominada de origen alimentario, es cualquier proceso patológico causado por el consumo de un alimento. Los peligros para la salud asociados al consumo de productos alimenticios pueden tener causas físicas (por ejemplo pedazos de vidrio), químicos (iones de metales pesados) o microbiológicas (patógenos).

Las enfermedades transmitidas por los alimentos y causadas por microorganismos se clasifican en términos generales en infecciones e intoxicaciones de acuerdo con el modo de acción del agente causal. Si se precisa la ingestión de células vivas para que se desarrolle la enfermedad, estaremos ante una infección. La intoxicación se produce tras el consumo de toxinas generadas por los microorganismos en los alimentos.

No es imprescindible la ingestión de microorganismos viables para que se produzca una intoxicación microbiana; la enfermedad surge por la ingestión de un producto que contiene una toxina de origen microbiano. Los requisitos para que se produzca un proceso microbiano de transmisión alimentaria son³¹:

- Presencia del microorganismo patógeno en el alimento.
- Crecimiento o supervivencia del microorganismo patógeno en el alimento.
- Ingestión del alimento por individuos susceptibles.

La forma de transmisión de una de las ETA's, puede clasificarse de acuerdo a la manera en que afecta al ser vivo. Estas pueden ser una intoxicación o una infección; la intoxicación se produce al ingerir un alimento que está contaminado con toxinas de algún género bacteriano, por ejemplo las producidas por *Clostridium botulinum* y *S. aureus*. A su vez las infecciones pueden ser invasivas o no invasivas, la primera se refiere a que la bacteria y/o el virus afecta en primera instancia una determinada zona del cuerpo o del organismo y posteriormente se propaga e invade otras zonas del organismo, y la segunda se refiere a que únicamente va a afectar una determinada zona del organismo, sin afectar cualquier otra.

En el Diagrama 3, se ejemplifica el modo de transmisión de ciertas enfermedades alimentarias, la bacteria que la produce y la enfermedad que provoca.

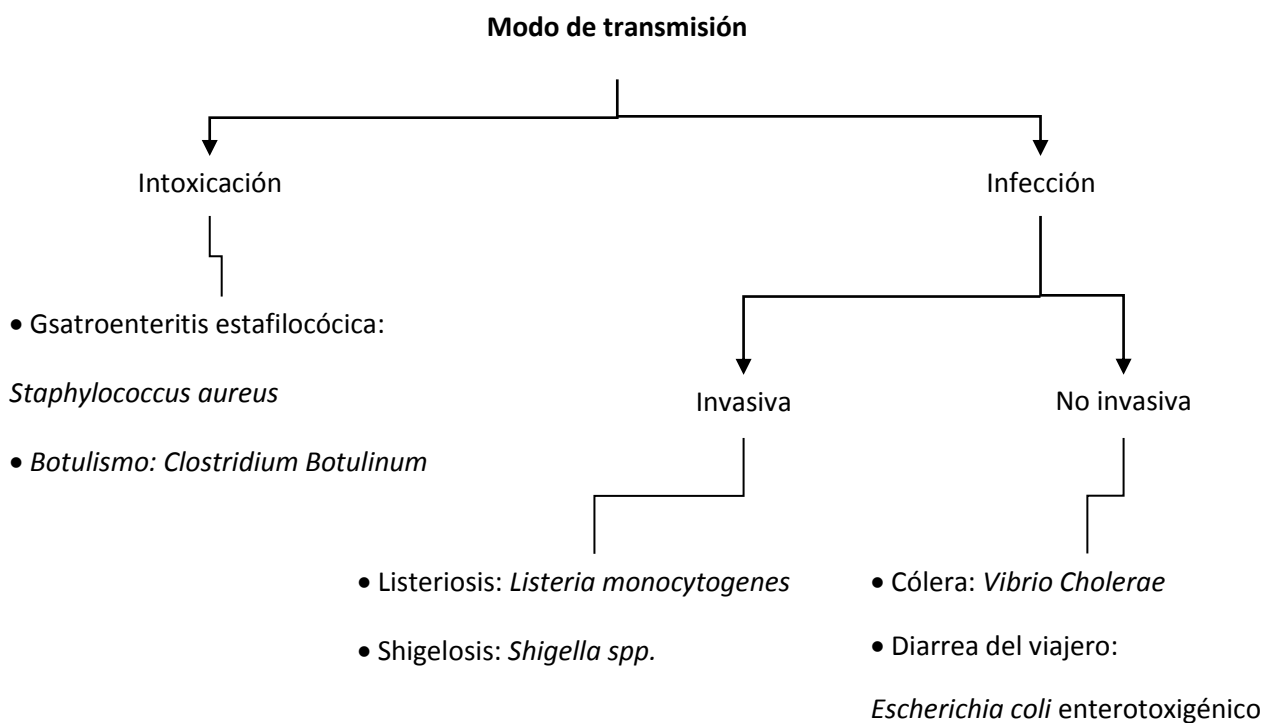


Diagrama 3. Modo de transmisión de enfermedades alimentarias.

FUENTE: Yousef, A. E., & Carlstrom, C. (2003). *Microbiología de los alimentos: Manual de laboratorio*. Zaragoza: Acribia. Pag. 120.

Para facilitar el estudio de microorganismos y parásitos peligrosos para el ser humano, éstos se clasifican en 3 grupos, categoría I (peligro grave), categoría II (peligro moderado, con diseminación potencialmente extensa) y categoría III (peligro moderado, con diseminación limitada).

En la Tabla 5 se agrupan los microorganismos y parásitos peligrosos según su nivel de peligro.

Tabla 5. Microorganismos y parásitos peligrosos según la gravedad del peligro.

<p>Categoría I (peligro grave)</p>	<p><i>Clostridium botulinum</i> tipos A, B, E y F <i>Shigella dysenteriae</i> <i>Salmonella</i> entérica serotipos Paratyphi A y B <i>Escherichia coli</i> entero hemorrágica Virus de la hepatitis A y E <i>Brucella abortus</i>, <i>Brucella suis</i> <i>Vibrio cholerae</i> 01 <i>Vibrio vulnificus</i> <i>Taenia solium</i></p>
<p>Categoría II (peligro moderado, con diseminación potencialmente extensa)</p>	<p><i>Listeria monocytogenes</i> <i>Salmonella spp.</i> <i>Shigella spp.</i> <i>E. coli</i> entero virulentas <i>Streptococcus pyogenes</i> Rotavirus Virus del grupo Norwalk <i>Entamoeba histolytica</i> <i>Diphyllobothrium latum</i> <i>Ascaris lumbricoides</i> <i>Cryptosporidium parvum</i></p>
<p>Categoría III (peligro moderado, con diseminación limitada)</p>	<p><i>Bacillus cereus</i> <i>Campylobacter jejuni</i> <i>Clostridium perfringens</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Vibrio parahaemolyticus</i> <i>Yersinia enterocolitica</i> <i>Giardia lamblia</i> <i>Taenia saginata</i></p>

FUENTE: Montville, T. J., & Matthews, K. R. (2008). *Microbiología de los alimentos: Introducción*. Zaragoza: Acribia. PP 96.

1.16.2 Microorganismos Indicadores y Criterios Microbiológicos

1.16.2.1 Indicadores de Calidad Microbiológica

Examinar un producto en busca de organismos indicadores de calidad puede proporcionar información rápida, de confianza y simple sobre el proceso de elaboración de dicho alimento, contaminación post-proceso, durante el proceso, contaminación desde el ambiente y del nivel general de higiene bajo el cual el alimento ha sido procesado y almacenado³⁰.

A menudo la vida útil de un alimento perecedero viene determinada por el número de microorganismos presentes inicialmente. Como regla general, un alimento que contenga una gran población de microorganismos alterantes tendrá una vida útil más corta que otro alimento del mismo tipo, si este contiene una población menor de microorganismos.

Sin embargo, la relación entre recuento total y vida útil no está exenta de excepciones. Algunos microorganismos ejercen mayor impacto que otros sobre las características organolépticas de un alimento debido a la presencia de diferentes enzimas actuando sobre los constituyentes del alimento. Además del efecto de ciertos niveles y/o tipo de microorganismos alterantes, las modificaciones en los parámetros de calidad también dependen del alimento y de condiciones de conservación como son la temperatura y la fase gaseosa³².

El empleo de criterios microbiológicos para determinar la vida útil de un alimento requiere el conocimiento de las condiciones de procesado y de la microflora que se espera del producto²⁹.

Los indicadores ideales de calidad de un producto o de su vida útil deben seguir los siguientes criterios³²:

- Deben estar presentes y deben ser detectables en todos aquellos alimentos de los que se evalúa su calidad.
- Su crecimiento y número debe presentar correlación negativa directa con la calidad del producto.
- Deben ser detectados y contados fácilmente y claramente distinguibles de otros microorganismos.
- Debe ser posible contarlos en un periodo corto de tiempo, idealmente en menos de 8 horas.
- Su crecimiento no debería afectar adversamente al resto de componentes de la flora del alimento.
- Deben ser fáciles de detectar.
- Debe ser fácilmente distinguibles del resto de la flora del alimento.
- Tener una historia de constante asociación con el patógeno.
- Presente cuando el patógeno en cuestión está presente.
- Requerimientos para el crecimiento y tasa de crecimiento iguales a los del patógeno.
- Una tasa de destrucción paralela a la del patógeno, o idealmente, con una persistencia ligeramente superior a la del patógeno.
- Estar ausente de los alimentos en los que no se presente el patógeno de interés excepto quizá en una pequeña taza.

Buttinaux y Mossel, sugirieron elementos adicionales para los indicadores fecales utilizados en la seguridad sanitaria de los alimentos. Incluyen los siguientes³³:

- Idealmente las bacterias seleccionadas deberían demostrar especificidad, ocurriendo solo en ambientes intestinales.
- Deberían estar en altas tasas en las heces de modo que pudiesen observarse pese a haber grandes diluciones.
- Deberían poseer una alta resistencia en el ambiente externo, donde van a ser evaluadas.

- Permitir su detección de una manera sencilla y fidedigna, incluso aunque estén presentes en escaso número.

a) Microorganismos Indicadores de Calidad

La Tabla 6 muestra algunos ejemplos de indicadores y los productos donde se hallan, los microorganismos citados en dicha Tabla son los principales organismos deteriorantes de los productos específicos listados.

La pérdida de calidad en otros productos puede no estar limitada a un organismo, sino implicar a varios. En estos tipos de productos, suele ser más práctico determinar el recuento de los grupos de microorganismos que causan con mayor probabilidad deterioro en cada alimento particular³⁰.

Tabla 6. Organismos altamente correlacionados con la calidad del producto.

Organismo	Producto (s)
<i>Acetobacter spp.</i>	Sidra fresca
<i>Bacillus spp.</i>	Masa de pan
<i>Byssochlamys spp</i>	Frutas en conserva
<i>Clostridium spp.</i>	Queso duro
Esporas de acidez plana	Verduras en conserva
Bacterias del ácido láctico	Cervezas, vinos
<i>Lactococcus lactis</i>	Leche cruda
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Azúcar (Durante su refinado)
<i>Pectinatus cerevisiophilus</i>	Cervezas
<i>Pseudomonas putrefaciens</i>	Mantequilla
Levaduras	Concentrados de zumo de fruta
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	Mayonesa, condimentos para ensalada

Fuente: Montville, T. J., & Matthews, K. R. (2008). *Microbiología de los alimentos: Introducción*. Zaragoza: Acribia. Pag. 91.

En el Diagrama 4 se muestran los principales microorganismos y virus de interés en los alimentos, pues en su mayoría pueden ocasionar una enfermedad de origen alimentario, si no se toman las medidas higiénicas y de sanidad correspondientes.

Los microorganismos mencionados en el Diagrama 4, son los que se suelen utilizarse como indicadores microbiológicos o que con frecuencia suelen causar intoxicaciones o infecciones.

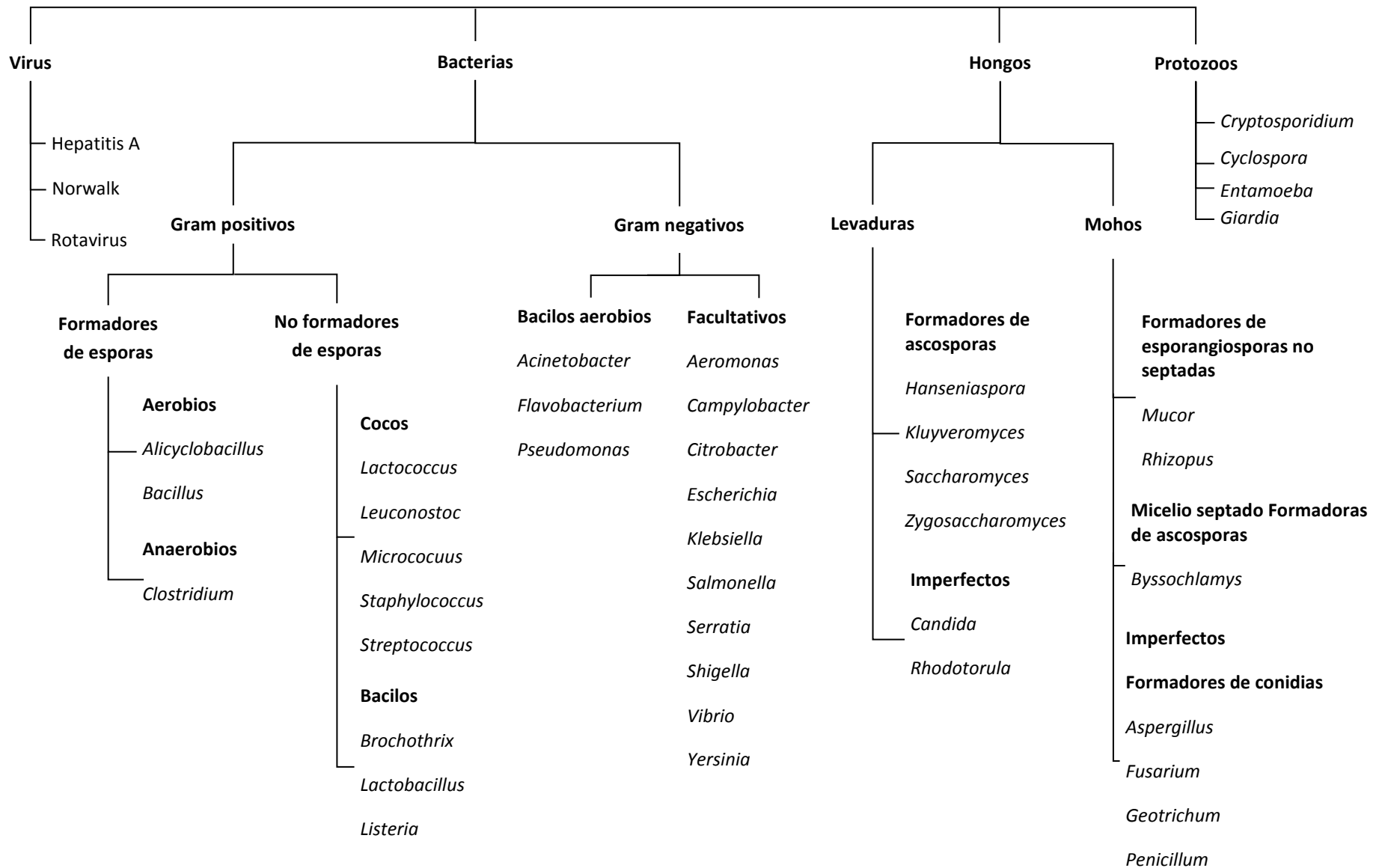


Diagrama 4. Microorganismos y virus de interés en el área de alimentos.

Fuente: Yousef, A. E., & Carlstrom, C. (2003). *Microbiología de los alimentos: Manual de laboratorio*. Zaragoza: Acribia. Pp. 26.

1.16.3 Indicadores de Calidad Microbiológica de Estudio

En seguida se enlistan los indicadores de calidad microbiológica que suelen utilizarse con frecuencia, en productos alimenticios como leche, nuez y dulces a base de leche.

a) Indicadores de Calidad Microbiológica para leche

Microorganismos indicadores de calidad microbiológica que suelen utilizarse con más frecuencia para leche destinada a consumo humano:

Tabla 7. Microorganismos indicadores de calidad para la leche bronca.

microorganismo	Referencia
Coliformes totales	NOM-243-SSA1-2010
Coliformes fecales (<i>E. coli</i>)	
<i>Salmonella spp.</i>	
<i>Staphylococcus aureus</i>	

Fuente: NOM-243-SSA1-2010, Productos y servicios. Leche, fórmula láctea, producto lácteo combinaos y derivados lácteos. Disposiciones y especificaciones sanitarias. Métodos de prueba. dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5160755&fecha=27/09/2010, 10 de Septiembre de 2013. pág. 35.

b) Indicadores de Calidad Microbiológica para la nuez.

La NMX-FF-093-SCFI-2011 exige algunas pruebas de rutina microbiológicas, utilizadas como indicadores de calidad que deben realizarse a la nuez, en la Tabla 8 se muestra cada uno de estos análisis microbiológicos:

Tabla 8. Microorganismos indicadores de calidad para la nuez.

microorganismo	Referencia
Coliformes totales	NMX-FF-093-SCFI-2011
Coliformes fecales (<i>E. coli</i>)	
<i>Salmonella spp.</i>	
<i>Staphylococcus aureus</i>	
Mohos y Levaduras	
Mesófilos aerobios	

Fuente: NMX-FF-093-SCFI-2011, Productos Alimenticios no Industrializados para consumo humano-Nuez Pecanera [*Carya illinoensis*, (Wangenh) K. Koch] sin cáscara- Especificaciones y Métodos de prueba. www.comenuez.com/assets/nmx-ff_093_scfi_2011.pdf, 27 de Agosto de 2013, pág. 12.

c) Indicadores Microbiológicos para el Dulce de leche

Finalmente, para dulces a base de leche se tienen los siguientes microorganismos como indicadores:

Tabla 9. Microorganismos indicadores de calidad para el dulce de leche.

microorganismo	Referencia
Coliformes totales	NOM-185-SSA1-2002
<i>Salmonella spp.</i>	
<i>Staphylococcus aureus</i>	

Fuente: NOM-185-SSA1-2002. Productos y servicios. Mantequilla, cremas, producto lácteo condensado azucarado, productos lácteos fermentados y acidificados, dulces a base de leche. Especificaciones sanitarias. www.ordenjuridico.gob.mx/Publicaciones/CDs2007/CDAgropecuaria/pdf/69NOM.pdf 13 de Septiembre de 2013, pp. 19.

1.16.4 *Salmonella spp.*

Son bacilos gram-negativos facultativamente anaeróbicos que pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae*. Son móviles por medio de flagelos peritricos, tiene la capacidad para metabolizar nutrientes por vías metabólicas respiratorias y fermentativas. Crecen óptimamente a 37°C y catabolizan D-glucosa y otros carbohidratos produciendo ácido y gas.

También exhiben propiedades psicrotóficas, según se refleja en la capacidad para crecer en alimentos almacenados a temperaturas de 2-4°C. Además el acondicionamiento previo de las células a temperaturas bajas puede aumentar notablemente el crecimiento y la supervivencia de *salmonella* en los productos alimenticios refrigerados. La capacidad de adaptación fisiológica de *salmonella spp.* Se demuestra por su capacidad para multiplicarse a valores de pH que varían desde 4.5 hasta 9.5 con un pH óptimo para el crecimiento de 6.5 hasta 7.5²⁹.

Es igualmente notable la capacidad de las salmonellas para adquirir mayor termo resistencia como consecuencia de la exposición a temperaturas subletales. El fenómeno resulta de una adaptación rápida del organismo a las temperaturas que se elevan en el microambiente hasta un nivel de termo tolerancia aumentada muy diferente al descrito en las curvas convencionales de tiempo-temperatura como nivel de letalidad térmica²⁹.

En cuanto a su identificación bioquímica son oxidasa negativas y catalasa negativas y crecen en citrato como única fuente de carbono. Generalmente producen sulfuro de hidrogeno, descarboxilan lisina y ornitina y no hidrolizan la urea. Fermentan la glucosa, no fermentan la lactosa, reducen nitratos a nitritos. Forman colonias típicas sobre medios de cultivo sólidos y poseen características bioquímicas y serológicas definidas³⁶.

1.16.5 Coliformes

Las *Enterobacteriaceae* lactosa-positivas o grupo *coli-aerogenes* constituyen un grupo de bacterias que se definen más por las pruebas usadas para su aislamiento que por criterios taxonómicos. Pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae* y se caracterizan por su capacidad de fermentar la lactosa con producción de ácido y gas, en un periodo de 48 horas y con una temperatura de incubación

comprendida entre 30 – 37°C. Son bacilos gram-negativos, aerobio y anaerobios facultativos, no esporulados. Se diferencian de otros grupos de microorganismos por la facultad que tienen de crecer en medios que contienen sales biliares (o agentes selectivos equivalentes) y también por la utilización de la lactosa como fuente de carbono. Del grupo Coliformes forman parte varios géneros³⁶:

- *Escherichia*
- *Enterobacter*
- *Klebsiella*
- *Citrobacter*

Su presencia en alimentos puede indicar contaminación fecal. Por ello, a los Coliformes se les considera microorganismos indicadores. Se debe tener presente, sin embargo, que los Coliformes que se encuentren en los alimentos pueden tener un origen fecal o no. Además, la presencia de números elevados de Coliformes en un alimento puede deberse al crecimiento de un pequeño inóculo de origen no fecal. En consecuencia, el recuento de Coliformes debe interpretarse con mucha cautela³¹.

Se encuentran en el intestino del hombre y de los animales, pero también en otros ambientes: suelo, plantas, cáscara de huevo, etc. Aunque su especificidad como indicadores no es buena, se suelen usar como índice de contaminación fecal por³⁶:

- Su frecuencia en heces.
- Su fácil detección en el laboratorio.
- Sus características semejantes, en algún aspecto, a las de algunos miembros patógenos de la familia *Enterobacteriaceae*.

Dentro de este grupo, son los Coliformes fecales los que tienen significado sanitario y, por consiguiente, los que más interesan en el análisis microbiológico de alimentos. Las principales características de los Coliformes fecales son³⁶:

- Aptitud para desarrollarse entre 43.5 – 45.5°C.
- Capacidad para crecer en presencia de sales biliares.
- Facultad para producir indol en agua de peptona.

En general, altos niveles de Coliformes indican manipulación y elaboración deficientes de los alimentos³⁶.

1.16.6 *Escherichia coli*

Las cepas de *Escherichia coli* son una parte común de la microflora anaeróbica facultativa normal del tracto intestinal de los humanos y animales de sangre caliente. La mayoría de cepas de *E.coli* son inofensivas; sin embargo, algunas cepas son patógenas y causan diarrea³⁰.

Por su especificidad, está considerado como un buen índice de contaminación fecal. Tiene el inconveniente de vivir poco tiempo en el ambiente extraentérico, por lo que su presencia en los

alimentos indica contaminación reciente. Se destruye a temperaturas de pasteurización y también durante su almacenamiento en frío, sobre todo a temperaturas de congelación³⁶.

Su escasa resistencia hace que no sea un buen indicador de flora patógena; así, por ejemplo, es mucho menos resistente que la *salmonella* a las condiciones ambientales y a la acción del frío. Perteneció a la familia *Enterobacteriaceae* es de forma bacilar, casi siempre móvil, gram-negativo. Posee estructura antigénica³⁶.

Las cepas de *E.coli* que provocan la enfermedad diarreica se clasifican en grupos específicos basados en propiedades de virulencia, mecanismos de patogenicidad, síndromes clínicos. Estas clases incluyen cepas de *E.coli* entero patógenas (EPEC), cepas de *E.coli* enterotoxigénicas (ETEC), cepas de *E.coli* entero invasoras(EIEC), cepas de *E.coli* de adherencia difusa (DAEC), cepas entero agregantes (EAggEC) y cepas de *E.coli* entero hemorrágicas (EHEC)²⁹.

Algunas pruebas bioquímicas que facilitan su identificación son:

Tabla 10. Pruebas bioquímicas que facilitan la identificación de algunas cepas de *E. coli*

Prueba	Reacción
Movilidad	+ (mayoría de los casos)
Indol	+
Rojo de Metilo	+
Voges Proskauer	-
Betagalactosidasa	+
Citrato de Simmons	-
SH ₂	-
Lisina	+
Urea	-
Fermentación de la glucosa	+
Fermentación de la lactosa	+

FUENTE: Pascual Anderson, M. (1992). *Microbiología Alimentaria: Metodología analítica para alimentos y bebidas*. Madrid: Lavel. PP. 24.

A diferencia de la mayoría de patógenos transmitidos por alimentos, numerosas cepas de *E. coli* O157:H7, la cual ha sido identificada como patógeno, son sorprendentemente tolerantes a ambientes ácidos. El pH mínimo de crecimiento es de 4.0 a 4.5, pero esto depende de la interacción del pH con otros factores. Por ejemplo los pulverizadores de ácidos orgánicos que contiene ácido acético, láctico o cítrico no afectan la cantidad de *E.coli* en la carne de ternera³⁰.

Las cepas de *E.coli* O157:H7 no son más resistentes al calor que otros patógenos. La presencia de ciertos compuestos en los alimentos puede proteger el organismo. La presencia de grasas protege a estas cepas de *E.coli*, las temperaturas de pasteurización destruye al microorganismo³⁰.

1.16.7 *Staphylococcus aureus*

Es una especie bacteriana con forma de coco que se agrupan de forma irregular en racimos. Son inmóviles y carecen de esporas, son gram-positivas. Es una especie bacteriana muy sensible a la acción del calor y de los desinfectantes, sus toxinas pueden ser causa de intoxicación cuando se ingieren con los alimentos. Las cepas de *Staphylococcus aureus* enterotoxigénicas, suponen un riesgo para la salud. Puede ocurrir que no se detecte *Staphylococcus aureus* en un alimento o que el número detectado sea pequeño y que, sin embargo, exista cantidad detectable suficiente de enterotoxina estafilocócica. En este caso los gérmenes que originaron la toxina han ido descendiendo en número e, incluso, desapareciendo, mientras que la toxina, por su mayor resistencia, permanece en el alimento³⁶.

Es uno de los patógenos asporógenos más resistentes y es capaz de sobrevivir por mucho tiempo en estado seco, su supervivencia es facilitada por la materia orgánica, que es probable que acompañe al organismo en una lesión inflamatoria. El aislamiento del organismo en el aire, en el polvo, en las aguas residuales, y en el agua, es relativamente fácil²⁹.

Los humanos son el principal reservorio de *S. aureus*. Los humanos son portadores naturales y propagan los estafilococos a otros individuos y alimentos. La mayoría de las intoxicaciones alimentarias estafilocócicas son trazadas hasta alimentos contaminados por humanos durante su preparación. Además de la contaminación de alimentos causada por los manipuladores, las máquinas picadoras de carne, los cuchillos, los recipientes utilizados durante su conservación, las tablas de cortar y los filos de sierras también pueden introducir *S. aureus* en alimentos.

Algunas de las condiciones frecuentemente asociadas con brotes de enfermedades estafilocócicas son la refrigeración inadecuada, la preparación de los alimentos con demasiada antelación, una higiene personal insuficiente, la cocción o calentamiento inadecuado de los alimentos y el uso prolongado de bandejas de calentamiento al servir los alimentos³⁰.

Staphylococcus aureus causa diversas enfermedades al ser humano, entre ellas la transmitida por alimentos. Es probable que la gastroenteritis estafilocócica, conocida habitualmente como intoxicación alimentaria estafilocócica, sea, de entre las enfermedades que pueden transmitirse por los alimentos, una de las que se dan con más frecuencia. La población de esta bacteria debe alcanzar, al menos, 10^6 UFC por gramo o mililitro, para que se sintetice una cantidad de toxina suficiente para provocar la enfermedad³¹.

1.16.8 Mohos y Levaduras

Los hongos son microorganismos eucariontes heterotróficos que poseen una estructura muy poco diferenciada, denominada talo. La complejidad del talo de los hongos es variable. Va desde estructuras unicelulares o filamentosas a complejas formas arbóreas. No poseen los tejidos especializados típicos de las plantas superiores, como tallo, hojas y tejidos conductores, también se caracterizan por la falta absoluta de clorofila³¹.

En comparación con las bacterias, los hongos tienen un tamaño mayor, forman estructuras más complejas y sus células poseen núcleo; los hongos son microorganismos aeróbicos y generalmente crecen más lentamente que las bacterias. Los mohos se desarrollan formando estructuras filamentosas denominadas micelio que son muy fáciles de detectar visualmente en el medio de cultivo o en el alimento. Las levaduras son comúnmente organismos unicelulares y sus colonias no pueden distinguirse de las de bacteria. Los hongos tienden a crecer en el intervalo mesófilo a psicrófilo. Generalmente toleran condiciones osmóticas y ácidas³¹.

Los hongos son microorganismos ubicuos que pueden contaminar los alimentos, el equipo, la maquinaria de proceso y los elementos de los lugares de almacenamiento. Debido a su amplia distribución, los hongos son la causa principal de la alteración de alimentos. En consecuencia, la contaminación de los alimentos con ciertos hongos puede causar pérdidas económicas considerables en la industria alimentaria.

Algunos mohos se consideran patógenos para los humanos a través de la producción de toxinas. Las toxinas fúngicas, denominadas habitualmente Micotoxinas, varían ampliamente en su estructura, propiedades y toxicidad. Las Micotoxinas incluyen aflatoxinas, que poseen un elevado poder cancerígeno; toxinas T-2 que ocasionan aleuquemia tóxica alimentaria y ocratoxina que provoca toxicidad en el riñón³¹.

Algunos hongos son beneficiosos dado que se utilizan en fermentaciones de alimentos. Entre estos está la levadura de panadería (*Saccharomyces cerevisiae*) que se utiliza en la elaboración de pan, en la fermentación de la cerveza y vino y *Penicillium* spp., el moho que participa en la elaboración de los quesos Camembert y azules. El moho *Mucor* spp., es la fuente del cuajo microbiano, utilizado en la elaboración de queso³¹.

La presencia de una gran cantidad de levaduras y mohos no es deseable en los alimentos, excepto en los quesos madurados por mohos. Un recuento elevado de levaduras y mohos en un determinado alimento indica una higiene y manipulación deficientes, abuso de temperatura, tratamiento inadecuado o contaminación post-proceso. Los ingredientes de alimentos que, en un momento, se contaminaron con mohos puede contener Micotoxinas peligrosas.

El procesamiento de alimentos efectuado con tales ingredientes puede reducir el número de mohos y levaduras pero no el nivel de Micotoxinas. En este caso se requiere un análisis de Micotoxinas para garantizar la seguridad y calidad de estos alimentos.

Los hongos, cuando se desarrollan en alimentos ácidos, pueden consumir los ingredientes ácidos y, en consecuencia, aumentar el pH del producto, lo que puede conducir a que las nuevas condiciones permitan el crecimiento de bacterias peligrosas que fueron, en un principio, inhibidas por la acidez del alimento³¹.

1.16.9 Mesófilos aerobios

En el recuento de microorganismos *aerobios mesófilos* se estima la flora total, pero sin especificar tipos de gérmenes³².

Tiene un valor limitado como indicador de la presencia de patógenos o de sus toxinas. Un recuento total de mesófilos aerobios bajo, no asegura que un alimento esté exento de patógenos o de sus toxinas; tampoco un recuento total alto significa, inevitablemente, presencia de flora bacteriana³⁰.

1.16.10 *Lactobacillus* y su Uso Como Probióticos

Los *Lactobacillus* son bacterias Gram +, pleomórficas, aspórogenas, generalmente inmóviles, citocromo y catalasa negativos, la mayoría Aero tolerantes y glucocidolíticas. Tienen grandes exigencias nutritivas: vitaminas, aminoácidos, etc. el género *Lactobacillus* se divide en 3 subgéneros: *Thermobacterium*, *Streptobacterium* y *Betabacterium*³⁷.

Los subgéneros *Thermobacterium* y *Betabacterium* son homofermentativos en presencia de glucosa y los *Betabacterium* son heterofermentativos³⁷.

Los probióticos son microorganismos inoos que se incorporan a los alimentos y que, una vez ingeridos, sobreviven en el tubo digestivo del consumidor donde regulan la microbiota intestinal y ejercen efectos beneficiosos para su salud³⁸.

Se diferencian de los prebióticos que son componentes alimenticios no-vivos, principalmente fibras dietarias, cuyo consumo confiere un beneficio para la salud del huésped en asociación con la modulación de la microbiota. Los probióticos son principalmente bacterias lácticas pertenecientes a los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*³⁹.

Los microorganismos conocidos como probióticos cuando son consumidos en cantidades adecuadas confieren beneficios a la salud incluyendo la reducción del nivel de colesterol, mejorando las funciones gastrointestinales y fortaleciendo el sistema inmunológico⁴⁰.

Este tipo de microorganismos se han consumido en alimentos tales como el yoghurt, tal vez por cientos de años, pero no fue sino a inicios del Siglo XX que los científicos comenzaron a investigar las razones de los beneficios de su consumo. Se ha asociado la salud y la longevidad con la ingesta de bacterias presentes en leches fermentadas⁴¹.

La investigación para el desarrollo específico de bacterias probióticas se inició en Japón en la década de los treinta del siglo XX, lográndose aislar y reforzar a la primera cepa probiótica en el mundo, llamada *Lactobacillus casei Shirota*, la cual dio origen a la primera leche fermentada con características de producto probiótico⁴².

La incorporación de los cultivos probióticos a los alimentos no ha sido tan sencilla, la viabilidad de un probiótico en el producto terminado depende de factores como la disponibilidad de los nutrientes, factores de crecimiento e inhibidores de crecimiento, la concentración de los solutos, el nivel de inoculación, la temperatura de incubación y la temperatura de almacenamiento del alimento⁴³.

La palabra probiótico significa en pro de la vida. Son cultivos activos tales como las bacterias lácticas y sustancias que contribuyen al equilibrio microbiano intestinal, para restituir la población del medio interno y proteger la integridad intestinal, debido a que son capaces de sobrevivir la digestión llegando vivas al colon⁴⁴.

a) Características de Microorganismos Probióticos.

Para que una cepa microbiana sea seleccionada como probiótica debe cumplir con ciertos criterios, el más importante es que dicha cepa sea segura para el organismo, que posea las características deseables para el producto donde se va a utilizar y que cumpla con los siguientes aspectos^{42, 45}:

- Aspectos generales como origen, identidad y resistencia a mutaciones.
- Aspectos técnicos (propiedades de crecimiento *in vitro*, supervivencia durante el proceso y viabilidad durante transporte y almacenamiento).
- Aspectos fisiológicos como resistencia al estrés del medio, a factores antimicrobianos que se encuentran en el paso estómago-duodeno (pH 2.5, jugo gástrico, sales biliares y jugo pancreático).
- Aspectos funcionales y benéficos; adhesión a las células intestinales, colonización de la mucosa, competitividad, antagonismo con patógenos, estimulación del sistema inmunológico, estimulación del crecimiento de las bacterias autóctonas del tracto gastrointestinal.
- Aspectos de seguridad; que no transfieran resistencia a antibióticos ni factores virulentos.

La supervivencia de las cepas en el producto final dependerá de muchos factores como pH, presencia de conservadores y de sustancias inhibidoras de crecimiento potenciales.

b) Géneros Microbianos Utilizados Como Probióticos.

Los principales microorganismos que se han utilizado como probióticos son: *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Bifidobacterium* y *Enterococcus*⁴⁶.

El uso de las cepas del género *Lactobacillus* como microorganismos probióticos (Tabla 11) se ha determinado por⁴⁶:

- Su asociación con productos fermentados tradicionales y su gran aceptabilidad.
- Su asociación con el tracto gastrointestinal interactuando benéficamente con el ecosistema del intestino delgado.
- La adaptación a productos lácteos y otros alimentos y su larga historia de aplicaciones en la Industria Alimentaria.

Algunas de las cepas de *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* que se utilizan con más frecuencia en la industria alimentaria, se enlistan a continuación en la Tabla 11.

Tabla 11. Cepas de microorganismos utilizadas como probióticos

<i>Bifidobacterium sp</i>	<i>Lactobacillus sp</i>	Otros
<i>B. adolescentis</i>	<i>L. acidophilus</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>B. animalis</i>	<i>L. bifidus</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
<i>B. breve</i>	<i>L. brevis</i>	<i>dextranicum</i>
<i>B. brevis</i>	<i>L. bulgaricus</i>	<i>Bacillus cereus</i>
<i>B. bifidum</i>	<i>L. casei</i>	<i>Pediococcus acidophilus</i>
<i>B. infantis</i>	<i>L. casei rhamnosus</i>	<i>Streptococcus diacetilactis</i>
<i>B. lactis</i>	<i>L. casei Shirota</i>	<i>Streptococcus cremoris</i>
<i>B. longum</i>	<i>L. cellobiosus</i>	<i>Streptococcus lactis</i>
<i>B. thermophilum</i>	<i>L. colinoides</i>	<i>Pediococcus acidophilus</i>
	<i>L. cremoris</i>	<i>Saccharomyces boulardii</i>
	<i>L. crispatus</i>	
	<i>L. delbriekii bulgaricus</i>	
	<i>L. dextranicum</i>	
	<i>L. fermentum</i>	
	<i>L. gallinarum</i>	
	<i>L. lactis</i>	
	<i>L. lactis blover oliacerylactis</i>	
	<i>L. plantarum</i>	
	<i>L. reuteri</i>	
	<i>L. rhamnosus</i>	
	<i>L. ruminis</i>	
	<i>L. paracasei</i>	

FUENTE: Blandino, A., Al-Aseeri, M. E., Pandiella, S. S., Cantero, D., Webb, C. 2003. Review Cereal-based fermented foods and beverages. *Food Res. Int.* 36: 527-543.

Las especies del género *Lactobacillus* son microorganismos exigentes ya que para su crecimiento óptimo requieren carbohidratos fermentables, aminoácidos, vitaminas del complejo B, ácidos nucleicos y minerales. Tienen una amplia historia de ser utilizados en productos alimenticios fermentados, se distinguen por su capacidad de atravesar en gran número la barrera gástrica y sobrevivir durante el tránsito intestinal, para así poder desarrollar sus efectos benéficos en el intestino⁴⁷.

c) Supervivencia o viabilidad de los probióticos en alimentos

La aplicación de probióticos en los alimentos depende de factores como: actividad acuosa (a_w), pH, concentración de sal y de otros ingredientes que puedan funcionar como antimicrobianos y del estrés mecánico provocado por el proceso.

Además de las propiedades en beneficio de la salud, los probióticos deben cumplir ciertos requerimientos para poder desarrollar un producto comercial, tales como la supervivencia, la actividad en el producto y la estabilidad durante el almacenamiento. No deberán afectar las características de sabor o aroma del producto ni acidificarlo durante su vida de anaquel⁴³.

Las bacterias probióticas se han aplicado en muchos productos a nivel mundial. Han sido adicionadas a los alimentos, en productos farmacéuticos y en la alimentación de animales.

Una consideración muy importante es que los productos contengan una dosis efectiva de células viables durante toda su vida de anaquel, se ha establecido por diversos estudios que la concentración mínima deberá ser mayor a 10^6 UFC/ml.^{43,48}

La viabilidad de un probiótico en el producto terminado dependerá de factores como la disponibilidad de los nutrientes, factores de crecimiento e inhibidores de crecimiento, la concentración de los solutos, el nivel de inoculación, la temperatura de incubación y la temperatura de almacenamiento.

Otros factores que determinan la viabilidad de los microorganismos en el alimento son la cepa seleccionada, las interacciones entre las especies microbianas presentes, la producción de peróxido de hidrógeno por metabolismo bacteriano y la acidez final del producto.

Muchos probióticos al tener origen en el intestino, son sensibles al oxígeno, calor y concentraciones elevadas de ácido lo que les genera estrés y esto provoca que se desempeñen pobremente en muchos alimentos⁴⁹.

Las matrices más comunes para bacterias probióticas en alimentos han sido diferentes tipos de productos lácteos fermentados. Durante los últimos años la necesidad de diversificar los probióticos en el mercado ha aumentado, por lo que hoy en día se ha demostrado que los jugos frutales son un vehículo adecuado para los probióticos, últimamente ha crecido el interés por aplicarlos en productos cárnicos fermentados, al encontrarse que la carne protege las bacterias lácticas en contra de la acción letal de la bilis⁵⁰.

Las frutas y vegetales representan las nuevas matrices en alimentos que se comportan como vehículos de probióticos, son un medio ideal porque contienen nutrientes benéficos como minerales, vitaminas, fibra dietética y antioxidantes⁵¹.

1.17 Justificación

El desarrollo e innovación de productos alimenticios ha tenido un auge impresionante en los últimos años, esto es debido en gran medida a que el consumidor ya no solo se preocupa por ingerir el alimento, sino que además busca que este se encuentre en las mejores condiciones posibles de consumo y lo más importante que sea saludable.

En esta creciente necesidad del consumidor para cuidar su salud, a su vez ha provocado una gran diversificación de los productos alimenticios procesados, pues aparte de sus presentaciones originales, es muy común encontrar en el mercado productos reducidos en grasa y azúcares, con un alto contenido de fibra, deslactosados, sin conservadores, fortificados y/o enriquecidos en vitaminas y minerales, adicionados con prebióticos y/o probióticos, sin sodio o reducidos en sodio, sin grasas Trans, sin colesterol del tipo LDL, solo por mencionar algunos. Dada la variedad y propiedades químicas de la leche y sus derivados se ha encontrado una mayor aplicación, innovación y desarrollo de nuevos productos en lácteos y sus derivados⁵².

Se decidió elaborar un dulce de leche ya que, se buscó realizar un producto diferente, el cual no se hubiera trabajado dentro del laboratorio de tecnología de calidad de alimentos, que a su vez permitiera innovar sin tener restricciones en cuanto a lo que ya se había realizado en trabajos anteriores.

El INEGI, en conjunto con la secretaría de salud, emitieron un reporte en diciembre del 2014, donde se resaltan algunos puntos importantes sobre la salud de los mexicanos:

- México es el país con mayor número de personas con sobrepeso y obesidad.
- El país con el índice de obesidad infantil más alto.
- La diabetes es la principal causa de muerte en nuestro país.
- Uno de cada tres mexicanos tiene hipertensión y/o colesterol elevado.
- Uno de cada cuatro niños tiene sobrepeso

*los datos mencionados corresponden a diciembre del 2014⁵³.

A partir de estos datos se decidió realizar el dulce de leche tipo gloria reducido en grasa y sin azúcar, pues las innovaciones en estos aspectos son necesarias y actualmente tienen mucho auge en el mercado.

Por otra parte el adicionarle inulina y utilizar leche deslactosada para la elaboración del dulce de leche le dan un plus al producto, pues se le está agregando fibra dietética como la inulina a un producto que normalmente no contiene está en su formulación, a su vez el utilizar leche deslactosada permite llegar a consumidores intolerantes a la lactosa, lo que se traduce en abarcar en un área más grande el mercado y por consiguiente generar más ganancias monetarias si en algún momento se llega a comercializar el dulce de leche.

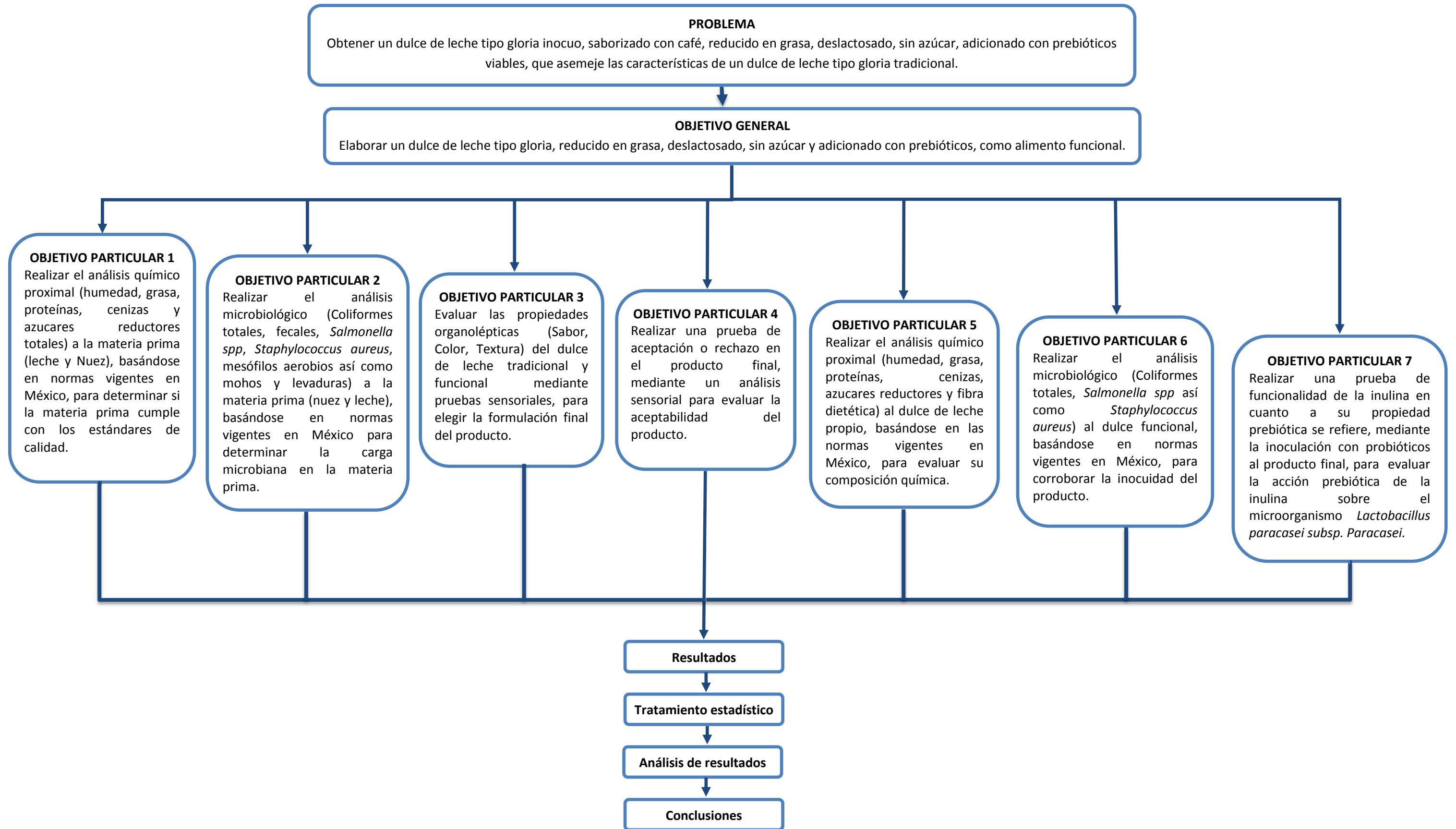


Diagrama 5. Cuadro Metodológico utilizado para la elaboración del dulce de leche tipo gloria.

CAPITULO 2: OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Elaborar un dulce de leche tipo gloria, reducido en grasa, deslactosado, sin azúcar y adicionado con prebióticos, como alimento funcional.

2.2 Objetivo particular 1

Realizar el análisis químico proximal (humedad, grasa, proteínas, cenizas y azúcares reductores totales) a la materia prima (leche y Nuez), basándose en normas vigentes en México, para determinar si la materia prima cumple con los estándares de calidad.

2.3 Objetivo particular 2

Realizar el análisis microbiológico (Coliformes totales, fecales, *Salmonella spp*, *Staphylococcus aureus*, mesófilos aerobios así como mohos y levaduras) a la materia prima (nuez y leche), basándose en normas vigentes en México para determinar la carga microbiana en materia prima.

2.4 Objetivo particular 3

Evaluar las propiedades organolépticas (Sabor, Color, Textura) del dulce de leche tradicional y funcional, mediante pruebas sensoriales, para elegir la formulación final del producto.

2.5 Objetivo particular 4

Realizar una prueba de aceptación o rechazo del producto final, mediante un análisis sensorial para evaluar el nivel de aceptabilidad del producto.

2.6 Objetivo particular 5

Realizar un análisis químico proximal (humedad, grasa, proteínas, cenizas, azúcares reductores y fibra dietética) al dulce de leche propio, basándose en las normas vigentes en México, para evaluar su composición química.

2.7 Objetivo particular 6

Realizar los análisis microbiológicos (Coliformes totales, *Salmonella spp*, así como *Staphylococcus aureus*) al dulce funcional, basándose en normas vigentes en México, para corroborar que el producto sea inocuo.

2.8 Objetivo particular 7

Realizar una prueba de funcionalidad de la inulina en cuanto a su propiedad prebiótica se refiere, mediante la inoculación con probióticos a un dulce de leche, para evaluar la acción prebiótica de la inulina sobre el cultivo láctico.

CAPITULO 3: METODOLOGÍA

3.1 Actividades preliminares

A continuación se enlistan las pruebas preliminares realizadas a la leche de vaca, con el fin de validar su calidad e inocuidad, fue necesario realizar estas pruebas, ya que al utilizar leche de vaca bronca, se tuvo que verificar que dicha leche se estuviera en condiciones para ser procesada. En seguida se enlistan cada una de las pruebas realizadas a la leche de vaca. La metodología de cada una de ellas se encuentra en el anexo 1.

Toda la leche que se utilizó para esta experimentación fue obtenida de rancho ubicado en el municipio de Tepotzotlán, estado de México.

3.1.1 Pruebas de Andén

Las pruebas de andén, son pruebas que se le realizan a la leche de origen bovino, para saber si cumple con ciertos estándares de calidad que permiten determinar si ésta es apta para ser utilizada como materia prima, es por lo cual que es muy importante realizar esta serie de pruebas a la leche, antes de someterla a los procesos necesarios para obtener el producto deseado; ya que de otra forma, se obtendría un producto de mala calidad, o podría no llegarse a obtener el producto con las características requeridas. En la Tabla 12 se muestran las pruebas de andén que se le realizaron a la leche bronca de vaca:

Tabla 12. Pruebas de andén realizadas a la leche bronca.

Determinación	Método	Referencia
Acidez	Determinación de Acidez por Titulación Alcalimetría	NOM-155-SCFI-2003, Leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado-Denominaciones, especificaciones fisicoquímicas, información comercial y métodos de prueba,
pH	Determinación de pH con Potenciómetro	NMX-F-317-S-1978. Determinación de pH en alimentos. Determination of pH in foods. Normas Mexicanas. Dirección General de Normas. www.colpos.mx/bancodenormas/nmexicanas/NMX-F-317-S-1978.PDF , 18 de Septiembre de 2013.
Alcohol	Prueba de alcohol al 72% v/v	PROY-NMX-F-700-COFOCALEC-2012, Sistema producto leche - Alimento – Lácteo – Leche cruda de vaca – Especificaciones fisicoquímicas, sanitarias y métodos de prueba. (prueba de alcohol),
Densidad	Determinación de Densidad por Lactodensímetro de Quévenne	NMX-F-424-S-1982, Productos Alimenticios para uso humano. Determinación de la densidad en leche fluida. Food products for human use. Determination of the density in fluid milk.
Evaluación de la calidad microbiológica de la leche	Azul de metileno	PROY-NMX-F-700-COFOCALEC-2012, Sistema producto leche - Alimento – Lácteo – Leche cruda de vaca – Especificaciones fisicoquímicas, sanitarias y métodos de prueba. (prueba de alcohol),

- **Acidez**

La leche generalmente tiene una acidez de 1.3 a 1.7 g/L expresada en ácido láctico. La acidez normal de la leche se debe principalmente a su contenido de caseína (0.05 - 0.08 %) y de fosfatos. También contribuyen a la acidez el dióxido de carbono (0.01 – 0.02 %), los citratos (0.01 %) y la albúmina (menos de 0.001 %).

La acidez se mide con base a una titulación alcalimétrica con hidróxido de sodio 0.1 N utilizando fenolftaleína como indicador o, en su caso, utilizando un potenciómetro para detectar el pH de 8.3 que corresponde al fin de la titulación¹.

- **pH**

Esta prueba se basa en la determinación de la actividad de iones hidrógeno, empleando un instrumento potenciométrico, con sensibilidad para reproducir pH de 0.05 o 0.005 unidades usando un electrodo indicador al ión hidrógeno como un electrodo de vidrio y un electrodo de referencia apropiado, detectando el aparato el potencial en mili volts (mV) y en unidades de pH⁵⁴.

- **Alcohol**

Cuando se mezcla un volumen dado de alcohol con leche, provoca una deshidratación parcial de ciertos coloides hidrofílicos presentes en la muestra, desnaturalizándolos y alcanzando un estado de desequilibrio entre sus dos fases discontinuas (emulsión grasa y suspensión coloidal) por lo que flocculan. Este cambio sólo se produce cuando la mezcla final alcanza un cierto contenido de alcohol, abajo del cual la leche térmicamente estable no flocculará y por lo tanto la leche resistirá un tratamiento térmico⁵⁵.

- **Densidad**

Este método se basa en la determinación de la densidad de la leche, utilizando el lactodensímetro de Quévenne, haciendo la lectura a 288 K (15°C), aunque también puede efectuarse a otras temperaturas pero corrigiendo la lectura a 288 K (15° C)⁵⁶.

- **Azul de metileno**

La técnica de azul de metileno es una prueba de rutina que se le debe de hacer a la leche bronca, con el fin de determinar o evaluar la carga microbiana inicial de la leche, pues de acuerdo al tiempo de decoloración del indicador sobre la misma, se obtiene una relación en cuanto a la calidad microbiológica de la leche⁵⁵.

En la Tabla 13 se encuentran la relación entre tiempo de decoloración y calidad de la leche:

Tabla 13. Calidad que debe tener la leche bronca basada en la prueba de azul de metileno.

Tiempo de decoloración (horas)	Número estimado de bacterias por mL	Calidad de la leche
5	100 000 a 200 000	Buena
2 - 4	200 000 a 2 millones	Buena a regular
menos de 2	2 a 10 millones	Mala

Fuente: PROY-NMX-F-700-COFOCALEC-2012, Sistema producto leche - Alimento – Lácteo – Leche cruda de vaca – Especificaciones fisicoquímicas, sanitarias y métodos de prueba. (prueba de alcohol y azul de metileno). <http://www.canilec.org.mx/Circulares%202012/93del12/PROY-NMX-F-700-COFOCALEC-2012%20110212.pdf>, 18 de Septiembre de 2013. Pp.38, 39.

3.2 Acondicionamiento de leche de vaca

Se procedió a elaborar el dulce de leche reducido en su contenido graso, con el fin de poder brindar al consumidor un producto con un contenido calórico bajo comparado con el dulce de leche tipo gloria original, estos productos suelen tener una alta cantidad de calorías, por la cantidad de lípidos y carbohidratos contenidos en los mismos. Si además se toma en cuenta la nuez picada, ésta es rica en lípidos, alrededor del 62 %¹³, lo que aumenta el contenido graso del dulce de leche. Por lo que se obtendría un producto con un elevado contenido graso. Por esta razón se optó por descremar la leche, mediante el proceso de centrifugación.

Por otra parte se decidió deslactosar la leche utilizada para la elaboración del dulce. Ya que se estima que aproximadamente un 40% de la sociedad latinoamericana padece de intolerancia a la lactosa⁵⁷. El dulce de leche elaborado va enfocado a éste tipo de consumidores, sin importar su edad o género.

3.2.1 Descremado de la leche

Se establecieron 3 distintas velocidades de giro de la descremadora, todas asociadas a un solo tiempo de 10 minutos, esto fue para determinar en cuál de estas velocidades se obtendría una leche con un contenido graso no mayor al 3.0%. En la Tabla 14, se muestran las condiciones a las que se realizó el descremado.

Tabla 14. Condiciones a las que fue realizada la centrifugación de leche de vaca.

Velocidad de giro (r.p.m.)	Tiempo (min)
3000	10
2500	10
2200	10

3.2.2 Deslactosado de la leche

Se realizó un deslactosado de la leche bronca que se utilizó para este trabajo, mediante la adición de la enzima lactasa, esta enzima separa a la lactosa en las dos moléculas que la conforman, glucosa y galactosa, permitiendo que de esta forma, la leche sea digerible por las personas intolerantes a la lactosa.

Una leche deslactosada, no se encuentra completamente ausente de moléculas de lactosa, el deslactosado de la leche, reduce la concentración de esta hasta un punto en el cual puede ser digerida por el organismo sin causar las reacciones adversas en el cuerpo⁵.

La temperatura y el pH óptimos de las β -galactosidasas, (enzima lactasa) varían según el origen, aunque la especificidad es esencialmente la misma. Las de uso comercial se encuentran dentro de dos grupos: "ácidas" y "neutras". Las "ácidas" presentan una actividad óptima a un pH entre 3 y 5 y una temperatura entre 46 y 55 °C, mientras que las condiciones para las "neutras" son un rango de pH de 6,5 y 7,3 y una temperatura entre 35 y 40 °C. Generalmente las enzimas producidas por levaduras son consideradas neutras y las obtenidas a partir de hongos, ácidas⁵⁸. Se utilizó una enzima del tipo neutra.

Por cada litro de leche se adicionaron 6 ml de la enzima lactasa⁵⁸. Se mantuvo a una temperatura de 37°C, durante un tiempo de 5 horas para asegurar la completa hidrólisis de la enzima en la leche.

3.3 Materiales Biológicos para la elaboración del Dulce de Leche Tipo Gloria

- Leche de vaca bronca (Tepetzotlán).
- Sacarosa o azúcar de mesa (Zulka).
- Fructosa (Pro Jugo, Alta fructosa 55).
- Glucosa o Jarabe de maíz hidrolizado en polvo (Millikan).
- Café soluble (Nescafé).
- Agua potable (epura).
- Nuez pecana picada (Great Value).
- Inulina de Agave (BioAgave).
- Bicarbonato de sodio (Arm & Hammer).
- Goma Xantana (Keltrol).
- Stevia (Dannova Química).

3.4 Diagramas de Proceso para la Elaboración de Dulces de Leche Tipo Gloria

Una vez que se establecieron los ingredientes que se modificarían, se sustituirían y/o se añadirían en la formulación, se obtuvieron los diagramas de proceso para la elaboración de un dulce de leche tipo gloria con sacarosa y con fructosa respectivamente, las características ya descritas.

En el Diagrama 6 se observa el diagrama de proceso para el dulce de leche tipo gloria con sacarosa, y en el Diagrama 7 se muestra el diagrama de proceso para el dulce de leche tipo gloria con fructosa.

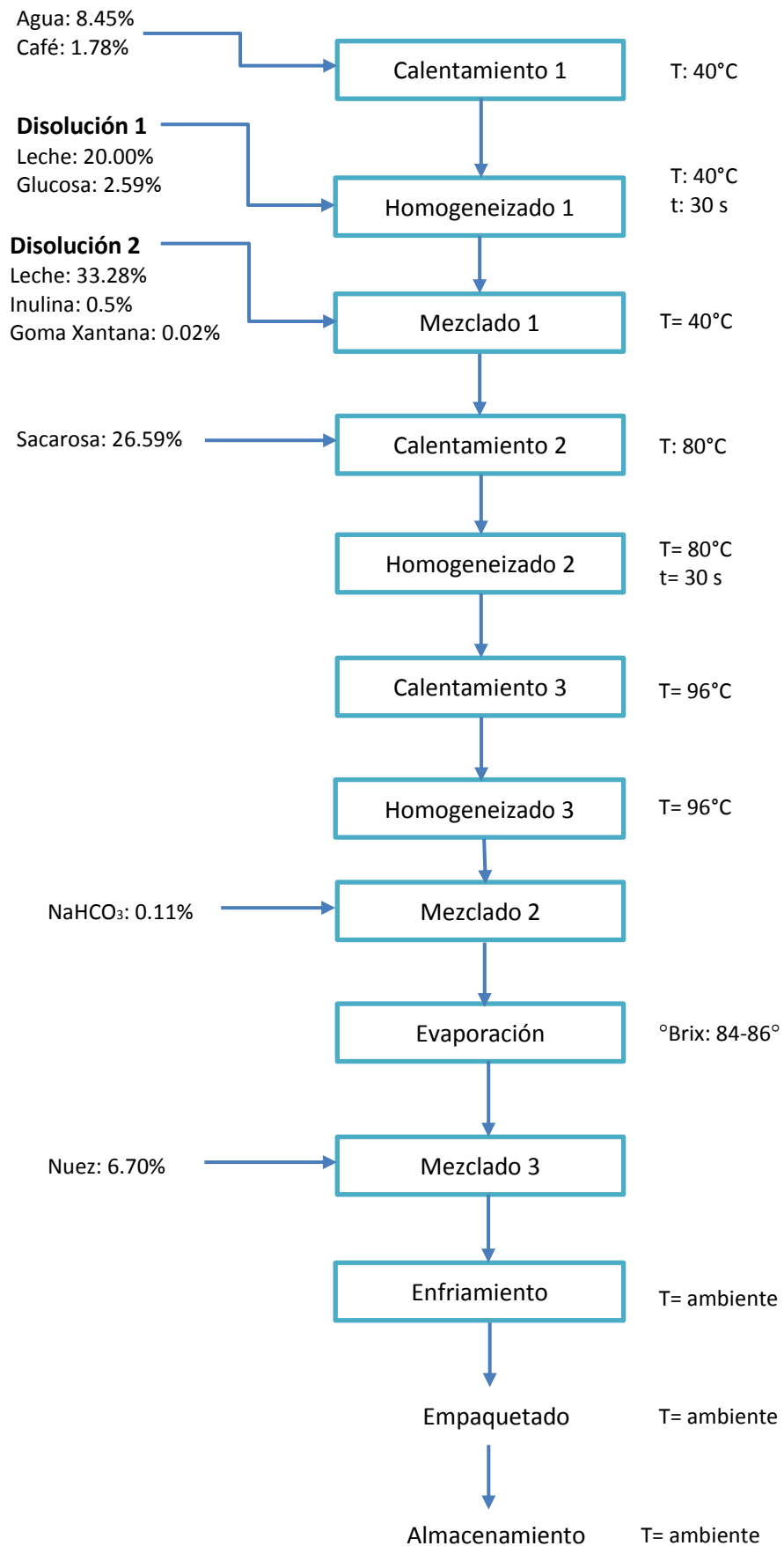


Diagrama 6. Diagrama de Proceso para la Elaboración del Dulce de Leche Tipo Gloria con Sacarosa.

3.4.1 Descripción Del Diagrama de Proceso

- **Calentamiento 1**

Consiste en aumentar la temperatura hasta 40 °C, con el fin de facilitar la disolución del café (1.78%) en agua (8.45%).

- **Disolución 1**

Para el dulce de leche con sacarosa, se hidrata la glucosa (2.59%) con leche (20%), para evitar la formación de grumos. Para el dulce de leche con fructosa, se hidrata la glucosa (2.59%) con la leche (20%) y se disuelve el Stevia (0.05%) en ésta misma, a una temperatura promedio de 40°C.

- **Disolución 2**

Para el dulce de leche con sacarosa, se disuelve la inulina (0.5%) con leche (33.28%) y se hidrata la goma Xantana (0.02%), evitando así la formación de grumos. Para el dulce de leche con fructosa, se disuelve la inulina (0.5%) y la fructosa (26.59%) en la leche (33.28%), a una temperatura promedio de 40°C.

- **Homogeneizado 1**

En esta parte del proceso, se lleva a cabo un homogeneizado a 40°C, por un tiempo de 30 segundos. Con el fin de dispersar los solutos uniformemente en toda la solución.

- **Mezclado 1**

Se añade 26.59% de sacarosa a la solución a una temperatura de 40°C. La sacarosa es añadida al final, ya que si ésta se disolviera en alguna de las disoluciones anteriores, no permitiría la correcta disolución e hidratación de los demás aditivos en polvo.

- **Calentamiento 2**

Para el dulce de leche con sacarosa se requiere una temperatura de 80°C, y para el dulce de leche con fructosa se necesita una temperatura de 76°C.

- **Homogeneizado 2**

En esta parte del proceso, es necesario llegar a las temperaturas establecidas en el calentamiento 2, ya que se observó que a estas temperaturas comienza la formación de grumos; es por lo cual se requiere un segundo homogeneizado por 30.

- **Calentamiento 3**

Para el dulce de leche con sacarosa se requiere incrementar la temperatura a 96°C y para el dulce de leche con fructosa a 82 °C.

- **Homogeneizado 3**

En las temperaturas alcanzadas en el calentamiento 3, comienza la formación de grumos; por lo que es necesaria una tercera homogeneización por 30.

- **Mezclado 2**

Se añade el bicarbonato de sodio (0.11%), ya que las reacciones de Maillard y de caramelización, se ven favorecidas en condiciones de pH básico.

- **Evaporación**

Se lleva la mezcla a una concentración de sólidos de 84-86° Brix por el método de bola (ver Anexo 5), durante el tiempo que inicia la evaporación, hasta llegar a los °Brix deseados se debe mezclar constantemente, para evitar la cristalización de los azúcares y quemado de éstos.

- **Mezclado 3**

Una vez que finaliza el proceso de evaporación, se añade la nuez picada (6.70%) se mezcla ésta en el dulce, hasta obtener una distribución homogénea de la misma.

- **Enfriamiento**

Se vacía el dulce de leche en una placa de mármol, a que ésta reduce el tiempo de enfriamiento.

- **Empaquetado**

Se pesa, se moldea y se empaqueta el producto en papel celofán a temperatura ambiente.

- **Almacenamiento**

Se debe almacenar en un lugar seco y fresco a temperatura ambiente.

NOTA: En el caso del dulce de leche con fructosa, en el Mezclado 1, se añade bicarbonato de sodio a una temperatura de 82°C. Y en el mezclado 2, se añade la nuez después de la evaporación. Esto es debido a que las temperaturas de calentamiento y evaporación en cada tipo de dulce de leche son distintas.

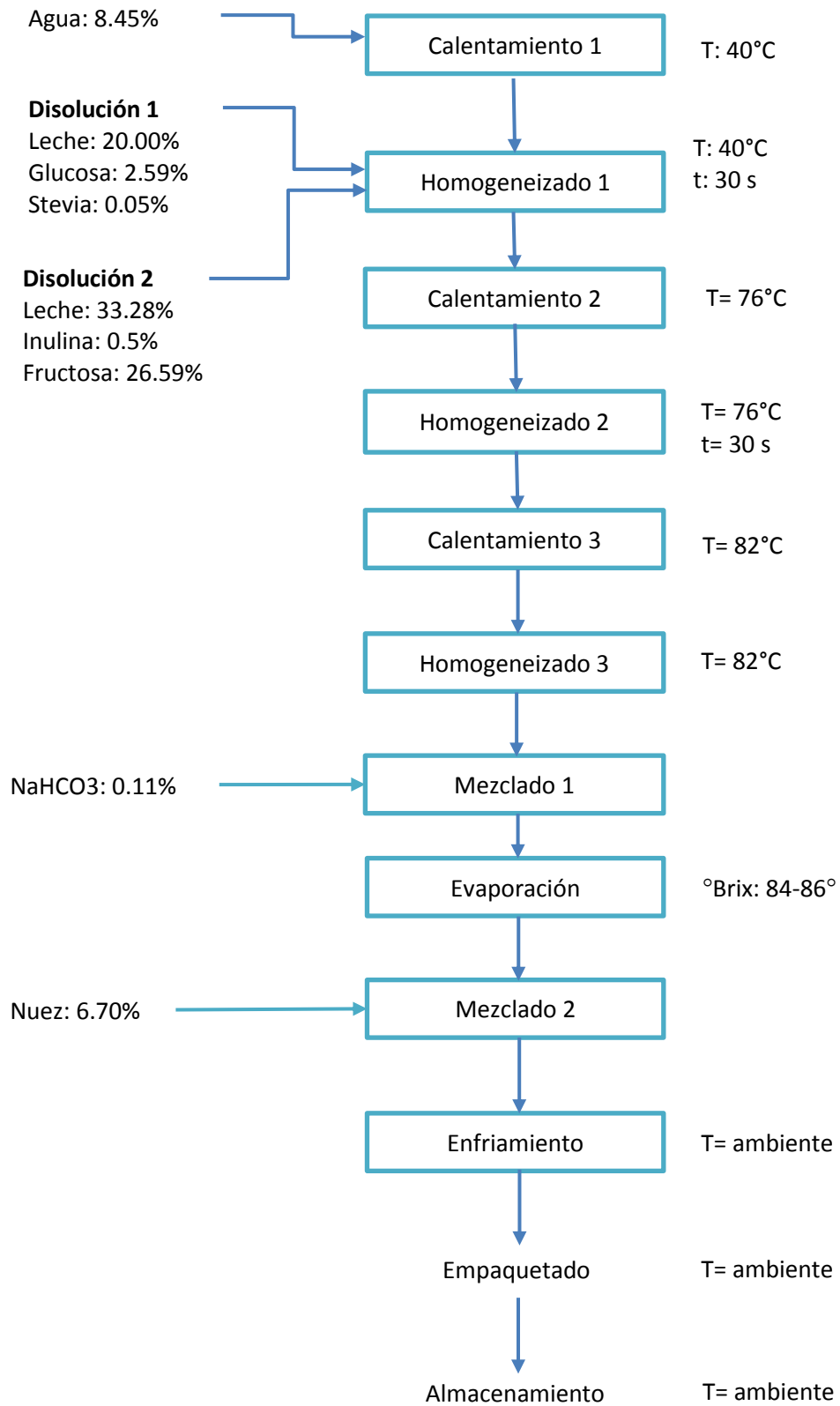


Diagrama 7. Diagrama de Proceso para la Elaboración del Dulce de Leche Tipo Gloria con Fructosa.

3.5 Análisis Químico Proximal

3.5.1 Materias Primas (Leche y Nuez)

En la Tabla 15 se muestran las pruebas de análisis químico proximal que se le realizaron a la leche de vaca y en la nuez:

Tabla 15. Técnicas utilizadas para el análisis químico proximal de leche y nuez.

	Determinación	Método	Referencia
Leche	Humedad	Determinación de humedad por el Método de Estufa	NMX-F-083-1986. ALIMENTOS. Determinación de humedad en Productos Alimenticios. Foods. Moisture in food products determination.
	Grasa	Determinación de Grasa Butírica por el Método de Gerber	NOM-155-SCFI-2003, Leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado-Denominaciones, especificaciones fisicoquímicas, información comercial y métodos de prueba,
	Carbohidratos	Determinación de Carbohidratos Totales	NOM-155-SCFI-2003, Leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado-Denominaciones, especificaciones fisicoquímicas, información comercial y métodos de prueba,
	Proteínas	Determinación de Proteínas por micro Kjeldahl	NOM-155-SCFI-2003, Leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado-Denominaciones, especificaciones fisicoquímicas, información comercial y métodos de prueba,
	Cenizas	Determinación de Cenizas	NMX-F-066-S-1978.Determinación de Cenizas en Alimentos. Foodstuff Determination of Ashes. Normas Mexicanas. Dirección General de Normas.
Nuez	Humedad	Determinación de humedad por el Método de Estufa	NMX-F-083-1986. ALIMENTOS. Determinación de humedad en Productos Alimenticios. Foods. Moisture in food products determination.

- **Humedad**

Este método se basa en la pérdida de peso debido a la evaporación del agua bajo condiciones establecidas⁶⁰.

- **Grasa (Método de Gerber)**

La grasa existe en la leche en forma de emulsión que se estabiliza por medio de los fosfolípidos y las proteínas. El método Gerber se basa en la ruptura de la emulsión por la adición de ácido sulfúrico concentrado. La grasa libre puede separarse por centrifugación por la adición de una pequeña cantidad de alcohol isoamílico, el cual actúa como un agente tenso activo que permite la separación nítida de las capas de grasa y la capa ácido-acuosa¹.

- **Carbohidratos totales**

Las proteínas de la muestra de leche son desnaturizadas, utilizando soluciones de acetato de zinc y ferrocianuro de potasio. Se filtra y en el filtrado se determina la lactosa aprovechando su propiedad de ser un azúcar reductor directo el cual reduce el cobre de sus sales alcalinas mediante una valoración volumétrica, según el método de Lane y Eynon¹.

- **Proteínas**

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^{1,34}.

- **Cenizas**

La determinación en seco es el método más común para cuantificar la totalidad de minerales en alimentos y se basa en la descomposición de la materia orgánica quedando solamente materia inorgánica en la muestra, es eficiente ya que determina tanto cenizas solubles en agua, insolubles y solubles en medio ácido.

En este método toda la materia orgánica se oxida en ausencia de flama a una temperatura que fluctúa entre los 550 -600°C; el material inorgánico que no se volatiliza a esta temperatura se conoce como ceniza⁶¹.

3.5.2 Dulce de Leche Tipo Gloria

Antes de comenzar a hablar sobre los resultados del AQP, se debe aclarar que se realizaron 2 tipos de dulce de leche, el tradicional dulce de leche tipo gloria y el dulce de leche tipo gloria funcional, tema principal de este trabajo, se elaboró el dulce de leche tipo gloria tradicional ya que para poder brindarle al dulce de leche funcional las características mencionadas (sin azúcar, reducido en grasa y adicionado con fibra), se necesitaba contar con los datos experimentales de su composición química en un dulce de leche tradicional, para que de esta forma se determinaran los porcentajes o la cantidad de sacarosa a sustituir por fructosa, lo mismo sucede con la cantidad de lípidos, ya que el contar con ese dato experimental, a las condiciones a las que se desarrolló el proceso de elaboración del dulce de leche, permitió establecer a que porcentaje se debía estandarizar la leche después del descremado, también permitió innovar la formulación original del dulce de leche tipo gloria y a su vez, desarrollar la formulación propia, que conllevo a obtener un producto de calidad, con las características ya mencionadas.

En la tabla 16 se enlistan las técnicas y métodos utilizados para el análisis químico proximal:

Tabla 16. Técnicas oficiales del AQP realizado al dulce de leche.

Parámetro	Método	Referencia
Humedad	Determinación de humedad por el Método de Estufa	NMX-F-083-1986. ALIMENTOS. Determinación de humedad en Productos Alimenticios. Foods. Moisture in food products determination.
Grasa	Determinación de grasa por el Método de Röese-Gottlieb (Hidrólisis alcalina)	NOM-F-512-1988. Alimentos. Determinación de grasa en leche reconstituida. Método Röese-Gottlieb.
Carbohidratos	Determinación de Carbohidratos Totales	NOM-155-SCFI-2003, Leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado-Denominaciones, especificaciones fisicoquímicas, información comercial y métodos de prueba,
Proteínas	Determinación de Proteínas por micro Kjeldahl	NOM-155-SCFI-2003, Leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado-Denominaciones, especificaciones fisicoquímicas, información comercial y métodos de prueba.
Cenizas	Determinación de Cenizas	NMX-F-066-S-1978.Determinación de Cenizas en Alimentos. Foodstuff Determination of Ashes. Normas Mexicanas. Dirección General de Normas.
Fibra	Determinación de fibra por Fibra Dietética total. (Método enzimático – gravimétrico)	Total Dietary Fiber Assay Kit/ Kit de Ensayo de Fibra Dietética (Manual)

En el Anexo 2 se muestra la descripción de cada una de éstas técnicas utilizadas para la determinación del AQP.

- **Grasa (Método de Röese Gottlieb)**

El método descrito es una modificación al de Röese-Gottlieb. Se utiliza amoníaco 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 peso⁶².

- **Fibra Dietética total**

Muestras en duplicado de alimentos secos y desgrasados son gelatinizadas con α -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.

3.6 Análisis Microbiológico

3.6.1 Materias Primas (Leche y nuez)

Cualquier materia prima antes de ser introducida a un proceso de transformación, debe ser analizada microbiológicamente para evaluar su calidad e inocuidad, con el fin de evitar una posible contaminación cruzada si es que éstas contienen un conteo microbiano inicial alto, o fuera de parámetros establecidos.

Los grupos microbianos más estudiados en la industria alimenticia, son los que están relacionados con la higiene del producto, como son Coliformes totales, Coliformes fecales, *Salmonella*, *S. aureus*, mohos, levaduras y mesófilos aerobios.

Un análisis microbiológico completo de estos géneros microbianos permite emitir un análisis relacionado a la inocuidad de los alimentos. Cuando se realiza un análisis de éste tipo no es suficiente cuantificar un solo género bacteriano, ya que no permite emitir un reporte confiable, por ejemplo un conteo alto en mesófilos aerobios, no necesariamente indica que el alimento sea de mala calidad, es por ello que se recurre a cuantificar varios géneros microbianos que en conjunto permitan hacer un análisis completo y veraz sobre su calidad microbiológica.

A continuación en la Tabla 17 se enlistan las pruebas microbiológicas realizadas a las materias primas, leche y nuez.

Tabla 17. Pruebas microbiológicas realizadas a leche y Nuez.

	Microorganismo	Referencia
Leche	Coliformes totales	NOM-113-SSA1-1994
	Coliformes fecales (<i>E. coli</i>)	NOM-112-SSA1-1994
	<i>Salmonella spp.</i>	NOM-114-SSA1-1994
	<i>Staphylococcus aureus</i>	NOM-115-SSA1-1994
Nuez	Mesófilos aerobios	NOM-092-SSA1-1994
	Coliformes totales	NOM-113-SSA1-1994
	Coliformes fecales (<i>E. coli</i>)	NOM-112-SSA1-1994
	<i>Staphylococcus aureus</i>	NOM-115-SSA1-1994
	<i>Salmonella spp.</i>	NOM-114-SSA1-1994
	Mohos y Levaduras	NOM-243-SSA1-2010 NOM-111-SSA1-1994

- **Coliformes totales en placa**

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 horas, dando como resultado la producción de gas y ácidos orgánicos, los cuales viran el indicador de pH y precipitan las sales biliares⁶³.

- **Coliformes fecales (*E. coli*)**

Se basa en la dilución de la muestra en tubos múltiples, de tal forma que todos los tubos de la menor dilución sean positivos y todos los tubos de la dilución más alta sean negativos. El resultado positivo se demuestra por la presencia de gas o crecimiento microbiano. Se basa en que las bacterias Coliformes, fermentan la lactosa incubadas a 35 ± 1°C durante 24 a 48 horas, resultando una producción de ácidos y gas el cual se manifiesta en las campanas de fermentación⁶⁴.

- ***Salmonella spp.***

La técnica para determinación de *Salmonella spp.* Consiste de 3 pasos básicos: pre enriquecimiento, enriquecimiento selectivo y selección en medios sólidos⁶⁵.

Los alimentos suelen contener cantidades muy pequeñas de patógenos, si es que tienen alguno, la detección del patógeno en muestras alimentarias precisa de un enriquecimiento para aumentar el número de *salmonellas* antes de proceder a su aislamiento e identificación.

Además, las *salmonellas* presentes en un alimento suelen estar dañadas como consecuencia de los procesos a que se someten los productos alimenticios, o las condiciones en que se almacenan⁶⁵. La NOM-243-SSA1-2010, exige que *Salmonella spp.*, deba estar ausente en 25 ml de leche, dado su nivel de riesgo para la salud del consumidor.

- ***Staphylococcus aureus***

Este método permite hacer una estimación del contenido de *S. 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 esperan más de 100 células de *S. aureus* por gramo⁶⁶.

El crecimiento de *S. aureus* en alimentos tiene una gran importancia por tratarse de un microorganismo capaz de producir una poderosa enterotoxina que al ingerirse causa intoxicaciones alimentarias⁶⁶.

- **Mesófilos aerobios**

La cuenta de bacterias mesofílicas no pretende identificar alguna especie o género bacteriano en específico, solo identifica el contenido de microorganismos viables en un alimento. Lo que refleja la calidad y/o el manejo sanitario del alimento⁶⁷.

- **Mohos y levaduras**

Los mohos y levaduras están ampliamente distribuidos en la naturaleza y se pueden encontrar formando parte de la flora normal de un alimento, como agentes contaminantes y en los equipos sanitizados inadecuadamente, provocando deterioro fisicoquímico de éstos, debido a la utilización en

su metabolismo de los carbohidratos, ácidos orgánicos, proteínas y lípidos originando mal olor, alterando el sabor y el color en la superficie de los productos contaminados⁶⁸.

3.6.2 Dulce de Leche Tipo Gloria

De igual forma que como se hizo con las materias primas (leche y nuez), se debe asegurar la calidad microbiológica del producto final durante su elaboración y previo al empaque, se debe asegurar que el producto sea inocuo para el consumidor final.

La norma oficial mexicana NOM – 243 – SSA1 - 2010 exige que se determine Coliformes totales, *Salmonella spp.*, y *Staphylococcus aureus* a cualquier tipo de dulce a base de leche.

Durante el proceso de elaboración del dulce de leche se alcanzan temperaturas superiores a los 85°C, temperatura suficiente para eliminar a la mayoría de la carga microbiana que pudiera llegar a contener el dulce de leche, sin embargo esto no lo hace exento de una contaminación post – proceso, es por esta razón que, justo antes de ser empacado se tomaron las muestras para realizarles el y los análisis microbiológicos pertinentes.

En la Tabla 18 se muestran las pruebas utilizadas para el análisis microbiológico:

Tabla 18. Pruebas microbiológicas realizadas al dulce de leche tipo gloria.

Microorganismo	Norma de referencia
Coliformes totales	NOM-243-SSA1-2010
<i>Salmonella spp</i>	NOM-243-SSA1-2010
<i>Staphylococcus aureus</i>	NOM-243-SSA-2010

La metodología de cada una de las pruebas microbiológicas realizadas, se encuentra descrita ampliamente en el Anexo 3.

3.7 Análisis Sensorial

3.7.1 Prueba de Intervalos

El panel de consumidores estuvo integrado por un total de 25 personas de las cuales 15 son mujeres y 10 hombres.

Para esta prueba se les proporcionaron 3 muestras distintas de dulce de leche (Tabla 18), identificadas con la clave 252, 551 y 151 cada una corresponde a concentraciones de café y Stevia distintas.

- Muestra (252): Café (1.78 %); Stevia (0.05 %)
- Muestra (551): Café (1.0 %); Stevia (0.025%)
- Muestra (151): Café (0.5 %); Stevia (0.01%)

En conjunto con los demás aditivos e ingredientes que componen la formulación final del dulce de leche, permiten evaluar 4 características que se consideran primordiales en un dulce de leche tipo gloria, que podrían determinar el éxito o el fracaso del dulce de leche en el mercado, dichas propiedades son pegajosidad, sabor, dulzor y cremosidad, estos son los principales parámetros de calidad en cuanto a sus propiedades organolépticas se refiere.

Tabla 19. Formulaciones del Dulce de Leche Tipo Gloria Funcional

Ingrediente	Formulación (%)		
	252	551	151
Leche	53.28	53.28	53.28
Fructosa	26.59	26.59	26.59
Glucosa	2.59	2.59	2.59
Bicarbonato de sodio	0.11	0.11	0.11
Nuez	6.70	6.70	6.70
Inulina	0.50	0.50	0.50
Café	1.78	1.00	0.50
Agua	8.40	9.20	9.72
Stevia	0.05	0.025	0.01

En la Tabla 19 se muestran las formulaciones del dulce de leche tipo gloria funcional, mediante éste análisis sensorial se eligió la formulación que cuenta con los mejores parámetros sensoriales de acuerdo a la percepción del jurado.

Se debe destacar que en ninguna de las 3 diferentes formulaciones se redujo el porcentaje de fructosa, ya que el dulce funcional no es un alimentos reducido en su contenido de carbohidratos totales, únicamente es un producto sin azúcar comercial (Sacarosa).

Los datos obtenidos de la prueba sensorial se sometieron a un análisis estadístico para que dichos resultados se consideraran válidos, lo que en con secuencia, indicaría que la experimentación se realizó de forma correcta. De lo contrario se tendría que ponderar las formulaciones nuevamente hasta obtener valores estadísticamente aceptables.

A continuación se presenta el formato que se entregó al jurado para la realización de ésta prueba sensorial.

Nombre: _____ Sexo: _____ Fecha: _____

INSTRUCCIONES: Frente a usted, tiene 3 muestras. Primero pruebe la de su izquierda. Seguido pruebe una de las galletas salada que se le proporcionó, inmediatamente después enjuague su boca con agua hasta que no perciba ningún sabor en su boca. En la parte inferior, usted tiene una escala de 0 a 10. Asigne un valor conforme a su percepción de cada una de las características. Repita este procedimiento para las 2 muestras restantes.

	Muestra:	252	551	151
	Dulzor	_____	_____	_____
	Cremosidad	_____	_____	_____
	Pegajosidad	_____	_____	_____
	Sabor	_____	_____	_____

0 2 4 6 8 10

No perceptible Apenas perceptible Ligeramente perceptible Moderadamente perceptible Demasiado Extremadamente

De acuerdo a su percepción, cuál de las 3 muestras considera que es su preferida: _____

Observaciones:

Figura 6. Formato utilizado en la Prueba de Intervalos

3.7.2 Prueba Hedónica

Se realizó una prueba de aceptación o rechazo del dulce de leche, para ello se utilizó una escala hedónica. El objetivo de este tipo de prueba es localizar el nivel de agrado o desagrado que provoca una muestra específica⁶⁹.

En esta prueba se buscó evaluar la aceptación del dulce de leche funcional por parte de los consumidores, ya que fue necesario determinar si el producto, en caso de ser introducido al mercado de consumo tendría éxito comercial.

En la Tabla 20 se muestra la formulación del dulce de leche utilizado para la realización de ésta prueba.

Tabla 20. Formulación final del Dulce de Leche Tipo Gloria Funcional

Ingrediente	Formulación
	252
Leche	53.28
Fructosa	26.59
Glucosa	2.59
Bicarbonato de sodio	0.11
Nuez	6.70
Inulina	0.50
Café	1.78
Agua	8.40
Stevia	0.05

Se muestra el formato utilizado en ésta prueba hedónica:

Nombre _____ Fecha _____

Sexo _____ Edad _____

Frente a usted se encuentra una muestra de dulce de leche tipo gloria sabor café, pruébela. En la escala seleccione la opción que mejor describa su percepción de este producto.

Escala	Muestra
Me gustaría muchísimo comprarlo	
Me gustaría mucho comprarlo	
Me gustaría comprarlo	
Me es indiferente comprarlo	
Me disgustaría comprarlo	
Me disgustaría mucho comprarlo	
Me disgustaría muchísimo comprarlo	

COMENTARIOS:

Figura 7. Formato utilizado en la Prueba Hedónica

3.8 Funcionalidad de la Inulina

La funcionalidad de la inulina como prebiótico está más que comprobada, se han realizado experimentos en los cuales se ha demostrado su acción prebiótica en leche y diversos productos lácteos como son quesos, yogurts, bebidas de leche saborizadas^{16, 21}. Sin embargo no hay datos científicos validos que indiquen o que asocien esta propiedad de la inulina, en productos, que en su proceso de elaboración, no se sometan a un proceso de fermentación y/o acidificación, como es el caso del producto elaborado en este proyecto.

Presuponiendo lo descrito anteriormente, originalmente, se planteó realizar esta prueba al no obtener información confiable relacionada a dulces de leche, por lo que se decidió realizar esta prueba, principalmente para observar la funcionalidad prebiótica de la inulina en un producto lácteo que no se fermenta ni se acidifica y con una composición química y fisicoquímica muy diferente a los productos en los que normalmente se suele utilizar la inulina de agave.

Para comprobar la funcionalidad de la inulina, se aislaron 2 muestras de dulce de leche funcional, a una muestra del dulce se le añadió inulina en su composición química y se inoculó con el microorganismo *Lactobacillus paracasei subsp. Paracasei*, comúnmente llamado *Lactobacillus casei*, la otra muestra del dulce de leche funcional, únicamente fue inoculada con *Lactobacillus paracasei subsp. Paracasei*, sin adicionarle inulina.

De acuerdo a Fuller (1989), para que una leche fermentada pueda considerarse como alimento probiótico, este debe de tener un conteo final mínimo de 10^6 UFC/g o ml, otros autores como Cagigas, A. y Blanco (2002), también señalan el mismo valor mínimo de 10^6 UFC/g o ml. Para el caso de Yogurt, los mismos autores señalan valores en el rango de 10^6 a 10^8 UFC/g o ml como valores mínimos para considerarse como probiótico, el CODEX STAN 243-2003, también indica este rango como valor mínimo para que un alimento pueda considerarse como probiótico. La normatividad vigente en México (NOM-181-SCFI-2010) indica que un yogurt debe contener al menos 10^7 UFC/g viables de cultivos lácticos, cuando se utilicé *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus delbreckii subsp., bulgaricus*, por el contrario si se utilizan cultivos lácticos distintos en el alimentos, estos deben tener como mínimo 10^6 UFC/g. viables no contar con información suficiente respecto a dulces de leche, se tomó como mínimo el valor de 10^6 UFC/ g o ml, como el valor mínimo para que se considere la acción probiótica en el dulce de leche.

Partiendo de la hipótesis de que ambas muestras de dulce de leche (tanto el inoculado con *Lactobacillus casei* y adicionado con inulina, así como el dulce de leche, que únicamente se le adiciona el probiótico *Lactobacillus casei*) las colonias de *Lactobacillus casei* se desarrollaran en el dulce de leche durante un periodo de tiempo no establecido, sin embargo el desarrollo de estas colonias se vería favorecido en la muestra de dulce de leche que incluye inulina en su composición química, con estas hipótesis establecidas se realizó la prueba de funcionalidad.

Para la inoculación de las muestras de estudio se siguió la metodología establecida en la NOM-092-SSA1-1994, sin embargo el microorganismo *Lactobacillus casei* desarrolla su crecimiento a una temperatura optima de 32-35°C y en condiciones de anaerobiosis, esta se da a las 72 horas de haber sido inoculadas las muestras de estudio, pero se aprecia mejor una vez transcurridas 96 horas después de la inoculación.

Se estableció un periodo de 32 días para el desarrollo de esta prueba, pues en ese lapso de tiempo se encuentran la mayoría de los estudios asociados al crecimiento de microorganismos probióticos. Durante este lapso, cada 4 días se realizó la lectura y la siembra de las 2 muestras de estudio.

Para esta prueba se elaboraron 135 g de cada tipo de dulce de leche, estas muestras se almacenaron en frascos de vidrio estériles en porciones de 15 g, en total se almacenaron 9 frascos de cada tipo de dulce de leche.

Tabla 21. Frecuencia de siembra y recuento de *Lactobacillus casei*.

Muestras de estudio	0	4	8	12	16	20	24	28	32
Dulce adicionado con inulina e inoculado con <i>Lactobacillus casei</i>	•	•	•	•	•	•	•	•	•
Dulce inoculado con <i>Lactobacillus casei</i>	•	•	•	•	•	•	•	•	•

La tabla 21 muestra las 2 muestras de estudio y los días requeridos para realizar esta prueba, así mismo el número de días también indica la frecuencia con la que se hicieron los análisis microbiológicos y la lectura de los mismos, es decir en el día cero, que es cuando se inocularon las muestras de estudio con el probiótico *Lactobacillus casei* y la siembra de estas muestras, una vez transcurrido el tiempo de incubación del probiótico.

Transcurridos 4 días se realizó la lectura de las siembras realizadas en el día cero y se realizó la siembra de las muestras del día 4, al octavo día se realizó la lectura de las siembras realizadas en el día 4 y ese mismo día, se realizó la siembra de las muestras del día 8, se siguió este procedimiento hasta llegar a los 32 días, que es el límite de esta prueba.

Para un mejor entendimiento de esta prueba se puede consultar la metodología de la misma descrita en el Anexo 3.

En esta prueba no se pretende evaluar la estabilidad del microorganismo probiótico, ni los cambios de pH y/o acidez del dulce de leche conforme avanza el tiempo de almacenamiento del mismo, ni tampoco se pretendió evaluar si es viable adicionar cultivos probióticos a un dulce de leche, por lo que no se evaluó ninguna de las características ya descritas. Esta prueba únicamente va dirigida a determinar la viabilidad de la inulina como prebiótico para el caso de un dulce de leche.

CAPITULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Antes de iniciar el proceso de elaboración o cualquier proceso de transformación de materia prima a producto intermedio, semi terminado o terminado, se debe validar la calidad de dichas materias primas, tanto fisicoquímica, química como microbiológicamente.

Se realizó el estudio de la leche y la nuez en éstos parámetros, para asegurar su calidad e inocuidad, para saber si son aptas para su utilización.

En éste trabajo se determinó la calidad de la leche en base a las pruebas de andén (Acidez. pH, Alcohol, Densidad y Azul de metileno), posterior a ello se realizó el análisis químico proximal a la leche (Humedad, Grasa, Carbohidratos totales, Proteínas y Cenizas) y nuez (Humedad); con estos valores se determinó si la leche cumplía con los requisitos para ser transformada en un dulce de leche con las características descritas en el tema de éste trabajo.

A su vez se realizó el análisis microbiológico correspondiente para garantizar la calidad de las materias primas en cuanto a su microbiota.

Una vez que se validó la calidad e inocuidad de leche y nuez, en base a los resultados obtenidos de éstas pruebas. Para la obtención de la formulación final del dulce de leche, se realizó una prueba sensorial de intervalos.

Es importante aclarar una vez más que se realizaron dos tipos de dulce de leche tipo gloria, el primero incluye sacarosa, leche entera e inulina en su formulación y el segundo se sustituyó en su totalidad la sacarosa por fructosa e incluye leche deslactosada, descremada e inulina.

A su vez, cuando se obtuvo el dulce de leche tipo gloria se le determinó su composición química mediante un AQP (Humedad, Grasa, Carbohidratos totales, Proteína, Cenizas y Fibra dietética) y se evaluó su inocuidad mediante pruebas microbiológicas (Coliformes totales, *S. aureus*, *Salmonella spp.*).

Se realizó una prueba de funcionalidad de la inulina (funge como prebiótico) para evaluar su propiedad prebiótica en un dulce de leche.

4.1 Pruebas de Andén

4.1.1 Acidez

En la Tabla 22 se muestran los resultados experimentales de la acidez de la leche bronca:

Tabla 22. Resultados experimentales de acidez para la leche.

Desviación estándar	Coefficiente de variación	Dato experimental (g/L)	Dato teórico (g/L)
1.14	0.32	1.6	1.3-1.7

Fuente: NOM-155-SCFI-2003, Leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado-Denominaciones, especificaciones fisicoquímicas, información comercial y métodos de prueba, www.ordenjuridico.gob.mx/Publicaciones/CDs2007/CDAgropecuaria/pdf/83NOM.pdf 13 de Septiembre de 2013. Pp. 11.

Como se observa en la Tabla 22, la acidez de la leche se encuentra dentro de los límites establecidos por la NOM-155-SCFI-2003, para una leche de buena calidad. La leche generalmente tiene una acidez de 1.3 a 1.7 g/l expresada en ácido láctico. La acidez normal de la leche se debe principalmente a su contenido de caseína (0.05 - 0.08%) y de fosfatos. También contribuyen a la acidez el dióxido de carbono (0.01 - 0.02%), los citratos (0.01%) y la albúmina (menos de 0.001%)⁴. Por lo tanto, se puede decir que el nivel de acidez que contiene la leche es normal; ya que el coeficiente de variación (Cv) es menor a 1, lo que nos dice que los resultados experimentales obtenidos son confiables, y que ésta es apta para ser utilizada como materia prima.

4.1.2 pH

En la Tabla 23, se pueden observar los resultados experimentales de pH de la leche bronca:

Tabla 23. Resultados experimentales de pH en la leche de vaca.

No. muestra	Resultado experimental	Promedio	Desviación estándar	Coefficiente de variación	Dato teórico
1	6.28	6.42	0.12	0.02	6.6-6.8
2	6.60				
3	6.37				

Fuente: <http://www.quiminet.com/articulos/las-bases-de-la-potenciometria-28370.htm> , 13 de Septiembre de 2013.

Como se puede observar en la Tabla 23, el pH de la leche es un poco bajo en comparación a lo que indica la teoría, ya que el pH de la leche está en promedio entre 6.6 y 6.8 a 20 °C. Las leches pueden tener el mismo grado de acidez y por lo tanto la misma estabilidad en los tratamientos industriales y tener el mismo grado de "frescura" y sin embargo, presentar diferente pH y

viceversa⁴. Aunque se encuentre una diferencia entre estos parámetros, la leche aun así, es fresca; por lo cual es apta para ser utilizada como materia prima, ya que el coeficiente de variación es menor a uno los datos son confiables.

4.1.3 Alcohol

En la Tabla 24, se muestran los datos experimentales de la prueba de alcohol aplicada a la leche bronca:

Tabla 24. Resultados experimentales de la prueba de alcohol.

No. muestra	Resultado	Dato teórico
1	Sin formación de grumos (Negativa)	Negativa
2		
3		

Fuente: PROY-NMX-F-700-COFOCALEC-2012, Sistema producto leche - Alimento – Lácteo – Leche cruda de vaca – Especificaciones fisicoquímicas, sanitarias y métodos de prueba. (Prueba de alcohol), <http://www.canilec.org.mx/Circulares%202012/93del12/PROY-NMX-F-700-COFOCALEC-2012%20110212.pdf>, 18 de Septiembre de 2013. pp. 10.

La prueba de alcohol resultó ser negativa en todas las repeticiones, tal como lo pide el PROY-NMX-F-700-COFOCALEC-2012. Esto demuestra que la leche que se analizó es de buena calidad, lo que sugiere que la leche al ser sometida a procesos térmicos, los tolerará y ésta no floculará; por lo que se puede decir que la leche es térmicamente estable y es apta para ser utilizada como materia prima.

4.1.4 Densidad

A continuación en la Tabla 25 se muestra los resultados experimentales de densidad de la leche bronca de vaca:

Tabla 25. Valores experimentales de densidad en la leche de vaca.

No. muestra	Valor lactodensímetro	Densidad real (g/ml)	T (°C)	Promedio (g/ml)	Desviación estándar	Coefficiente de variación	Dato teórico (g/ml)
1	25	1.0258	19	1.0255	0.0002	0.0003	1.0295 mín. (a 15°C)
2	24.5	1.0257	21				
3	24	1.0252	21				

Fuente: NMX-F-424-S-1982, Productos Alimenticios para uso humano. Determinación de la densidad en leche fluida. Food products for human use. Determination of the density in fluid milk. <http://www.colpos.mx/bancodenormas/nmexicanas/NMX-F-424-S-1982.PDF>, 18 de Septiembre de 2013, pp. 1, 2.

Como muestra la Tabla 25, la densidad de la leche es un poco baja a comparación de lo que marca la NMX-F-424-S-1982, esto se debe al contenido graso que tiene la leche, pero eso se puede

respaldar con el resultado de porcentaje graso (ver pág. 91); ya que la densidad de la leche, de una especie de vaca determinada, no es un valor constante sino que varía con la temperatura y depende de dos factores: de la concentración de elementos disueltos y en suspensión (la densidad aumenta cuando el contenido de sólidos aumenta) y de la cantidad de grasa (la densidad disminuye cuando el contenido de grasa aumenta), es decir: la leche descremada tiene mayor densidad, mientras que la adición de agua a la leche hace que la densidad disminuya⁴. Es decir, la densidad de las leches es variable y los valores medios pueden estar entre 1.030 y 1.033 g/ml a 20 °C para la leche de vaca⁴; otros factores que afectan la densidad de la leche, son la genética, el medio ambiente, etapa de lactancia, época del año, edad, alimentación de la vaca⁴; por todo esto, se puede decir que la leche es apta para ser utilizada como materia prima; así como el análisis estadístico aplicado a los resultados obtenidos, nos muestra que los datos son confiables. Se reporta el dato teórico a 15°C, ya que así lo indica la NMX-F-424-S-1982, a temperaturas mayores o menores a 15°C se deben sumar o restar 0.0002 al valor obtenido de densidad, respectivamente.

4.1.5 Azúl de metileno o reductasas microbianas

En la Tabla 26 se muestran los resultados experimentales de la prueba de azul de metileno realizada a la leche bronca:

Tabla 26. Resultados experimentales de la prueba de azúl de metileno.

No. de muestra	Resultado a las 2 horas	Resultado a las 4 horas	Resultado a las 5 horas	Resultado final (Calidad de la leche)
1	Tinción	Tinción	Tinción	Buena
2				
3				

La leche cumple con los estándares de calidad marcados en PROY-NMX-F-700-COFOCALEC-2012, al mantener la tinción azul por más de 5 horas, lo que significa que se tienen un estimado de 100 000 a 200 000 bacterias por mililitro de leche⁵⁵. La velocidad en que se produce la decoloración es directamente proporcional a la cantidad de microorganismos presentes en la leche de vaca, por lo que a mayor cantidad de bacterias la decoloración será más rápida, esta decoloración se produce porque los microorganismos tienen la capacidad de reducir el potencial oxidado – reducción de la leche, que a su vez transforma el azul de metileno en su derivado incoloro.

Con base en este análisis es válido asegurar que la leche se encuentra en condiciones de ser procesada para la elaboración del dulce de leche. La leche se mantuvo dentro de los estándares en cada una de las distintas pruebas de andén realizadas a la leche de vaca, la leche cumple con las características de calidad necesarias para que esta pueda ser acondicionada antes de su subsecuente procesamiento.

4.2 Acondicionamiento de la leche de vaca

La leche bronca debe someterse a un proceso de acondicionamiento, antes de ser procesada y utilizada en la elaboración del dulce de leche tipo gloria, principalmente para asegurar su calidad como materia prima y para ajustarla en su contenido graso y de lactosa, con el fin de brindarle al dulce de leche las características deseadas. En el Diagrama 8 se muestra el proceso de acondicionamiento realizado a la leche de vaca.

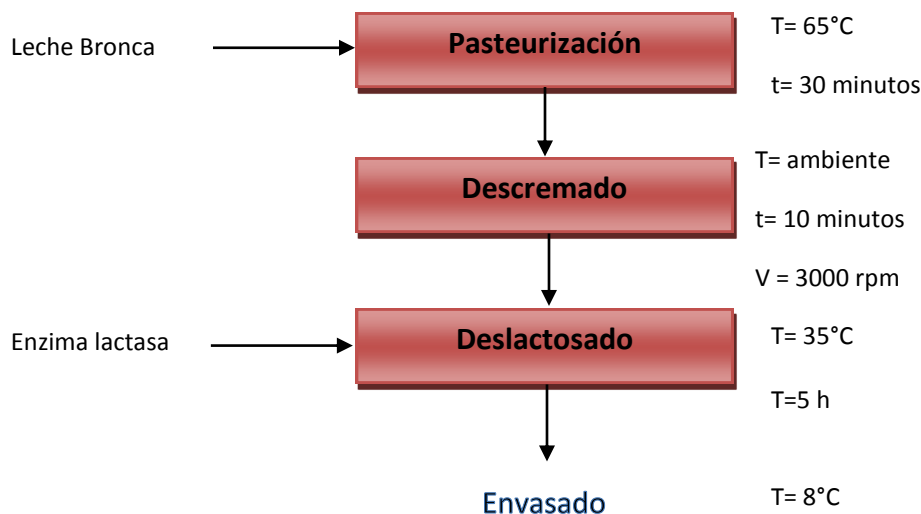


Diagrama 8. Proceso de acondicionamiento de la leche de vaca.

4.2.1 Descripción del diagrama de acondicionamiento de leche

Cada una de las operaciones unitarias (pasteurización, deslactosado y descremado) son pasos fundamentales a los que se somete la leche antes de ser procesada, aunque esto depende del tipo de producto al cual va destinado su uso, ya que no todos los lácteos en el mercado son deslactosados o descremados. A continuación se describe el proceso de acondicionamiento de la leche de vaca.

- **Pasteurización**

Para este proyecto se estableció una temperatura de 65°C durante 30 minutos, para una pasteurización lenta, inmediatamente después de este tratamiento térmico se realiza el choque térmico disminuyendo su temperatura hasta 5°C.

- **Descremado**

Esta operación tiene como objetivo separar parcialmente o totalmente el contenido de materia grasa de la leche. Para lograr un descremado óptimo la leche debe estar a una temperatura entre 30 y 35 °C⁷. Se realizó el descremado a una velocidad de giro de 3000 rpm durante 10 minutos, mediante este proceso se logra reducir el contenido graso de la leche hasta en un 48.5%.

Tabla 27. Contenido de lípidos de la leche después del proceso de centrifugación.

Velocidad de giro (r.p.m.)	Tiempo (min)	Grasa (g/L)
3000	10	2.2
2500	10	2.8
2200	10	3.1

La relación de velocidad de giro de 3000 r.p.m. y tiempo de 10 minutos, es la que arroja el dato más apropiado (Tabla 27), se logró reducir el contenido de lípidos de leche de 4.56 g/l a 2.2 g/l. A estas condiciones se reduce hasta un 48.53% el contenido graso de leche. Se optó por elegir estas condiciones como las óptimas, si bien a la velocidad de giro de 2500 r.p.m. y 10 minutos se obtiene un valor por debajo de 3 g de grasa por litro.

Debido a que se buscó obtener un producto reducido en grasa; se eligió la correlación entre tiempo y velocidad de giro que proporcionó un descremado más eficiente.

- **Deslactosado**

En el deslactosado se realiza la hidrólisis parcial de la lactosa contenida en la leche, separándola en glucosa y galactosa, mediante la adición de la enzima lactasa⁴¹. Para ello la leche se mantuvo la leche a una temperatura constante de 35°C y una vez agregada la enzima a la leche, se mantuvo la leche a esta temperatura durante 5 horas.

No se evaluó el nivel de lactosa residual que queda tras el proceso de deslactosado, por lo que se considera, que tomando en cuenta estas condiciones de trabajo, se logró una hidrólisis del 85% de la lactosa, tal y como lo marcan Antonieta Rodriguez, Cravero, & Alonso, 2008 y Repelius, C, (2001), en sus estudios experimentales donde también reportan este valor de hidrólisis de lactosa.

- **Envasado**

Inmediatamente después de la segunda pasteurización la leche se sometió a un choque térmico, en el cual se disminuyó su temperatura hasta 8°C, posteriormente se envasó en condiciones asépticas en recipientes estériles. Y se almacenó en refrigeración a 5°C, hasta su posterior uso.

4.3 Análisis Químico Proximal de Materias Primas (Leche y Nuez)

4.3.1 Leche

En la Tabla 28 se muestran los resultados experimentales del AQP realizado a la leche de vaca:

Tabla 28. Resultados experimentales del AQP de leche.

	No. muestra	Porcentaje	Promedio (%)	Desviación estándar	Coefficiente de variación	Dato teórico (%)
Humedad	1	86	86.43	0.33	0.0038	85.4-87.7
	2	86.5				
	3	86.8				
Grasa	1	4.6	4.53	0.09	0.02	3.4-5.1
	2	4.4				
	3	4.6				
Carbohidratos totales	1	5.28	5.30	0.03	0.0056	4.9-5.0
	2	5.34				
	3	5.27				
Proteínas	1	2.74	2.77	0.03	0.01	3.3-3.9
	2	2.81				
	3	2.75				
Cenizas	1	1.00	0.94	0.85	0.90	0.68-0.74
	2	1.00				
	3	0.82				

*Fuente: Fennema Owen R. (2000). *Química de los alimentos*. 2ª. Ed. Acribia, Zaragoza, España, pp. 1000

Como se observa en la tabla 28, el porcentaje de humedad en la leche analizada y el dato teórico indicado en la bibliografía, son muy similares y no se encuentra una diferencia significativa entre ellos, así que se puede decir que el porcentaje de humedad es aceptable y el análisis estadístico confirma esto, al ser el coeficiente de variación menor de 1, lo que quiere decir que los datos obtenidos son confiables. Es bien sabido que la composición química de la leche depende de varios factores como la raza, época del año, edad del animal, alimentación, etc. por lo que la leche obtenida de un mismo animal es muy probable que varíe en las distintas estaciones del año, y esto no necesariamente indica que la leche sea de mala calidad, el contenido de humedad también se puede asociar a adulteraciones con agua.

El porcentaje de contenido graso encontrado en la leche analizada entra en el límite que maneja la bibliografía, es por esto que se observó que la densidad de la leche era menor, a comparación del dato teórico, a que es un parámetro que depende de la relación agua-grasa. También es importante recordar que el contenido graso depende de muchos factores, como la raza de la vaca, la edad de esta, estación del año, temperatura y alimentación. El alto contenido graso en esta leche no afecta al producto a realizar, ya que la leche pasará por un proceso de descremado. Y ya que el coeficiente de variación es menor a 1, los resultados experimentales obtenidos son confiables, y se puede mencionar que la leche es apta para ser utilizada como materia prima.

El porcentaje de carbohidratos encontrado en la leche analizada es un poco alto a comparación al dato teórico, ya que en esta prueba no solo se cuantificó la lactosa, sino los carbohidratos totales

(lactosa y glucosa) contenidos en la muestra de leche y el dato teórico solo maneja la cantidad de lactosa contenida en una muestra de leche, esto fue posible al hacer unas corridas con el procedimiento normal, y otras corridas realizando una hidrólisis ácida (como se muestra en la técnica utilizada en el anexo 1.

El conocer el contenido de carbohidratos contenidos en la leche, es muy importante para determinar si la leche puede ser utilizada como materia prima, ya que marca un margen del poder edulcorante que tiene la leche, para poder determinar más adelante la cantidad de azúcar añadida y edulcorante para obtener el producto deseado, y para evaluar si llega a afectar el sabor del producto final; pero ya que la diferencia de carbohidratos contenido en la leche con la cual se trabajó y el dato teórico no es significativa, ésta leche es apta para ser utilizada como materia prima.

El porcentaje de proteína encontrado en la leche analizada se encuentra debajo de los límites teóricos, pero como se ha dicho antes la composición química de la leche varía, como el resultado experimental de grasa, es alto, cabe esperar una reducción de concentración de los demás componentes de la leche, entonces se puede concluir que se tiene un buen contenido proteínico en la leche, además el análisis estadístico aplicado a los datos obtenidos, demuestra que los datos obtenidos son confiables; por lo tanto se puede mencionar que es una leche apta para utilizarse en la realización del producto.

Como se puede observar en la tabla 28, el porcentaje de cenizas se encuentra arriba del límite que maneja la bibliografía, aunque si hay variación entre cada muestra analizada, esta variación no es significativa, pues se encuentra dentro del límite de nivel de confianza, así que se puede decir que es una leche que cumple con los estándares de calidad en lo que respecta al contenido mineral y que los resultados obtenidos son confiables estadísticamente.

Por lo tanto se puede decir que la leche en términos generales cumplió con los estándares de calidad y requerimientos nutricionales establecidos por la Normatividad Mexicana, para su utilización como materia prima en la elaboración del dulce de leche tipo gloria. Considerando los resultados obtenidos de ésta materia prima, se puede mencionar que no se encuentra adulterada y que es térmicamente estable, para las condiciones de temperatura requeridas en el diagrama de proceso del dulce de leche.

Por otra parte, el saber el contenido inicial de lípidos en la leche, permitió establecer las condiciones a las cuales se llevó a cabo el proceso de descremado de la leche; esto con el fin de obtener un producto reducido en su contenido graso.

4.3.2 Nuez

En la Tabla 29 se muestran los resultados experimentales obtenidos de la humedad contenida en la nuez:

Tabla 29. Resultados experimentales de humedad de la nuez por el método de estufa.

No. muestra	Porcentaje de humedad	Promedio (%)	Desviación estándar	Coefficiente de variación	Dato teórico (%)
1	3.87	2.85	0.73	0.26	> 6
2	2.23				
3	2.45				

Fuente: NMX-FF-084-SCFI-2009. PRODUCTOS ALIMENTICIOS NO INDUSTRIALIZADOS PARA CONSUMO HUMANO – FRUTO FRESCO – NUEZ PECANERA *Carya illinoensis* (Wangenh) K. Koch ESPECIFICACIONES Y MÉTODOS DE PRUEBA, dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5108225&fecha=04/09/2009, 15 de Octubre de 2013, pp. 13.

A la nuez únicamente se le determinó el contenido de humedad, ya que así lo indica la NMX-FF-084-SCFI-2009. Como se puede observar en la tabla 29, el porcentaje de humedad determinado en la nuez se encuentra dentro del límite del dato teórico indicado en la NMX-FF-084-SCFI-2009, así que se puede corroborar que el porcentaje de humedad es aceptable y que la nuez es de buena calidad, y por ende es apto para utilizarse como materia prima.

4.4 Análisis Microbiológico de Materias Primas (Leche y Nuez)

Se realizaron las mismas pruebas para las 2 materia primas, adicionalmente se determinó Mohos y levaduras en la nuez, pues así lo indica la Norma Mexicana NMX-FF-093-SCFI-2011.

En las tablas 30 y 31 se muestran los resultados de las distintas pruebas microbiológicas realizadas a las 2 materias primas, leche y nuez, respectivamente. Todas las pruebas se realizaron en condiciones estériles. Para eliminar y/o minimizar cualquier error o contaminación cruzada que pudiera conllevar a resultados no confiables y un análisis erróneo de los resultados obtenidos.

4.4.1 Leche

Tabla 30. Resultados de pruebas microbiológicas realizadas a la leche de vaca.

Microorganismo	Resultado (UFC/g)	Límite permitido (UFC/g)	Referencia
Coliformes totales	< 20	< 20	NOM – 113 – SSA1 - 1994
Coliformes fecales	< 10	< 10	NOM – 112 – SSA1 – 1994
<i>Salmonella spp.</i>	Ausente	Ausente	NOM – 114 – SSA1 – 1994
<i>Staphylococcus aureus</i>	< 10	< 10	NOM – 115 – SSA1 - 1994

4.4.1.1 Coliformes totales en placa

En la tabla 30 se muestran los resultados correspondientes a la leche. Para la prueba de Coliformes totales se muestra que el resultado de la prueba se encuentra dentro de los límites establecidos en la NOM-243-SSA1-2010. La prueba se basa en que este grupo de bacterias fermentan la lactosa con formación de ácido, esto ocasiona que en las colonias que se desarrollen sobre el agar, vire el indicador rojo neutro presente en el medio que a su vez esto provoca la precipitación de las sales biliares³¹.

A su vez provoca una pigmentación en las colonias formadas, típicamente son de color rojo oscuro, y por lo general se encuentran rodeadas de un halo de precipitación debido a las sales biliares, este anillo es de color rojo claro o rosa⁶³.

En la Figura 8 se visualizan algunas colonias características, se obtuvieron los UFC/ml de acuerdo a lo estipulado en la NOM-113-SSA1-1994. En la Figura 8, se pueden visualizar las placas con la dilución 10^{-2} , se puede observar 2 colonias con las características ya descritas, es decir colonias de color rojo oscuro, rodeadas del halo de precipitación de sales biliares.



Figura 8. Colonias características de Coliformes totales sobre el agar RVBA.

Después de la pasteurización, la leche se envasa asépticamente y se almacena para su posterior utilización, de esta forma, al realizar esta prueba y todas las demás pruebas microbiológicas en esta parte del proceso de acondicionamiento de la leche, permitió obtener resultados confiables de la leche como materia prima que garantizaron la calidad microbiológica de la leche.

Entre los factores por los que la leche se suele contaminarse por el grupo Coliforme se encuentran: contacto con heces, contaminación por parte del ordeñador y/o por las máquinas de ordeño, contaminación durante el transporte, por equipos mal sanitizados, siendo la más frecuente el contacto con heces fecales.

La pasteurización, cuando se realiza de la forma correcta, asegura que la carga microbiana de la leche se encuentra por debajo de los límites establecidos por la normatividad vigente. Esto se puede comprobar con los resultados mostrados en la Tabla 30. La pasteurización es el mecanismo y/o método de conservación de rutina que se le debe hacer a la leche y a los derivados lácteos para alargar la vida de anaquel del producto y asegurar su calidad microbiológica.

4.4.1.2 Coliformes fecales (*E.coli*)

Dentro de las bacterias Coliformes, *Escherichia coli*, dado su nivel de peligro para el ser humano, debe de estar ausente en los alimentos, existen especies de este género de bacterias que no necesariamente producen gas a partir de la fermentación de la lactosa o lo hacen después de 48 horas de incubación, estas especies no se identifican por medio de esta técnica⁶⁴.

En la Tabla 30 se muestran los resultados de esta prueba. En ninguno de los tubos hubo formación de bióxido de carbono, que es producido por las bacterias de este género al realizar la fermentación de lactosa. Los componentes del caldo lauril sulfato triptosa, como el lauril sulfato de sodio, funciona como agente selectivo, es decir, es selectivo frente a los no Coliformes, la triptosa actúa como un potenciador de velocidad de crecimiento, mientras que el cloruro de sodio actúa como balance osmótico, para facilitar la producción de gas y el crecimiento de las bacterias³⁶.

Al no haber formación de bióxido de carbono sobre las campanas de fermentación (que es el resultado de la fermentación de la lactosa, azúcar que fermentan las bacterias de este género). Se concluye que las muestras estaban ausentes de Coliformes fecales (*E. Coli*) en todas las muestras de leche requeridas para la elaboración de este trabajo. Como no se detectó presencia de Coliformes fecales, se puede asegurar que la leche de vaca cumple con los requerimientos microbiológicos que indica la NOM-243-SSA1-2010, para que esta pueda ser procesada. No fue necesario realizar las pruebas confirmatorias y de identificación bioquímica de este género bacteriano, para el caso de la leche.

4.4.1.3 *Salmonella*

La NOM-243-SSA1-2010, exige que *salmonella spp.*, deba de estar ausente en 25ml de leche, dado su nivel de riesgo para la salud del consumidor. En ninguna de las muestras de leche hubo hallazgo de *Salmonella spp.* En ninguno de los 3 medios selectivos utilizados para esta prueba (verde brillante, agar sulfito bismuto, agar *Salmonella – Shigella*) presentó crecimiento de las colonias típicas de este género bacteriano, y en ninguna de las pruebas hubo crecimiento microbiano de ningún tipo. Se sembró en superficie las muestras enriquecidas en *Salmonella* en 3 medios selectivos y 2 diferenciales; con esto se aumentó la posibilidad de recuperación del patógeno del alimento y se incrementa la sensibilidad del método³¹.

En la Figura 9 se muestra la caja Petri control y la una caja Petri inoculada con la muestra de estudio en el agar *Salmonella – Shigella*, respectivamente, la caja Petri control al estar ausente de crecimiento, asegura que la prueba se realizó correctamente y que no hubo contaminación cruzada durante la prueba, por otra parte en la caja Petri inoculada con la muestra de estudio, al no presentar crecimiento microbiano de ningún tipo permite afirmar la ausencia de este patógeno en la leche.

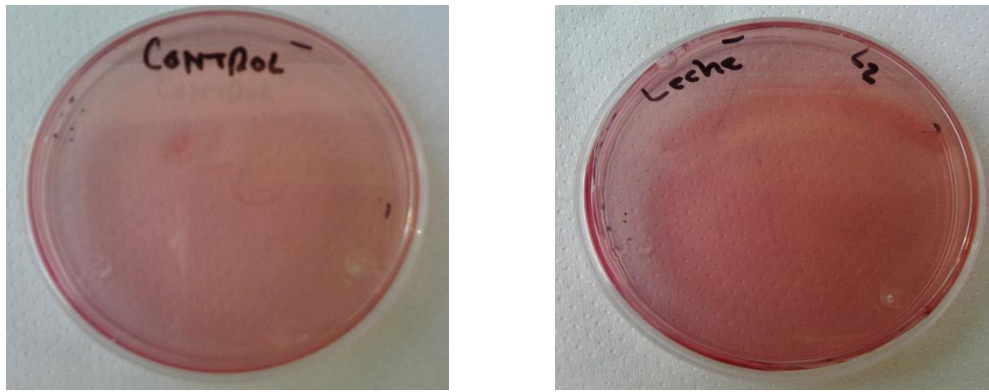


Figura 9. Caja Petri control y Caja Petri enriquecida en *Salmonella*, para la leche.

Con base en este análisis se reporta esta prueba como: **Ausencia de *Salmonella* en 25ml de leche.**

4.4.1.4 *Staphylococcus aureus*

El resultado para esta prueba es <10 UFC/ml. En las placas con las diluciones 10^{-3} y 10^{-4} inoculadas con las muestras de estudio no hubo crecimiento, para ninguna de las muestras de estudio, sin embargo en las placas con las diluciones 10^{-2} , son las que presentan crecimiento, tal y como se muestra en la Figura 10, donde se puede apreciar el crecimiento de una colonia característica de *Staphylococcus aureus* en cada placa, indicada por el círculo rojo. Cumplen con las características que deben tener las colonias de este género bacteriano: colonias negras, circulares, brillantes y con un halo claro alrededor de la colonia⁶⁶.

Al multiplicar el número de colonias presentes en cada caja Petri por el inverso de la dilución arroja los resultados indicados en la Tabla 30, los cuales están dentro de los límites que indica la NOM-243-SSA1-2010, sin embargo estos resultados no aseguran que la toxina estafilocócica, producida por este género bacteriano esté ausente.

El cloruro de litio y el telurito de potasio son selectivos, es decir impiden el crecimiento de especies que no pertenecen al género *Staphylococcus*. La diferenciación entre las especies de este género se consigue mediante las reacciones en telurito y en yema de huevo. *S. aureus* reduce la sal (telurito) y libera el telurio, lo que provoca la aparición de las colonias negras³⁶, tal y como se observa en la Figura 10 *Staphylococcus aureus* produce una lipasa (lecitinasa) que, al hidrolizar la lipoproteína de la yema de huevo, produce un aclaramiento alrededor de las colonias y una zona opaca como consecuencia de la formación de un precipitado de sales de calcio y magnesio, insoluble en ácidos grasos³⁶.

El crecimiento de *Staphylococcus aureus* en alimentos tiene gran importancia por tratarse de un microorganismo capaz de producir una poderosa enterotoxina que al ingerirse causa intoxicaciones alimentarias⁶⁶.



Figura 10. Crecimiento de colonias típicas de *S. aureus* en la leche.

4.4.2 Nuez

La tabla 31 muestra los resultados de las distintas pruebas microbiológicas realizadas a la nuez:

Tabla 31. Resultados de pruebas microbiológicas realizadas a la nuez.

Microorganismo	Resultado UFC/g	Límite permitido UFC/g	Norma de referencia
Mesófilos aerobios	< 200	5000	NOM-092-SSA1-1994
Coliformes totales	< 30	< 100	NOM-113-SSA1-1994
Coliformes fecales	Ausente	Ausente	NOM-112-SSA1-1994
<i>Staphylococcus aureus</i>	Ausente	Ausente	NOM-115-SSA1-1994
<i>Salmonella spp.</i>	Ausente	Ausente	NOM-114-SSA1-1994
Mohos	50	< 200	NOM-243-SSA1-2010 NOM-111-SSA1-1994
Levaduras	< 10	< 200	NOM-243-SSA1-2010 NOM-111-SSA1-1994

4.4.2.1 Coliformes totales en placa

En las diluciones 10^{-2} fue donde se detectó el crecimiento, en ambas cajas de esta dilución, hay crecimiento de las colonias características, en una caja Petri se contabilizó 1 colonia y en el duplicado de esta dilución hay 2 colonias características de este género (ver Figura 11), todas presentan un color rojo oscuro, rodeadas por el halo de color rojizo a rosado, debido a la precipitación de las sales biliares, así como la morfología que semeja a lentes biconvexas³¹.

En las diluciones 10^{-3} y 10^{-4} , no se detectó crecimiento de ningún tipo. Debido a que las sales biliares y el cristal violeta, presentes en el medio, inhiben a los Gram positivos y a las bacterias no entéricas. Las colonias que fermentan la lactosa adquieren una coloración roja o rosada, tal y como se muestra en las colonias formadas sobre el agar bilis rojo violeta, mostradas en la Figura

11. Si se hubiera desarrollado crecimiento de bacterias no fermentadoras de la lactosa, la coloración de estas sobre el medio hubiera sido de un tono entre color fresa y amarillo⁶³.

La lectura se debe realizar a las 24 horas de la inoculación, pues un tiempo de incubación superior a las 24 horas puede producir resultados erróneos, ya que hay microorganismos que fermentan lentamente la lactosa y pueden crecer lo suficiente como para producir falsos positivos.



Figura 11. Crecimiento de grupo Coliforme en las diluciones 10^{-2} en la nuez, mediante el método de recuento en placa.

4.4.2.2 Coliformes fecales (*E. coli*)

Una vez transcurridas las 48 horas de incubación, se realizó la lectura de las 3 series de tubos inoculados, en ninguno de ellos hubo presencia de gas al interior de las campanas de fermentación. Esto indica que no hubo presencia de bacterias del grupo Coliforme en las muestras de nuez que se utilizaron en este trabajo. Una de las características principales por las que se definen este grupo de bacterias es por su capacidad de fermentar la lactosa, esto se ve reflejado en la prueba por la presencia de bióxido de carbono al interior de las campanas de fermentación, por otra parte este el caldo lauril sulfato triptosa contiene lauril sulfato de sodio que actúa como inhibidor de crecimiento bacteriano frente a otras bacterias que no pertenecen al grupo Coliforme³⁶.

Al no presentarse ninguno de los fenómenos descrito anteriormente, no es necesario realizar las pruebas bioquímicas de identificación bacteriana, para la identificación y/o clasificación de *Escherichia coli*. Por lo tanto es válido afirmar que la nuez se encuentra en condiciones óptimas, en cuanto a su calidad microbiológica se refiere.

4.4.2.3 *Salmonella*

En ninguno de los agares inoculados con las muestras enriquecidas en *Salmonella* se detectó crecimiento de colonias típicas de éste género bacteriano. Debido a los agentes selectivos e inhibidores que tienen los distintos medios de enriquecimiento (agar verde brillante, agar sulfito bismuto y agar *Salmonella – Shigella*) y pre enriquecimiento (caldo tetrationato y caldo selenito cistina) no hubo crecimiento de bacterias entéricas diferentes al género *Salmonella*.

Los medios de pre enriquecimiento tiene la función de restaurar las células de *Salmonella*, si es que las hay en las muestras de estudio. Los agentes selectivos como el selenito ácido de sodio, contenido en el caldo selenito cistina y el tetratiónato, incluido en el caldo tetratiónato son tóxicos y letales para la mayoría de los microorganismos, siendo *Salmonella* más resistente que muchas bacterias, por ejemplo, Coliformes y enterococos. De esta forma, la posibilidad de que haya crecimiento bacteriano diferente a *Salmonella* es mínima³⁶. Por lo tanto, al no presentarse crecimiento bacteriano de colonias típicas de *Salmonella* en ninguno de los 3 medios de cultivo utilizados se reporta como: **ausente de *Salmonella* en 25g.**

4.4.2.4 *Staphylococcus aureus*

Después de las 24 horas de incubación no se detectó crecimiento en las cajas Petri inoculadas. En la Figura 12 se muestra una de las cajas Petri inoculadas, no se observa crecimiento bacteriano sobre la superficie del agar Baird – Parker. Al no haber crecimiento de colonias típicas de *S. aureus.*, se reporta la prueba como ausente.

La población de esta bacteria debe alcanzar, al menos, 10^6 UFC por gramo o mililitro, para que se sintetice una cantidad de toxina suficiente para provocar la enfermedad. La ingestión de menos de $1\mu\text{g}$ de la toxina ya puede iniciar el proceso. La presencia de una concentración elevada de esta bacteria en un alimento (más de 10^5 UFC/ gramo o mililitro) representa un riesgo potencial para la salud del consumidor³¹.

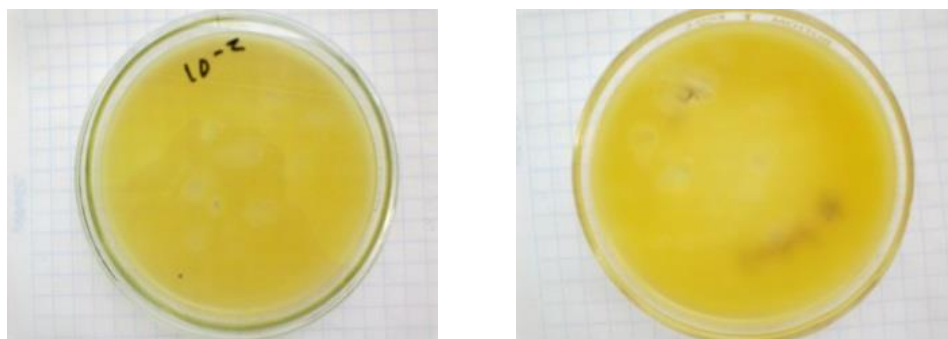


Figura 12. Dilución 10^{-2} con crecimiento de *S. aureus* y placa Petri control, respectivamente.

4.4.2.5 Mesófilos aerobios

La NOM-243-SSA1-2010 establece un límite máximo de 5000 UFC/g para la nuez sin cáscara. Al ser un producto que se encuentra en contacto directo con la tierra y a que normalmente o en la mayoría de los casos, la nuez no es empacada con algún tipo de material que disminuya y/o prevenga la contaminación bacteriana, tiende a tener valores elevados de bacterias mesófilas aerobias.

En la Figura 13 se pueden apreciar el crecimiento de bacterias mesófilas sobre el agar para métodos estándar, también se muestra la caja Petri control, esta no presenta crecimiento de

ningún tipo. En la dilución más baja, 10^{-2} , se obtuvo el mayor número de colonias. Se pueden observar algunas de las colonias típicas encerradas por el círculo rojo, basándose en los criterios establecidos en la NOM-092-SSA1-1994 se determinó que existen <200 UFC/g de bacterias aerobias en placa en agar para cuenta estándar. Este resultado indica que la nuez cuenta con una calidad microbiológica aceptable para su procesamiento.

La cuenta de bacterias mesófilas no pretende identificar alguna especie o género bacteriano en específico, solo identifica el contenido de microorganismos viables en un alimento. Lo que refleja la calidad y/o el manejo sanitario del alimento³⁶.

Sin embargo hay que tener presente que un recuento total de mesófilos aerobios bajo no asegura que un alimento esté exento de patógenos y/o sus toxinas; tampoco un recuento total alto significa, inevitablemente, presencia de flora patógena. Como ya se ha mencionado antes esta técnica no pretende especificar sobre algún género o especie de microorganismo.

Solo se estima la flora total presente en el alimento. Para nuestro caso particular indica las condiciones higiénicas de la nuez, y el cuidado o higiene que se tuvo con la misma desde su cosecha, transporte y almacenamiento, antes de llegar al consumidor.

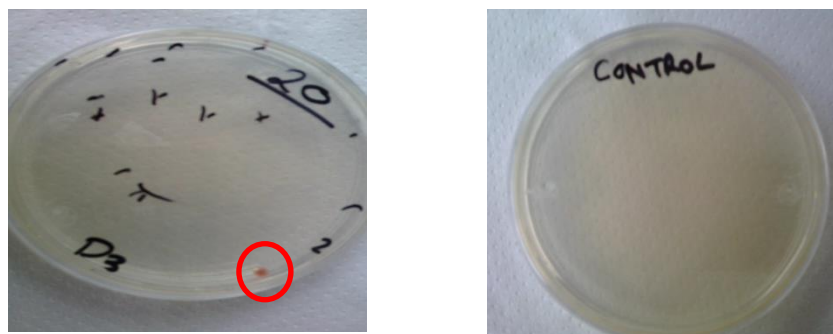


Figura 13. Caja Petri control y placa con la dilución 10^{-3} para el recuento de bacterias mesófilas aerobias.

4.4.2.6 Mohos y levaduras

Se detectó el crecimiento de colonias características de mohos sobre el agar papa – dextrosa, las cuales pueden observarse en la Figura 14, tanto en las diluciones 10^{-2} y 10^{-3} , presentan crecimiento de mohos, estas imágenes fueron tomadas a los 6 días de la inoculación.

La adición de ácido tartárico al medio reduce el pH hasta un nivel tal que inhibe el crecimiento de las bacterias pero que tolera el de los hongos.

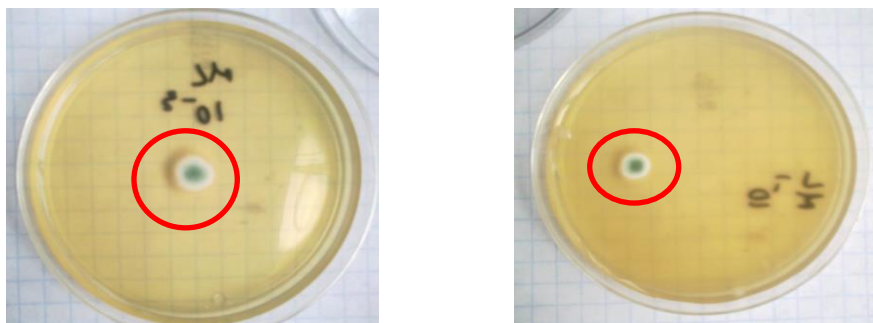


Figura 14. Desarrollo de colonias de mohos sobre el agar papa-dextrosa acidificado.

Para el caso de las levaduras no se observó el crecimiento de colonias típicas de este género en ninguna de las cajas Petri inoculadas. Las levaduras, cuando se desarrollan sobre el agar papa – dextrosa acidificado forman colonias de aspecto similar a las bacterias.

Sin embargo de acuerdo a los criterios establecidos en la NOM-092-SSA1-1994, cuando el crecimiento bacteriano no está dentro del rango 10 - 150 UFC/g (que es el rango adecuado para realizar la lectura de las colonias para esta prueba) Cuando las placas de todas las diluciones no muestran colonias, se debe reportar la cuenta en placa como menor que una vez el valor de la dilución más baja usada, de acuerdo a esta regla se determinó que hay 100 UFC/g de levaduras en agar papa – dextrosa acidificado.

Es de gran importancia cuantificar los mohos y levaduras en los alimentos, puesto que al establecer la cuenta de estos microorganismos, permite su utilización como un indicador de prácticas sanitarias inadecuadas durante la producción y el almacenamiento de los productos, así como el uso de materia prima inadecuada. Con el fin de que la prueba sea más específica, en el conteo, conviene separar las colonias de mohos de las colonias de levaduras³⁶.

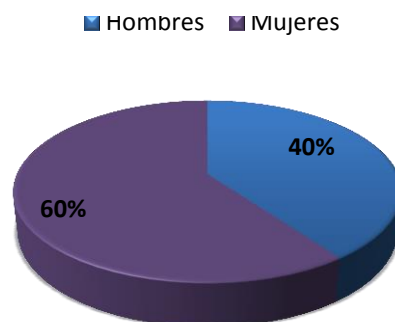
En resumen tanto la leche, como la nuez cumplen con los requerimientos microbiológicos requeridos, ya que los resultados obtenidos de las distintas pruebas microbiológicas realizadas se encuentran por debajo de los límites marcados por la normatividad vigente en México. El realizar una sola prueba microbiológica no permite evaluar adecuadamente la inocuidad de un alimento, por lo que necesariamente se deben realizar una serie de pruebas microbiológicas, las cuales en conjunto permiten emitir un análisis confiable sobre a carga microbiana de un alimento.

Dicho esto, se puede asegurar que las materias primas se encuentran en óptimas condiciones para ser procesadas.

4.5 Análisis Sensorial para Selección de Formulación Final del Dulce de Leche

El Gráfico 4 muestra la totalidad del panel de consumidores, en total hubo 25 consumidores que realizaron esta prueba.

Gráfico 4. Panel de consumidores para la prueba sensorial.



En la Tabla No. 32, se muestran los resultados de la prueba sensorial realizada, agrupados en base a las medidas de posición. Ya que se evaluó la posición que un valor de datos específico posee en relación con el resto de los datos cuando están en orden clasificado^{77, 78}. Dicho de otras palabras, para este caso en particular interesa evaluar el porcentaje de agrado o desagrado de cada una de las 4 propiedades evaluadas.

Tabla 32. Resultados de la prueba sensorial, ordenados de acuerdo a las medidas de posición.

Parámetro	No. Muestra	L	Q ₁	Ñ	Q ₃	H
Sabor	151	2	4	6	8	8
	551	0	2	4	6	8
	252	4	6	7	8	10
Pegajosidad	151	2	6	7	8	10
	551	2	6	7	8	10
	252	0	6	7	8	10
Cremosidad	151	2	6	7	8	10
	551	2	4	6	8	10
	252	2	6	7	8	10
Sabor	151	0	4	5	6	8
	551	2	4	6	8	10
	252	4	6	7	8	10

Dónde:

L: Valor mínimo del conjunto de datos.

Q₁: Primer cuartil.

Ñ: Mediana.

Q₃: Tercer cuartil.

H: Valor máximo del conjunto de datos.

Para un mejor entendimiento de los resultados se construyeron gráficos de caja y bigotes (Gráficos 5–8), mostrados a continuación.

Gráfico 5. Gráfico de caja y bigotes para el parámetro de Dulzor.

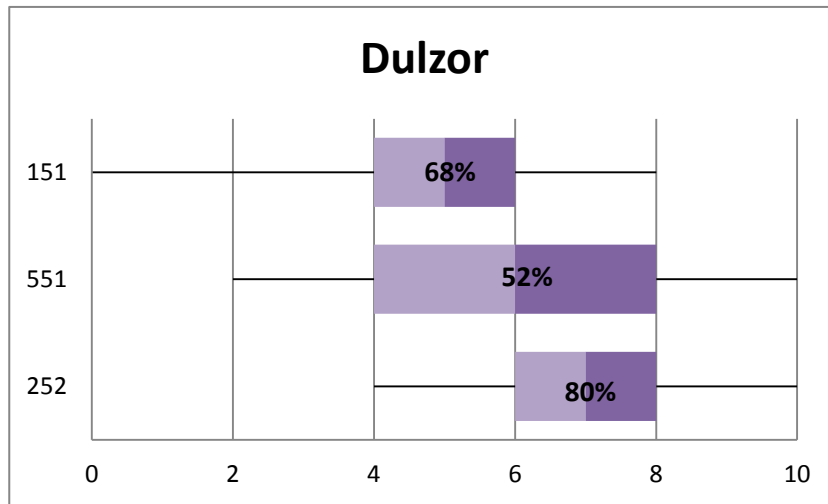


Gráfico 6. Gráfico de caja y bigotes para el parámetro de Cremosidad.

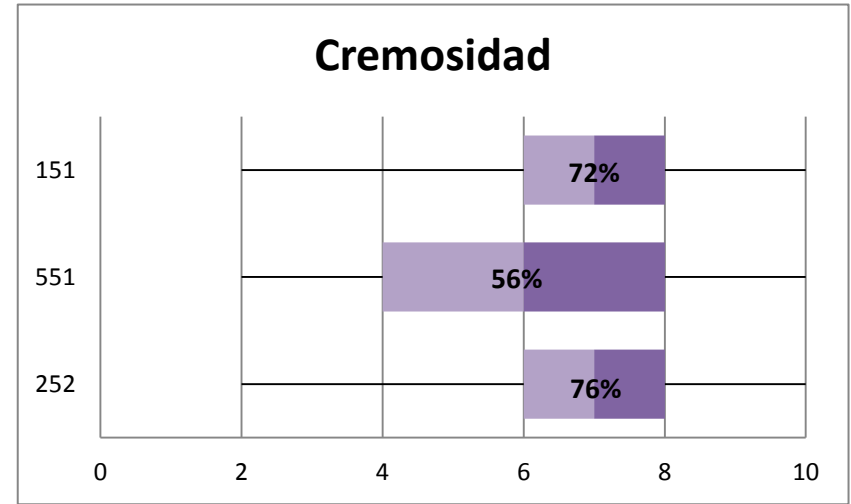


Gráfico 7. Gráfico de caja y bigotes para el parámetro de Sabor.

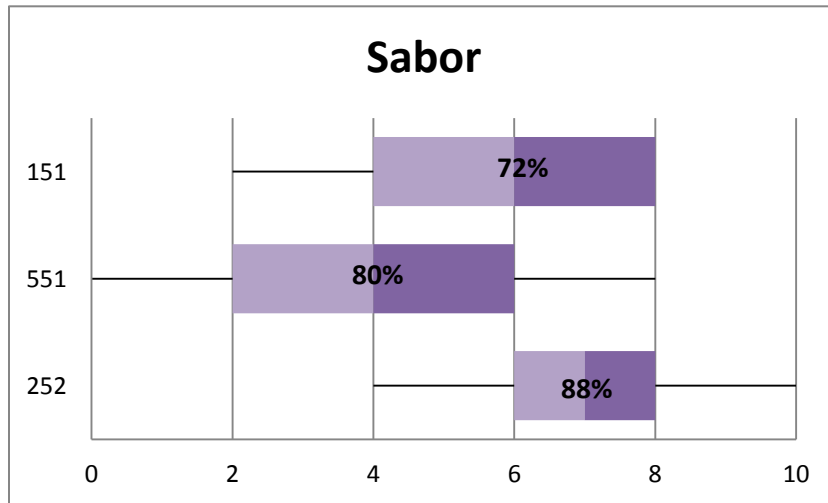
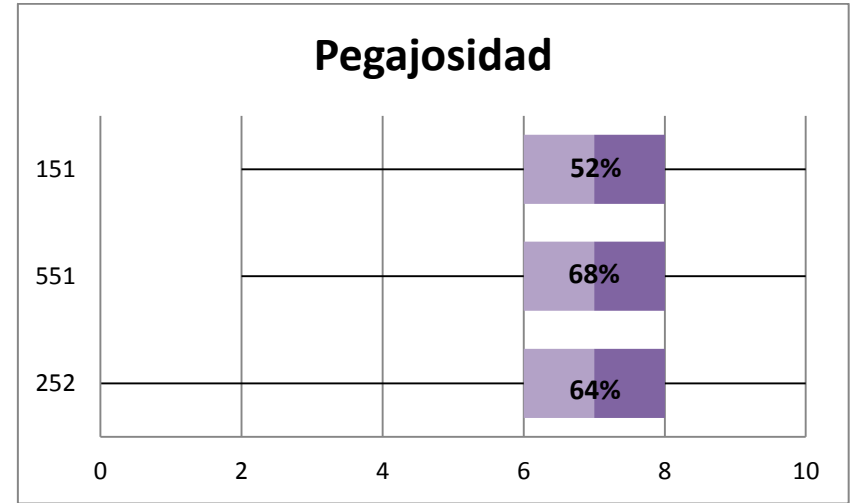
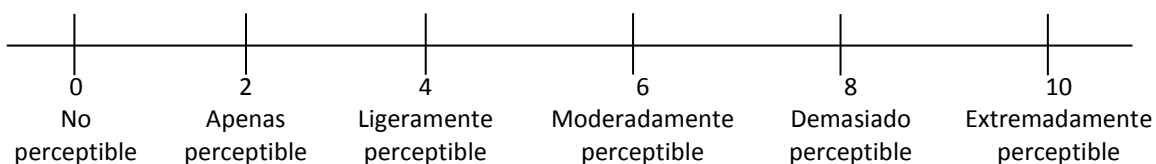


Gráfico 8. Gráfico de caja y bigotes para el parámetro de Pegajosidad.



*Para la lectura de las gráficas, en el eje de las "X", se debe interpretar de acuerdo a la siguiente escala:



Para un correcto análisis se debe describir cada gráfico (5-8) individualmente.

Se utilizó una prueba sensorial del tipo de intervalos ("Category & Scalling Test"), ya que esta permite calificar el nivel de agrado, por parte de los consumidores de la cantidad o intensidad de la diferencia entre varias muestras⁵³. En este caso permitió evaluar la intensidad de 4 parámetros fundamentales en un dulce de leche como son: cremosidad, pegajosidad, sabor y dulzor. Con los resultados de esta prueba se obtuvo la formulación final del dulce de leche funcional elaborado.

Se evaluó el sabor otorgado por la adición de café al producto, en realidad aquí se evaluó si al consumidor le agradaba este sabor, como era de esperarse, el dulce de leche (muestra 252) que tiene la mayor concentración de café (1.78%), el 72% de los encuestados indicó que el sabor de café es perceptible de moderado a demasiado, en base a la escala indicada, en el Gráfico 7 se observa que los datos para esta muestra se encuentran más concentrados, en comparación con las muestras 151 y 551, por otro lado se observa que la muestra 551 es la que arrojó el nivel más bajo de perceptibilidad del sabor contrario a lo esperado ya que la muestra 151 es la que presenta la concentración de café más baja (0.5%).

El parámetro de pegajosidad fue, el más complicado de evaluar y ajustar hasta niveles de perceptibilidad aceptables, en el Gráfico 8, se muestran los resultados para este parámetro, para las 3 muestras se esperaban valores dentro del rango de 4 – 6, es decir, de ligeramente a moderadamente perceptible, pero experimentalmente ninguna de las muestras logró posicionarse en esta escala, para las 3 muestras la mayor concentración de datos se encuentra en el rango de moderadamente a demasiado perceptible (6 – 8). Por otra parte el 64% de los datos para la muestra 252 se encuentra dentro de este rango, para la muestra 551 es de 68% y la muestra 151 arroja un dato de 52%, indicados por la posición de la caja sobre el gráfico, para este parámetro en particular, entre la caja se mas se desplace hacia la izquierda, indica que la pegajosidad del dulce de leche disminuye. Aunque pareciera que no hay diferencia de niveles de pegajosidad entre las muestras. Se observa que para la muestra 252 se obtuvieron niveles más bajos de perceptibilidad, indicados por el primer bigote del gráfico.

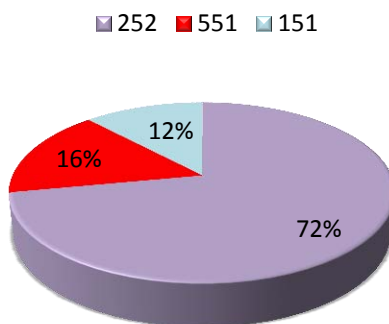
Tanto la cremosidad como el dulzor se esperaba que la mayor concentración de datos se encontrara en el rango de 6 – 8 (moderadamente a demasiado perceptible), arbitrariamente se decidió con anticipación que la o las muestras que estuvieran en este rango se considerarían como las mejores muestras en comparación con las demás. Experimentalmente para el parámetro de cremosidad, tanto la muestra 151 como la 252 se encuentran dentro de este rango, ya que como se observa en el Gráfico 6, la caja de ambas muestras se encuentra situada dentro de la escala de 6 – 8, lo que en

consecuencia indica que la mayor concentración de datos se encuentra dentro de este rango, sin embargo para la muestra 252 el 76% de los datos se concentra dentro del rango de aceptabilidad, mientras que, para la muestra 151 el 72% de sus datos se encuentran concentrados dentro de esta escala, por lo que se eligió a la muestra 252 como la favorita por parte de los consumidores.

El dulzor, que como se recuerda permitió determinar la concentración de edulcorante Stevia que se debía añadir al dulce de leche, ya que la fructosa al someterse a procesos con elevadas temperaturas disminuye su poder edulcorante, para compensar esta pérdida se añadió dicho edulcorante a las distintas formulaciones. En base a los resultados experimentales la única muestra que logro posicionarse dentro del rango esperado de moderadamente a demasiado perceptible es la muestra 252 (ver Gráfico 5), si bien es cierto que la muestra 551 también podría considerarse como válida, pero los datos de esta se encuentran más dispersos, indicado por la caja que se sitúa dentro del rango ligeramente perceptible a demasiado perceptible, en consecuencia indica que el consumidor no tiene una clara idea o un nivel de percepción del dulzor en la muestra, pues su criterio de perceptibilidad es muy amplio y no permite realizar un análisis concreto de su percepción. Por el contrario cuando la caja es más chica, tal como es el caso de la muestra 252, indica que los datos, para esa muestra en particular se concentran en mayor cantidad dentro del rango de moderadamente a demasiado perceptibles (6 – 8), es decir el 80% de los datos se sitúa dentro de este rango de aceptabilidad, teniendo valores mínimos de dulzor de 4 y máximos de 10, señalados por el primer y segundo bigote, respectivamente, en base a la escala proporcionada⁷⁸. Como se observa en el Gráfico 5 la muestra 252 tiene una amplia ventaja sobre las demás muestras, pues tanto estadísticamente como sensorialmente muestra ser superior a las de más muestras.

Para finalizar, al final de esta prueba se les pregunto a los consumidores cuál de las 3 muestras era de su preferencia, los resultados se muestran en el Gráfico 9.

Gráfico 9. Niveles de preferencia de los consumidores.

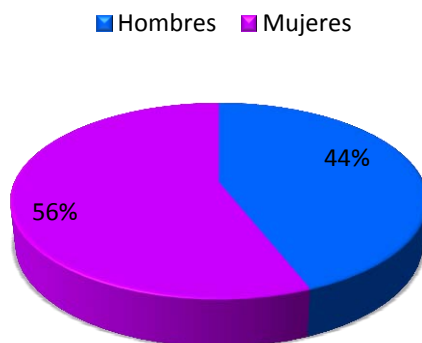


Se observa claramente la preferencia de los consumidores por la muestra 252, el 72% de los mismos indicó su preferencia por esta muestra, para las muestras 151 y 551 la preferencia fue de 12% y 16% respectivamente. En base al análisis de cada una de las 4 propiedades y al nivel de preferencia de los

consumidores se eligió a la muestra 252 como la mejor con respecto a las otras 2, ya que es la que muestra los parámetros organolépticos y sensoriales más adecuados para este tipo de dulce de leche.

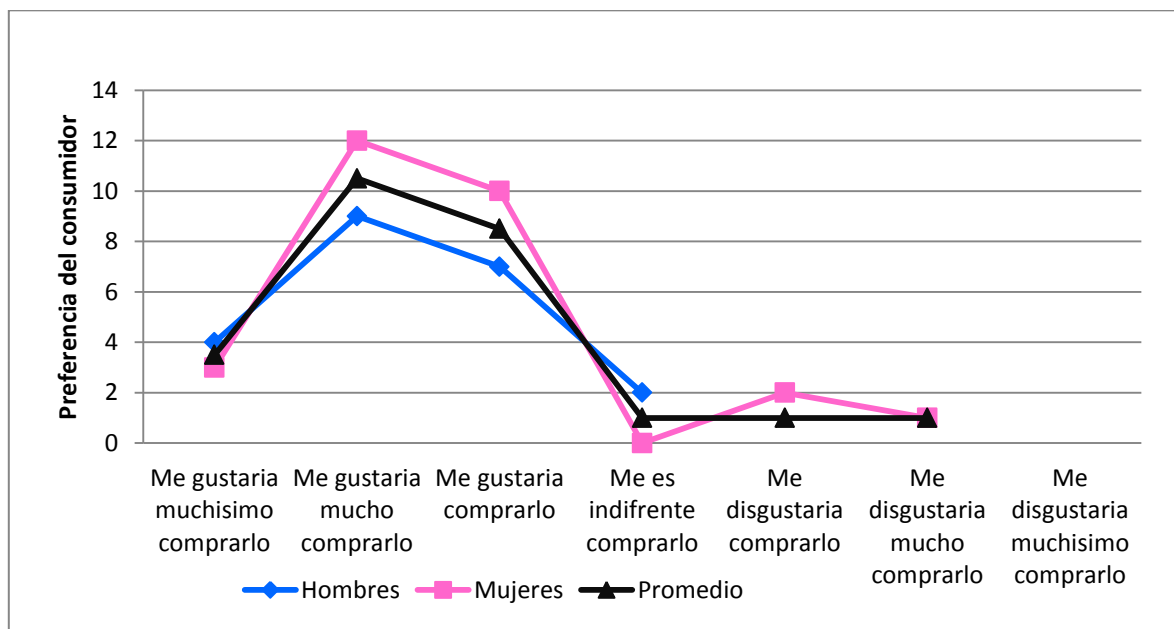
4.6 Prueba de Aceptación o Rechazo del Producto Final (Prueba hedónica)

Gráfico 10. Composición del jurado para la prueba de aceptación o rechazo.



En el Gráfico 10 se muestra el porcentaje de consumidores en razón de su sexo, que realizaron esta prueba sensorial, esta prueba fue aplicada a un total de 50 consumidores, de los cuales 28 fueron mujeres y 22 fueron hombres.

Gráfico 11. Resultados del sensorial de aceptación del producto final.



Los resultados de esta prueba se aprecian en la gráfica 11, donde en el eje de “X” se encuentra la escala hedónica utilizada y en el eje de “Y” se observa la preferencia del consumidor, es decir, la cantidad de personas que calificaron al dulce de leche en la escala hedónica.

La preferencia o agrado de los consumidores es muy similar tanto para hombres como para mujeres, pues en ambos casos indicaron que les gustaría mucho comprar el producto, el 42.85 % de las mujeres optaron por esta opción, mientras que en el caso de los hombres el 40.9 % de ellos optaron por esta misma opción, por otra parte el 35.71% de las mujeres dijeron que les gustaría comprarlo y el 58.33 % de los hombres se inclinaron hacia la misma opción. A su vez el 14% del total de consumidores dijeron que les gustaría muchísimo comprar el dulce de leche.

Sin embargo también se debe mencionar que el 4% de los consumidores indicaron que les es indiferente comprarlo, a su vez otro 4% de ellos indicaron que les disgustaría comprarlo y solo el 2% de los consumidores se inclinó por la opción de me disgustaría mucho comprarlo. Al cuestionar al consumidor porque se había inclinado por estas últimas opciones, indicaron que el sabor a café es muy intenso o que el sabor es muy amargo, así mismo dijeron que no consumían café con regularidad. Por lo que se atribuye que el consumidor haya inclinado por estas opciones a que son personas que en su dieta cotidiana no incluyen al café en el consumo de sus alimentos.

Lo ideal en esta prueba es que todos los consumidores inclinen sus preferencias hacia las 3 primeras opciones positivas en este test que son me gustaría muchísimo, me gustaría mucho y me gustaría comprarlo y que ninguno de los mismos se inclinara hacia las opciones consideradas como negativas para el dulce de leche, esto no se logró obtener, sin embargo se logró que el 90% de los consumidores indicaron que si están interesados en comprar el dulce de leche y únicamente el 10% de los consumidores opto por no comprarlo, esto indica un balance muy positivo para el dulce de leche, pues si en algún momento se inicia el proceso de introducir el producto al mercado, el dulce de leche, tema principal de este trabajo, tendría un nivel de aceptación alto en el mercado.

Se decidió utilizar este tipo de análisis sensorial ya que tiene ventajas sobre otras, es una prueba sencilla de aplicar y no requiere entrenamiento o experiencia por parte de los consumidores y permite detectar el nivel de agrado que una muestra representa para una población en particular⁵³. Lo que se buscó fue realizar un análisis sensorial que indicara si al consumidor le interesaría o no le interesaría comprar el dulce de leche funcional, y este objetivo se cumplió satisfactoriamente al realizar este tipo de análisis sensorial.

4.7 Análisis Químico Proximal del Dulce de Leche

En seguida se muestran los resultados experimentales del AQP, realizado a los 2 distintos dulces de leche.

4.7.1 Dulce de Leche Tipo Gloria con Sacarosa (Formulación tradicional)

En la Tabla 33 se muestran de forma generalizada los resultados del AQP, realizado al dulce de leche tipo gloria con sacarosa.

4.7.1.1 Humedad

Tabla 33. Resultados del análisis del humedad realizado al dulce de leche con sacarosa.

No. muestra	Porcentaje de humedad (%)	Promedio (%)	Desviación estándar	Coefficiente de variación	Dato teórico (%)
1	17.39	17.45	0.39	0.22	12 - 20
2	17.95				
3	17.01				

Fuente: NOM-185-SSA1-2002. Productos y servicios. Mantequilla, cremas, producto lácteo condensado azucarado, productos lácteos fermentados y acidificados, dulces a base de leche. Especificaciones sanitarias. www.ordenjuridico.gob.mx/Publicaciones/CDs2007/CDAgropecuaria/pdf/69NOM.pdf 13 de Septiembre de 2013, pp. 19.

Como se puede observar en la Tabla 33, el porcentaje de humedad encontrado en el dulce de leche con sacarosa analizado, se encuentra dentro de los límites establecidos en la NOM-185-SSA1-2002; y se observa que éstos son confiables al ser el coeficiente de variación menor a uno, lo que demuestra que el dulce realizado cuenta con las características de humedad deseadas para obtener las características de sabor y textura requeridas para este tipo de producto.

4.7.1.2 Grasa, Carbohidratos totales y Proteínas

En la Tabla 34 se pueden observar los resultados experimentales del contenido graso del dulce de leche tipo gloria con sacarosa:

Tabla 34. Resultados experimentales de grasa realizado al dulce de leche con sacarosa.

	No. muestra	Porcentaje de grasa (%)	Promedio (%)	Desviación estándar	Coefficiente de variación	Dato teórico (%)
Grasa	1	13.85	12.48	1.00	0.08	Mín. 6
	2	11.47				
	3	12.12				
Carbohidratos totales	1	55.37	55.33	0.74	0.01	57
	2	56.22				
	3	54.40				
Proteínas	1	4.47	4.74	0.35	0.07	6
	2	5.23				
	3	4.51				

Fuente: <http://www.aliciacrocco.com.ar/2014/04/tabla-de-composicion-quimica-de-alimentos-azucares-y-dulces/>, 13 de Octubre de 2013.

El porcentaje de contenido graso encontrado en el dulce de leche con sacarosa analizado, se encuentra dentro del rango que maneja la bibliografía, y el tratamiento estadístico, al reforzar que los resultados son confiables; lo que nos demuestra que el dulce realizado cuenta con las características

requeridas para este tipo de producto, y también marca el parámetro de las condiciones a seguir en el descremado de la leche entera.

Como se puede observar en la Tabla 34, el porcentaje de carbohidratos encontrado en el dulce de leche con sacarosa analizado, se encuentra dentro del rango que maneja la bibliografía, y lo sustenta el tratamiento estadístico, al demostrar que los datos son confiables al ser el coeficiente de variación menor de uno; lo que nos demuestra que el dulce realizado cuenta con las características requeridas, ya que este es uno de los principales componentes que le dan sabor y textura al producto.

El porcentaje de proteínas encontrado en el dulce de leche con sacarosa analizado, se encuentra debajo del rango que maneja la bibliografía, lo que demuestra que en el dulce realizado, es afectado en su aporte proteínico por los cambios de temperatura y pH que se realizan para poder producir el dulce; ya que industrialmente este dulce se produce en equipos que cambian las condiciones de presión y temperatura en el equipo, para que no haya este tipo de modificaciones químicas en el producto, y el obtenido en el presente estudio al ser realizado de una forma artesanal, no se pueden realizar ese tipo de procesos; por lo tanto se pierde un poco de las proteínas, al ser éstas desnaturalizadas por las altas temperaturas que se alcanzan, para lograr la concentración de sólidos que caracterizan al dulce de leche tipo gloria.

4.7.1.3 Cenizas

En la Tabla 35 se muestran los resultados experimentales de cenizas del dulce de leche tipo gloria con sacarosa:

Tabla 35. Resultados experimentales de cenizas del dulce de leche con sacarosa.

No. muestra	Porcentaje de cenizas (%)	Promedio (%)	Ds	Cv	Dato teórico (%)
1	3.13	3.11	0.07	0.02	Máx. 2
2	3.19				
3	3.02				

Fuente: <http://www.calcar.com.uy/dulce-de-leche.html> , 13 de Octubre de 2013

El porcentaje de cenizas encontrado en el dulce de leche con sacarosa analizado, se encuentra alto a comparación al bibliográfico⁵², ya que el dato teórico encontrado no es específicamente de un dulce de leche tipo gloria, es de un dulce de leche simple, sin nueces; lo que nos demuestra que en el dulce realizado se está cuantificando también el contenido de cenizas de los demás ingredientes del dulce (nuez, inulina, café, etc.), y que los datos experimentales obtenidos son lo que se esperaba, y al realizar el análisis estadístico a éstos, se puede observar que el coeficiente de variación es menor a 1, por lo que se consideran confiables los resultados.

4.7.1.4 Fibra

En la Tabla 36 se muestran los resultados experimentales de fibra presentes en el dulce de leche tipo gloria con sacarosa:

Tabla 36. Resultados experimentales de fibra del dulce de leche con sacarosa.

No. muestra	Porcentaje de fibra (%)	Promedio (%)	Desviación estándar	Coefficiente de variación	Dato teórico (%)
1	3.00	2.97	0.02	0.0067	-----
2	2.95				
3	2.96				

Para este ingrediente, no hay un parámetro de comparación, ya que no se encontró reportado en la bibliografía un producto similar al dulce de leche adicionado con fibra, pero se observó la diferencia con otras formulaciones realizadas sin la adición de ésta fibra (inulina), que la textura y sabor del dulce de leche cambiaban, y se demostró que las características de un dulce normal se lograban mantener con la adición de esta fibra, ya que suaviza el sabor del café y mejora la apariencia y textura del dulce. Y en el caso específico del dulce con sacarosa, se tenía un problema con la humedad, ya que se perdía de forma muy rápida durante el almacenamiento, y el agregar este ingrediente ayudó a mantener la humedad por un mayor lapso de tiempo y que se mantuvieran las mismas características organolépticas del producto.

4.7.2 Dulce de Leche Tipo Gloria con Fructosa (Dulce de leche funcional)

4.7.2.1 Humedad

En la Tabla 37 se muestran los resultados experimentales de humedad del dulce de leche tipo gloria con fructosa:

Tabla 37. Resultados experimentales de humedad del dulce de leche con fructosa.

No. muestra	Porcentaje de humedad (%)	Promedio (%)	Ds	Cv	Dato teórico (%)
1	18.54	18.54	0.06	0.0023	12 - 20
2	18.46				
3	18.61				

Fuente: NOM-185-SSA1-2002. Productos y servicios. Mantequilla, cremas, producto lácteo condensado azucarado, productos lácteos fermentados y acidificados, dulces a base de leche. Especificaciones sanitarias. www.ordenjuridico.gob.mx/Publicaciones/CDs2007/CDAgropecuaria/pdf/69NOM.pdf 13 de Septiembre de 2013, pp. 19.

Como se puede observar en la Tabla 37, el porcentaje de humedad encontrado en el dulce de leche con fructosa analizado, se encuentra dentro de los límites establecidos en la NOM-185-SSA1-2002, lo que demuestra que el dulce realizado cuenta con las características de humedad correctas para

obtener las características de sabor y textura requeridas para este tipo de producto; ya que el dulce de leche al tener un mayor contenido de humedad, su consistencia se vuelve fluida, por el contrario éste al tener menor humedad su dureza aumenta. Lo que lo vuelve desagradable al gusto y le otorgaría propiedades distintas a un dulce de leche tipo gloria. El coeficiente de variación para esta determinación, resultó ser menor a uno, lo que indica que los resultados son confiables.

4.7.2.2 Grasa, Carbohidratos totales Proteínas

En la Tabla 38 se muestran los resultados experimentales de la grasa presente en el dulce de leche tipo gloria con fructosa:

Tabla 38. Resultados experimentales de grasa del dulce de leche con fructosa.

	No. muestra	Porcentaje de grasa (%)	Promedio (%)	Ds	Cv	Dato teórico (%)
Grasa	1	9.62	9.69	0.08	0.0082	Mín. 6
	2	9.64				
	3	9.81				
Carbohidratos Totales	1	56.97	57.81	0.94	0.02	57
	2	59.13				
	3	57.33				
Proteínas	1	4.50	5.10	0.46	0.09	6
	2	5.62				
	3	5.18				

Fuente: <http://www.aliciacrocco.com.ar/2014/04/tabla-de-composicion-quimica-de-alimentos-azucares-y-dulces/>, 13 de Octubre de 2013.

El porcentaje graso encontrado en el dulce de leche con fructosa analizado, se encuentra dentro del rango de contenido graso que indica la bibliografía⁷³, lo que nos demuestra que el dulce realizado cuenta con las características requeridas para este tipo de producto, y comprueba que las condiciones establecidas de descremado son eficientes. Pues se logró reducir en 22.91% el contenido de grasa en este último dulce de leche comparado con el dulce de leche que contiene sacarosa y leche entera en su formulación. Se observa que los resultados obtenidos no difieren entre ellos estadísticamente hablando. Es importante aclarar que la reducción de grasa se basa en la comparación con el dulce de leche tipo gloria que contiene sacarosa y leche entera en su formulación; en éste se obtuvo experimentalmente 12.48% de grasa, mientras que en el dulce de leche funcional se obtuvo 9.69%. Con estos resultados se afirma que es un producto reducido en grasa.

Como se observa en la Tabla 38, el porcentaje de carbohidratos totales encontrado en el dulce de leche con fructosa analizado, se encuentra dentro del rango que indica la bibliografía, lo que nos demuestra que el dulce realizado cuenta con las características requeridas, ya que este es uno de los principales componentes que le dan sabor y textura al producto, se puede ver un ligero aumento en los carbohidratos a comparación del dulce con sacarosa, ya que éste está compuesto solo de

monosacáridos; además de que se debe de tomar en cuenta que no solo se cuantifica la fructosa, sino también los carbohidratos aportados por los demás ingredientes, debido a la adición de inulina era de esperarse un aumento en el contenido final de carbohidratos totales. El contenido de carbohidratos es muy similar al de un dulce de leche tipo gloria comercial, sin embargo se debe tener claro que el dulce de leche funcional recibe el nombre de un producto “sin azúcar” al no contener azúcar comercial (sacarosa) en su formulación y no en base a que si este último contiene o no un menor porcentaje de carbohidratos comparado con un dulce de leche tipo gloria comercial.

En esta prueba, únicamente se cuantificaron los carbohidratos totales por lo que los resultados de éste parámetro para los dulces de leche tipo gloria con fructosa y sacarosa son muy similares.

Por otra parte, el porcentaje de proteínas encontrado en el dulce de leche con fructosa analizado, se encuentra debajo del rango que maneja la bibliografía, las proteínas del dulce de leche tipo gloria son afectadas por el tratamiento térmico al cual es sometido para obtener el producto deseado. Y en lo que respecta al análisis estadístico, éste demuestra que los datos experimentales obtenidos son confiables.

4.7.2.3 Cenizas

En la Tabla 39 se presentan los resultados de cenizas obtenidos del análisis químico proximal del dulce de leche tipo gloria con fructosa:

Tabla 39. Resultados experimentales de cenizas en el dulce de leche con fructosa.

No. muestra	Porcentaje de cenizas (%)	Promedio (%)	Ds	Cv	Dato teórico (%)
1	3.26	3.21	0.11	0.03	Máx. 2
2	3.06				
3	3.32				

Fuente: <http://www.calcar.com.uy/dulce-de-leche.html> , 13 de Octubre de 2013.

Como se observa en la Tabla 39, el porcentaje de cenizas encontrado en el dulce de leche con fructosa analizado, se encuentra alto a comparación del que maneja la bibliografía, esto es debido que en el dulce realizado se está cuantificando también el contenido de cenizas de los demás ingredientes del dulce (nuez, inulina, café, etc.). Lo que en consecuencia aumenta el contenido de cenizas, por lo que concluye que este valor de cenizas es válido, en lo que respecta al análisis estadístico, los datos obtenidos son confiables. Hubiera sido interesante cuantificar el contenido de sodio en el dulce de leche tipo gloria, ya que la NOM-051-SCFI/SSA1-2010 estipula que en la etiqueta del alimento se debe reportar el contenido total de sodio del mismo.

4.7.2.4 Fibra

En la Tabla 40 se pueden observar los resultados de fibra total del dulce de leche tipo gloria con fructosa:

Tabla 40. Resultados experimentales de fibra del dulce de leche con fructosa.

No. muestra	Porcentaje de fibra (%)	Promedio (%)	Ds	Cv	Dato teórico (%)
1	3.28	3.18	0.09	0.03	-----
2	3.06				
3	3.19				

Para este ingrediente, no hay un parámetro de comparación, ya que no se encontró información en la cual se realizará un producto con éste tipo de características (dulce de leche adicionado con fibra soluble); la inulina al ser un fructano polidisperso y considerarse como un carbohidrato total; incrementó el porcentaje final de carbohidratos en el dulce de leche. Con la adición de ésta fibra, se observó que la textura y sabor del dulce de leche cambian, y en el caso del dulce con fructosa, ayudó mucho en mantener la textura, ya que al no tener sacarosa la textura no era la deseada para éste tipo de producto y el poder edulcorante se perdía un poco por los cambios de temperatura por los cuales éste disminuye; la inulina aportó su dulzor aparte del Stevia añadido, y su estructura química ayudó a aumentar un poco el rendimiento, ya que el rendimiento del dulce con fructosa es menor al dulce con sacarosa. Este tipo de fibra se adicionó al dulce de leche, pues el objetivo de este trabajo es elaborar un alimento adicionando con prebióticos.

4.8 Análisis Microbiológico del Dulce de Leche

En la Tabla 41 se muestran los resultados de las distintas pruebas microbiológicas realizadas al dulce de leche.

Tabla 41. Resultados de pruebas microbiológicas realizadas al dulce de leche.

Microorganismo	Resultado UFC/g	Límite permitido UFC/g	Norma de referencia
Coliformes totales	< 10	≤ 10	NOM – 243 – SSA1 - 2010
<i>Salmonella spp</i>	Ausente	Ausente	NOM – 243 – SSA1 - 2010
<i>Staphylococcus aureus</i>	20	≤ 100	NOM – 243 – SSA1 - 2010

4.8.1 Coliformes totales

Solo una de las placas inoculadas presenta crecimiento bacteriano (ver Figura 15). La placa con la dilución 10^{-2} muestra una colonia característica de este grupo de bacterias, es decir, color rojizo, rodeada por un halo de precipitación³⁶.

Este grupo bacteriano se distingue de los demás por su capacidad de fermentar la lactosa y la formación de ácido, una bacteria distinta a este género hubiera presentado colonias con pigmentación amarilla o fresa³¹.

Debido a las altas temperaturas que se alcanzan durante el proceso de elaboración del dulce de leche, es muy poco probable que se desarrolle algún microorganismo, además de que el alto contenido de azúcar en el dulce de leche, funge como antimicrobiano natural.

Durante la elaboración del dulce de leche y en la manipulación de las materias primas y aditivos que conforman el dulce de leche, se tomaron medidas higiénicas para prevenir y/o reducir la probabilidad de una contaminación cruzada.

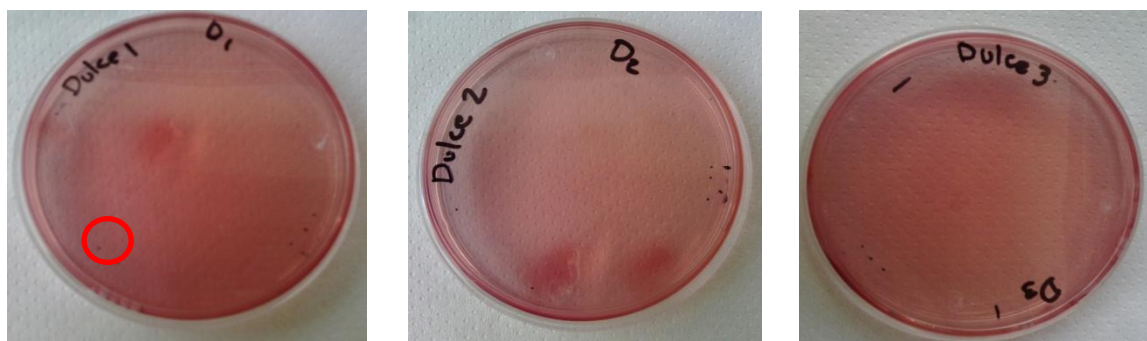


Figura 15. Cajas Petri enriquecidas en Coliformes totales para el dulce de leche.

4.8.2 *Salmonella spp*

Después del periodo de incubación no se presentó crecimiento bacteriano de colonias típicas de *Salmonella*.

Después de que se determinó mediante pruebas microbiológicas que en la leche y nuez no hubo presencia de *Salmonella*, lo más lógico sería suponer que en dulce de leche no hay presencia de este grupo bacteriano, sin embargo el que la materia prima se encuentre libre de este patógeno, es posible que en alguna parte del proceso se pueda dar esta contaminación ya sea por un equipo mal sanitizado, un mal manejo de temperatura, por falta de higiene al manipular las materias primas y producto final, o cualquier desviación en el proceso que pueda originar una contaminación en el producto final.

Como no hay presencia de este grupo bacteriano, se puede afirmar que el proceso de elaboración empleado para el dulce de leche, fue realizado bajo las medidas higiénicas correctas y necesarias para asegurar la calidad microbiológica del dulce de leche.

4.8.3 *Staphylococcus aureus*

Unicamente se logro contabilizar 1 colonia característica de *S. aureus.*, despues del periodo de incubación. En una de las 2 placas con la dilucion 10^{-2} fue donde se detectó el crecimiento de colonias carracteristicas de *S. aureus.*, es decir colonias negras, brillantes , húmedas y rodeadas de un halo de

precipitación de color blanquecino²⁷. Únicamente la especie *S. aureus* presenta el halo de precipitación alrededor de las colonias, otras especies del género estafilococos, presentan características iguales sobre el agar Baird-Parker a excepción del halo de precipitación³⁶.

El resultado del conteo es 20 UFC/g de *S. aureus*, este resultado se encuentra dentro de lo permitido por la NOM – 243 – SSA1 – 2010., con lo que se puede asegurar que el dulce de leche elaborado cuenta con una calidad microbiológica aceptable.

Dado que esta especie es muy sensible al calor, durante el proceso de elaboración del dulce de leche se redujo la carga microbiana inicial de *S. aureus*, debido a que durante dicho proceso se alcanzan temperaturas de hasta 88°C, temperatura suficiente para eliminar y/o inhibir el crecimiento de patógenos que pudieran llegar a alterar la calidad microbiológica del dulce de leche.

A su vez este género es muy sensible a los desinfectantes, toda el área de trabajo se sanitizó con cloruro de benzaldehído, tanto al momento de elaborar el dulce de leche así como durante la realización de las pruebas microbiológicas pertinentes, lo que redujo en gran medida la probabilidad de que se presentara alguna contaminación cruzada, que conllevaría a una mala interpretación de resultados.

Para finalizar con esta parte del proyecto se concluye que, con los resultados de las distintas pruebas microbiológicas se asegura que el dulce de leche elaborado cumple con las características microbiológicas requeridas por la Norma Mexicana NOM-243-SSA1-2010. Ya que el resultado de cada una de ellas se encuentra dentro de los límites marcados por esta norma, a su vez estos resultados validan el proceso de elaboración del dulce de leche, pues los puntos de control establecidos permiten elaborar y obtener un producto inocuo y de calidad.

Para ello se debe trabajar en todo momento bajo las buenas prácticas de manufactura y tomando las medidas de higiene y sanidad pertinentes, para evitar una posible contaminación durante el proceso o post proceso.

4.9 Análisis de Funcionalidad de Inulina

Se partió de la hipótesis de que ambas muestras de estudio (muestra 1: inoculada con *Lactobacillus paracasei* subsp. *Paracasei* y con inulina en su formulación; muestra 2: sin inulina en su formulación e inoculado con *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*) presentarían crecimiento del cultivo láctico, además se supuso que dicho crecimiento sería mayor en la muestra 1. Sin embargo se desconocía por cuánto tiempo se mantendría la población de *Lactobacillus* por arriba de 10^6 , que es el límite inferior para que un alimento pueda considerarse como probiótico.

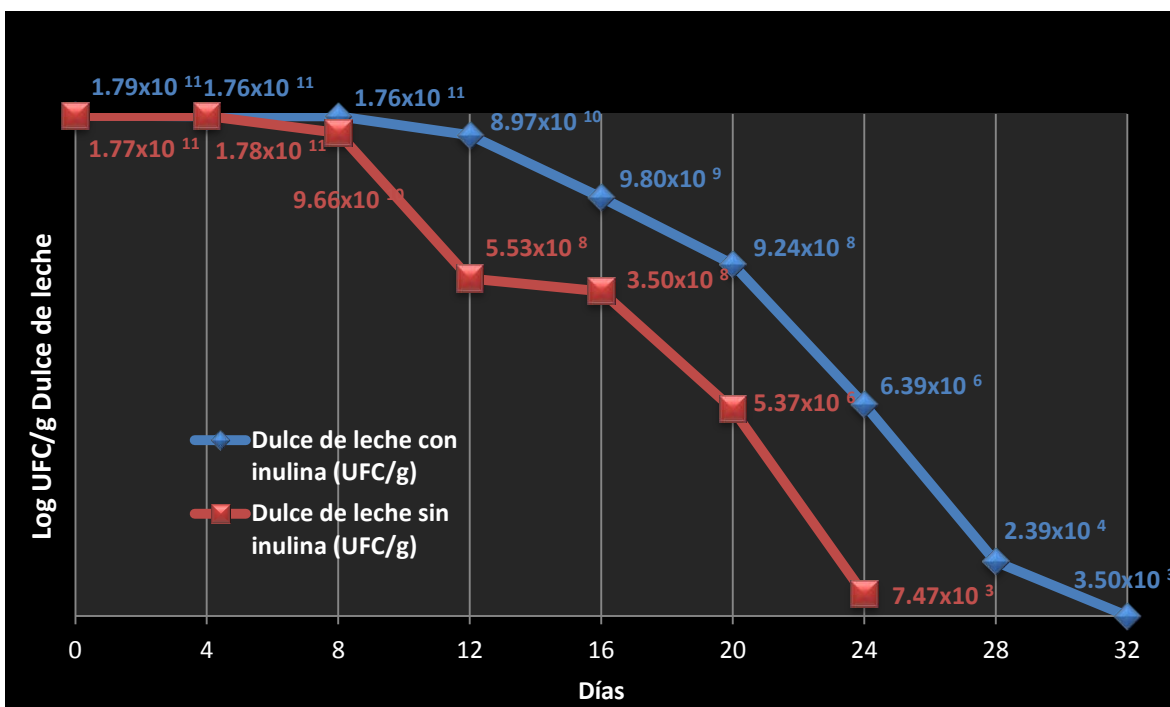
Vale la pena recordar una vez más que a diferencia de los productos lácteos en los que suelen utilizar cultivos probióticos, el producto elaborado no se somete a un proceso de fermentación y/o acidificación, además de que se almacena a temperatura ambiente.

En la Tabla 42 muestra los resultados de esta prueba, en el Gráfico 12, se muestran los mismos resultados de la prueba, para un mejor entendimiento e interpretación de los resultados.

Tabla 42. Resultados de crecimiento del cultivo probiótico *Lactobacillus paracasei subsp. Paracasei*.

Tiempo (días)	Dulce de leche con inulina (UFC/g)	Dulce de leche sin inulina (UFC/g)
0	1.79×10^{11}	1.77×10^{11}
4	1.76×10^{11}	1.78×10^{11}
8	1.76×10^{11}	9.66×10^{10}
12	8.97×10^{10}	5.53×10^8
16	9.80×10^9	3.50×10^8
20	9.24×10^8	5.37×10^6
24	6.39×10^6	7.47×10^3
28	2.39×10^4	0
32	3.50×10^3	0

Gráfico 12. Crecimiento de *Lactobacillus paracasei subsp. Paracasei*, en escala logarítmica.



En el Gráfico 12 se muestra el recuento de las colonias del microorganismo *Lactobacillus paracasei subsp. Paracasei*, en escala logarítmica base 10, tanto para el dulce de leche con inulina y el dulce de leche sin inulina. El proveedor del cultivo probiótico proporcionó el conteo inicial de *Lactobacillus paracasei subsp. Paracasei*, que es de 1.8^{11} UFC/g por cada dosis. En la práctica se logró contabilizar 1.77^{11} UFC/g de *Lactobacillus casei* para el dulce de leche sin inulina y 1.79^{11} UFC/g de *Lactobacillus*

casei para el dulce de leche con inulina en el día “cero”, si bien hay diferencia entre los datos obtenidos experimentalmente y los teóricos, éstos se encuentran dentro de los límites de variación indicados por el proveedor del cultivo.

De acuerdo a la ficha técnica del cultivo probiótico, este puede tener una variabilidad de $\pm 1.0^5$ en el conteo inicial de células, esta variación se debe entre otros factores al tipo de producto al que va destinado su uso.

El estudio realizado permitió confirmar la hipótesis que se planteó, pues evidente que, al haber presencia de inulina en uno de los 2 dulces de leche, el crecimiento y estabilidad del microorganismo *Lactobacillus casei* es mayor para el dulce de leche con inulina, comparado con el dulce de leche sin inulina, desde el octavo día de la inoculación con el cultivo láctico, se aprecia esta tendencia, pues mientras que para el dulce de leche con inulina arroja un conteo de 1.76^{11} UFC/g de *Lactobacillus casei* y 9.66^{10} UFC/g de *Lactobacillus casei* para el dulce de leche sin inulina, en el mismo lapso de tiempo, donde se aprecia un decrecimiento de un ciclo logarítmico.

La sobrevivencia de microorganismos probióticos depende, además, de las propiedades del microorganismo y de ciertas características en la composición del producto al cual ha sido adicionado, como la acidez, fuentes de nitrógeno, actividad de agua, etc⁷⁰. La estabilidad del microorganismo durante el tiempo de almacenamiento también depende de estos factores. El tipo de microorganismo probiótico utilizado también influye en el conteo y estabilidad del mismo.

Pues se han hecho diversos estudios con *Lactobacillus casei* en otros productos lácteos como queso cottage, leches fermentadas, en donde se ha logrado mantener el No. de microorganismos por encima de 1.0^9 UFC/g, durante 32 días⁶⁹.

Dentro del laboratorio de tecnología de calidad de alimentos también se han realizado estudios en quesos y helados en condiciones similares a las del presente trabajo, donde reportan que se logró mantener la población mayor a 10^6 UFC/ g o ml, por un periodo de 30 días.

A su vez en el Gráfico 12 se observa la funcionalidad de la inulina como prebiótico, ya que se observa como la población de *Lactobacillus casei* es más alta y estable conforme transcurre el tiempo en el dulce de leche adicionado con inulina y es hasta el día 24 donde alcanza su límite más bajo de colonias siendo este de 9.39^7 UFC/g, ya que al día 28 se contaron 2.39^4 UFC/g de *Lactobacillus casei*, este valor ya se encuentra fuera del límite marcado de 10^6 UFC/g, mientras que para el dulce de leche sin inulina desde el día 20 el conteo que se realizó da como resultado 3.37^7 UFC/g de *Lactobacillus casei*, valor muy cercano al límite de 10^6 UFC/g, ya al día 24 se realizó el conteo y fue de 1.4^5 UFC/g, valor fuera del rango establecido. También se observa como la inulina aumenta el periodo de vida útil del cultivo de *Lactobacillus casei*, manteniendo una población mayor y durante más tiempo en comparación con el dulce de leche al que no se le añadió inulina en su formulación.

Con base en estos resultados queda comprobado el poder prebiótico de la inulina, para el caso de un dulce de leche.

Conclusiones

- El elaborar un dulce de leche con las características descritas en este trabajo, requiere de capital disponible para invertir en su desarrollo, pues se utilizan ingredientes y aditivos que no son comúnmente utilizados, como son la inulina, Stevia, goma xantana y fructosa, lo que implica un costo extra ya que estos componentes son más caros que los ingredientes tradicionales en este tipo de dulces de leche.
- Al sustituir el 100% de sacarosa de la formulación tradicional de dulces de leche tipo gloria y reemplazarla con fructosa y Stevia, permite que el producto pueda ser consumido por cualquier tipo de consumidor.
- Dicho producto va enfocado principalmente a las personas intolerantes a lactosa, aunque puede ser consumido por cualquier persona, sin importar su edad o género.
- Por otra parte al reducir el contenido de grasa a tan solo 12.48%, esto combinado con la sustitución de glucosa y a que su contenido de carbohidratos de 55.33 % lo convierte en un alimento balanceado, ya que no aporta calorías en exceso.
- El añadir nuez a la formulación aumenta el contenido de grasa en el dulce, para contrarrestar este aumento de lípidos se descremó la leche a 2.2g/L, obteniendo así una leche descremada, por lo que al utilizar leche descremada se obtiene un producto reducido en grasa.
- La reducción de grasa en el dulce de leche se basa en que al haber sido elaborado dos tipos de dulce de leche, uno con leche entera en su formulación, y en el otro se utilizó leche descremada; en éste último se logró reducir el contenido de grasa en un 22.35%.
- Al vender el dulce de leche como un producto sin azúcar, se debe aclarar que se le denomina de ésta forma ya que no contiene azúcar (sacarosa) añadida, ésta fue sustituida por fructosa.
- La nuez incrementa el contenido de proteínas en el mismo, ya que un dulce de consumo cotidiano no aporta nutrientes al cuerpo, y el dulce desarrollado en este proyecto tiene el fin de aportar nutrientes esenciales como proteínas y fibra, que tienen un beneficio específico en el organismo, y es debido a que le fueron añadidos proteínas y fibra que transforma un dulce de leche tradicional en un dulce de leche funcional.
- De la prueba de viabilidad realizada a la inulina, en función del probiótico *Lactobacillus casei*. Se concluye que ésta muestra afinidad hacia éste tipo de microorganismo, como se indica en el punto 4.7; comprobándose de ésta forma la acción prebiótica de la inulina en el dulce de leche.
- De los resultados microbiológicos obtenidos, se concluye que el producto elaborado es un alimento inocuo, pues la carga microbiana en ninguna parte del proceso sobrepasó los límites establecidos por la Normatividad Mexicana vigente.
- Un análisis microbiológico bien realizado de acuerdo a los métodos y técnicas establecidos, permite obtener resultados confiables, que reflejan la inocuidad del alimento y la higiene de los manipuladores, desde la materia prima, hasta la obtención del producto terminado.
- De los análisis sensoriales realizados, se concluye que el dulce de leche tipo gloria funcional, es un producto que de ser introducido al mercado tendría grandes posibilidades de posicionarse en éste, pues se logró que el 90% del panel de consumidores indicara que si le

gustaría comprar el producto. A su vez mencionaron que lo que más les gustó de la innovación del producto, fue saborizarlo con café.

- El sustituir la leche de cabra por leche de vaca, no afecta el producto final, en estructura ni en sabor, ya que ambas cuentan con una composición química muy similar; ya que se sustituyó la leche, por economía y por accesibilidad de éstas, ya que la leche de cabra no es de fácil acceso en la zona y los alrededores donde se realizó el proyecto.
- Se obtuvieron datos relevantes sobre el AQP realizado, uno de estos es que el rendimiento es mayor en un dulce de leche tipo gloria tradicional, en comparación con el dulce de leche funcional, la relación de rendimiento.

Recomendaciones

- Al momento de realizar la pasteurización lenta, se debe cuidar la temperatura y el tiempo de la misma, pues un mal manejo de estas variables puede ocasionar que este proceso no sea eficiente como método de conservación de la leche, de igual forma se debe realizar el choque térmico inmediatamente después de haberse completado el tiempo de pasteurización.
- Una pasteurización mal ejecutada puede conllevar a que los resultados de los análisis microbiológicos sean interpretados de una forma errónea, aunque también un conteo elevado de microorganismos después de la pasteurización no necesariamente quiere decir que las pruebas microbiológicas se hicieron de la forma incorrecta, pues indica que el producto no fue elaborado bajo las BPM's.
- Para las pruebas microbiológicas, se recomienda esterilizar toda el área de trabajo, si no se cuenta con campana de flujo laminar trabajar en medio de 2 mecheros encendidos, esterilizar el material con anticipación y únicamente preparar la cantidad de medio de cultivo requerida. Para la nuez, se recomienda verter los 90ml de agua peptonada en los vasos de licuadora y esterilizarlos en ese mismo recipiente, para evitar posible contaminación cruzada, también se recomienda disolver la nuez en el mismo recipiente para preparar las soluciones madre.
- Se recomienda adquirir la leche del mismo sitio, para evitar posibles desviaciones en el contenido de grasa, proteínas y carbohidratos de la misma, así como pasteurizarla, de preferencia, inmediatamente después de haberla adquirido. Una opción para reducir mermas y costos de la materia prima (leche) es comprar toda la leche que se prevé utilizar, se pasteurice, se envase y se congele, así únicamente se descongela la cantidad que se va a utilizar y de esta forma también se pueden reducir variaciones en la composición química de la leche, en comparación si esta se adquiere en varios lotes.
- Al momento de elaborar el dulce de leche, se recomienda homogenizar 3 veces el dulce de leche justo después del punto de ebullición, para evitar que se queme el dulce de leche y/o se formen grumos.
- Se recomienda respetar los límites máximos de consumo de inulina por día (10 g/día), ya que si se rebasa este límite, se producen malestares estomacales en el individuo y esto puede afectar la aceptabilidad del producto.
- Se recomienda seguir las técnicas de análisis establecidas para el dulce de leche, con las pequeñas modificaciones mencionadas en el Anexo 1, debido a la consistencia del dulce se realizaron estas modificaciones en la metodología para determinar grasa por el método de Röese-Gottlieb, para facilitar el manejo de la muestra y obtener valores confiables.
- Se recomienda precalentar la leche en partes, para facilitar la solubilidad de los aditivos, como lo muestra el Diagrama 7, esto con el fin de evitar la formación de grumos de los mismos.
- En los análisis sensoriales, se recomienda utilizar un panel de jueces que ya hayan consumido con anterioridad el producto al cual se le va a realizar dicho análisis, ya que permite obtener valores más concretos en cuanto a la aceptabilidad del producto.

REFERENCIAS CITADAS

1. NOM-155-SCFI-2003, Leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado- Denominaciones, especificaciones fisicoquímicas, información comercial y métodos de prueba. Pág. 11, 20, 21, 22.
www.ordenjuridico.gob.mx/Publicaciones/CDs2007/CDAgropecuaria/pdf/83NOM.pdf 13 de Septiembre de 2013. Pp. 6, 11.
2. Curiel Monteagudo José Luis. La Dulcería Mexicana: Historia, Ciencia y Tecnología. Limusa. México, D.F. 2011, pp. 39, 40, 42, 43, 36, 37, 96, 97.
3. Badui Dergal Salvador. (2006). Química de los alimentos. 4ª. Ed. Pearson. Naucalpan de Juárez, México, pp. 618-621, 605, 1, 608, 609, 611, 32, 53, 616.
4. El Libro blanco de la leche y los productos lácteos. 1ª. Ed. Cámara Nacional de Industriales de la leche. <http://www.canilec.org.mx/>, 11 de Septiembre de 2013, pp. 27, 28,29, 30, 31, 44, 45, 69, 31, 17, 18, 52.
5. Fennema Owen R. (2000). Química de los alimentos. 2ª. Ed. Acribia, Zaragoza, España, pp. 1000, 1033.
6. Revilla Aurelio. Tecnología de la leche: Procesamiento, Manufactura y Análisis. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. San José, Costa Rica. 1982, pp. 14, 18, 19, 20, 25, 32, 33, 37, 38, 103, 104, 105, 106, 130, 131, 617.
7. Cámara Nacional de Industriales de la Leche, Recuperado el 15 de Julio de 2015 http://www.canilec.org.mx/estadisticas_produccion.php
8. Geankoplis Christie J., Procesos de Transporte y Operaciones Unitarias. 3ª ed. Editorial Continental. México. 1998. pp. 641.
9. Norma Oficial Mexicana, NOM-185-SSA1-2002. Productos y servicios. Mantequilla, cremas, producto lácteo condensado azucarado, productos lácteos fermentados y acidificados, dulces a base de leche. Especificaciones sanitarias. www.ordenjuridico.gob.mx/Publicaciones/CDs2007/CDAgropecuaria/pdf/69NOM.pdf 13 de Septiembre de 2013, pp. 19
10. Bender, David A. (2009). Dictionary of Food and Nutrition. New York, United States, third edition, pp.356, 509.
11. Vishwanath M., Sardesai y Tammi Waldshan, Natural and synthetic intense sweeteners. Journal of Nutrition, 1991. , pp. 237.
12. Norma Mexicana, NMX-K-329-1971. Calidad para bicarbonato de sodio, www.colpos.mx/bancodenormas/nmexicanas/NMX-K-329-1971.PDF, 20 de Septiembre de 2013, pp.1
13. Norma Mexicana, NMX-FF-084-SCFI-2009. Productos alimenticios no industrializados para consumo humano – fruto fresco – nuez pecanera *Carya illinoensis* (Wangenh) K. Koch especificaciones y métodos de prueba, dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5108225&fecha=04/09/2009, 15 de Octubre de 2013, pp. 6
14. Norma Mexicana, NMX-F-586-SCFI-2008. Café y sus productos - vocabulario - términos y definiciones. amecafe.org.mx/backup/2011/documentos/.../nmx-f-586-scfi-2008.pdf, 9 de Octubre de 2013, pp. 6.
15. Hughes Christopher. Guía de Aditivos, Zaragoza, España, Acribia, 1994, pp. 98.
16. Olagnero Gabriela, Abad Andrea, et al... Alimentos funcionales: fibra, prebióticos, probióticos y simbióticos. DIAETA, Buenos Aires, Vol. 25 N° 121, 2007, pp. 21-23.

17. Calvo Bruzos, S. C., Gómez Candela, C., López Nomdedeu, C., & Royo Bordonada, M. Á. (2012). *Nutrición, Salud y Alimentos Funcionales*. Madrid: UNED.
18. Verdú, J. M. (2010). *Nutrición Para Educadores*. Madrid: Diaz de Santos.
19. C. Costa, S. (2008). Alimentos Funcionales: ¿Moda o necesidad? *Industria Alimentaria*, 22-24.
20. Román Morales, M. O., & Valencia Garcia, F. E. (2008). Desarrollo y evaluación de galletas con mezclas de fuente de fibra dietaria como un alimento funcional. *Industria Alimentaria*, 42-51.
21. Madrigal, L., & Elba, S. (2007). *La inulina y derivados como ingredientes claves en alimentos funcionales*. Caracas: Archivos Latinoamericanos de Nutrición.
22. Franck, A. Technological functionality of inulin and oligofructose. *British J Nutrition* 2002; 87: 287-291.
23. Report of the regional expert consultation of the Asia-pacific network for food and their implications in the daily diet. FAO. Report. Thailand: RAP Pub; 2004. 65 pp.
24. Bélló, G. J. (2000). *Ciencia Bromatológica: Principios Generales de los Alimentos*. Madrid: Díaz de Santos.
25. Requena Rodríguez, A., & Tomás Balibrea, L. M. (2008). *Tríadas. Nuevas lecturas en ciencia y tecnología*. Coruña: Netbiblio.
26. Gil Hernández, A., & Ruíz Lopez, M. D. (2010). *Composición y Calidad Nutritiva de los Alimentos*. Madrid: Médica panamericana.
27. Belitz, H.-D., Grosch, W., & Schieberle, P. (2009). *Química de los alimentos*. Zaragoza: Acribia.
28. Baltes, W. (2000). *Química de los alimentos*. Zaragoza: Acribia.
29. Doyle, M. P., Beuchat, L. R., & Montville, T. J. (1997). *Microbiología de los alimentos: Fundamentos y fronteras*. Zaragoza: Acribia.
30. Montville, T. J., & Matthews, K. R. (2008). *Microbiología de los alimentos: Introducción*. Zaragoza: Acribia.
31. Yousef, A. E., & Carlstrom, C. (2003). *Microbiología de los alimentos: Manual de laboratorio*. Zaragoza: Acribia.
32. Jay, J. M. (1991). *Modern Food Microbiology*. New York: Springer.
33. Buttiaux, R., & Mossel, D. (1961). *The significance of various organisms of faecal origin in foods and drinking water*.
34. Norma Oficial Mexicana, NOM-243-SSA1-2010, Productos y servicios. Leche, fórmula láctea, producto lácteo combinado y derivados lácteos. Disposiciones y especificaciones sanitarias. Métodos de prueba. dof.gob.mx/nota_detalle.php?fecha=27/09/2010, 15, 16, 17, 32, 35, 38-45. 15 de Agosto de 2013.
35. Norma Oficial Mexicana, NOM-093-SSA1-1994, bienes y servicios. prácticas de higiene y sanidad en la preparación de alimentos que se ofrecen en establecimientos fijos. <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/093ssa14.html>, 4 noviembre del 2013.
36. Pascual Anderson, M. (1992). *Microbiología Alimentaria: Metodología analítica para alimentos y bebidas*. Madrid: Level.
37. Bourgeois, C. M., & Larpent, J. P. (n.d.). *Microbiología Alimentaria*. Zaragoza: Acribia.
38. Schrezenmeir J, de Vrese M. Probiotics, prebiotics, and symbiotic: approaching a definition. *Am J Clin Nutr* 2001; pág. 361-364.

39. Jacobsen CN, Rosenfeld Nielsen V, Hayford AE, Moller PL, Michaelsen KF, Paerregaard A, Sandström B, Tvede M, Jakobsen M. Screening of probiotic activities of forty-seven strains of *Lactobacillus spp.*, by in vitro techniques and evaluation of the colonization ability of five selected strains in humans. *Applied Environment Microbiology* 1999; 65: pág. 4949-56. http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_nlinks&ref=5595436&pid=S0717-7518201000010001000002&lng=es, recuperado el 10 de enero del 2015.
40. Yoon, K. Y., Woodams, E., Hang, Y. 2006. Production of probiotic cabbage juice by lactic acid bacteria. *Bio resource Tech. Elsevier.* **97**:1427-1430.
41. Young, J. 1998. European market developments in prebiotic- and probiotic containing foodstuffs. *Brit. J. Nutrition.* **80**:231-233.
42. Esquivel, P. 2004. Los frutos de las cactáceas y su potencial como materia prima. *Agronomía Mesoamericana.* **15**:215-2197
43. Donkor, O.N., Henriksson, A., Vasiljevic, T., Shah, N. P. 2006. Effect of acidification on the activity of probiotics in yoghurt during cold storage. *Int. Dairy J.* **16**:1181-1189
44. Magariños, H., Cartes, P., Fraser, B., Selaive, S., Costa, M., Figueroa, F., Pizarro, O. 2008. Viability of probiotic micro-organisms (*Lactobacillus casei* Shirota and *Bifidobacterium animalis subspp. lactis*) in a milk-based dessert with cranberry sauce. *Society of Dairy Tech.* **61**:96-101.
45. Ipek, G., Vijay, K., Mohamed, A. 2005. Probiotics in food safety and human health. *Library of Congress, Nueva York.* Págs. 1-25, 38-55,67-83,95-103
46. Blandino, A., Al-Aseeri, M. E., Pandiella, S. S., Cantero, D., Webb, C. 2003. Review Cereal-based fermented foods and beverages. *Food Res. Int.* **36**: 527-543
47. Cobo, J.M., Mateos, J. A., Muñoz, A. 2006. Efecto de *Lactobacillus casei* sobre la incidencia de procesos infecciosos en niños/as. *Nutrition. Hospitalary.* 4:547- 551
48. Cruz, A. G., Antunes, A., Sousa, A. L., Faria, J., Saad, S. 2009. Ice-cream as a probiotic food carrier. *Food Res. Int.* doi: 10.1016/j.foodres.2009.03.020
49. Dave, R. I., Shah, N.P. 1997. Effect of level of starter culture on viability of yoghurt and probiotic bacteria in yoghurts. *Food Aus.* **49**:164-168
50. Gänzle, M., Hertel, C., Van der Vossen, J., Hammes, W., 1999. Effect of bacteriocin-producing lactobacilli on the survival of *Escherichia coli* and *Listeria* in a dynamic model of the stomach and the small intestine. *Int. J. Food Microbiology.* **48**: 21-35
51. Luckow, T., Delahunty, C. 2003. Which juice is “healthier”? A consumer study of probiotic non-dairy juice drinks. *Food Qual. and Pref.* **15**:751-759.
52. Roman Morales, M. O., & Valencia García, F. E. (2008). Alimentos funcionales ¿Moda o necesidad? *Industria Alimentaria*, 22-24.
53. Instituto nacional de estadística y geografía (INEGI) <http://www3.inegi.org.mx/sistemas/sisept/default.aspx?t=msal74&s=est&c=26761>, 14 noviembre del 2013.
54. Norma Mexicana, NMX-F-317-S-1978. Determinación de pH en alimentos. Determination of pH in foods. *Normas Mexicanas. Dirección General de Normas.* www.colpos.mx/bancodenormas/nmexicanas/NMX-F-317-S-1978.PDF , 18 de Septiembre de 2013.
55. Proyecto de Norma, PROY-NMX-F-700-COFOCALEC-2012, Sistema producto leche - Alimento – Lácteo – Leche cruda de vaca – Especificaciones fisicoquímicas, sanitarias y métodos de prueba. (prueba de alcohol y azul de metileno).

- <http://www.canilec.org.mx/Circulares%202012/93del12/PROY-NMX-F-700-COFOCALEC-2012%20110212.pdf> ,18 de Septiembre de 2013. pp. 10, 38-40
56. Norma Mexicana, NMX-F-424-S-1982, Productos Alimenticios para uso humano. Determinación de la densidad en leche fluida. Food products for human use. Determination of the density in fluid milk. <http://www.colpos.mx/bancodenormas/nmexicanas/NMX-F-424-S-1982.PDF>. , 18 de Septiembre de 2013, pp. 1, 2. (densidad).
 57. REPELIUS, C. Lactase: an optimum enzyme for low lactose. **Asia Pacific Industry**, Special Supplement Ingredient & Additives, jun. 2001.
 58. Antonieta Rodriguez, V., Cravero, B. F., & Alonso, A. (2008). Proceso de elaboración de yogurt deslactosado de leche de cabra. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*, 109-115.
 59. Gomes, A. M. P., Malcata, F. X. 1999. *Bifidobacterium spp.* and *Lactobacillus acidophilus*: biologiucalo, biochemical, technological and therapeutically properties relevant for use as probiotics. *Trend Food Sci. Tech.* **10**:139-157.
 60. Norma Mexicana, NMX-F-083-1986. ALIMENTOS. Determinación de humedad en Productos Alimenticios. Foods. Moisture in food products determination. www.colpos.mx/bancodenormas/nmexicanas/NMX-F-083-1986.PDF, 27 de Septiembre de 2013, pp. 1, 2.
 61. Norma Mexicana, NMX-F-066-S-1978. Determinación de Cenizas en Alimentos. www.colpos.mx/bancodenormas/nmexicanas/NMX-F-066-S-1978.PDF , 27 de Septiembre de 2013, pp. 1,2.
 62. Norma Oficial Mexicana NOM-F-512-1988. Alimentos. Determinación de grasa en leche reconstituida. Método Röse-Gottlieb. http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:OUcc6w_NcZgJ:www.colpos.mx/bancodenormas/nmexicanas/NMX-F-512-1988.PDF+&cd=1&hl=es&ct=clnk&gl=mx. Pág. 4-6, noviembre 2013.
 63. Norma Oficial Mexicana, NOM-113-SSA1-1994, bienes y servicios. Método para la cuenta de microorganismos Coliformes totales en placa. www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/113ssa14.html , pp. 2, 3, 4, 5, 6. 3 de Septiembre de 2013.
 64. Norma Oficial Mexicana NOM-112-SSA1-1994, Bienes y servicios. Determinación de bacterias Coliformes. Técnica del número más probable. www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/112ssa14.html , pp. 2, 3, 4, 5, 6. 30 de Agosto de 2013.
 65. Norma Oficial Mexicana, NOM-114-SSA1-1994, bienes y servicios. Método para la determinación de *Salmonella* en alimentos. www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/114ssa14.html , pp. 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10. 5 de Octubre de 2013.
 66. Norma Oficial Mexicana, NOM-115-SSA1-1994, bienes y servicios. Método para la determinación de *Staphylococcus aureus* en alimentos. www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/115ssa14.html , pp. 3, 4, 5, 7. 8 de Septiembre de 2013.
 67. Norma Oficial Mexicana, NOM-092-SSA1-1994, bienes y servicios. Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa. www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/092ssa14.html , pp. 3, 4, 6, 7. 25 de Agosto de 2013.
 68. Norma Oficial Mexicana, NOM-111-SSA1-1994, Bienes y servicios. Método para la cuenta de Mohos y Levaduras en alimentos. ss.pue.gob.mx/index.php/ss-puebla/item/2017-

- [bienes-y-servicios-metodo-para-la-cuenta-de-mohos-y-levaduras-en-alimentos](#), pp. 5, 6, 7. 30 de Agosto de 2013.
69. Pedrero F., D. F., & Pangborn, R. M. (1989). *Evaluación sensorial de los alimentos: Métodos analíticos*. Madrid: Alhambra.
 70. Fuller R. 1989. Probiotics in man and animals. *Journal of Applied Bacteriology*. 66: 365-378.
 71. Cagigas, A., Blanco, J. 2002. Prebióticos y probióticos una relación beneficiosa. *Rev. Cubana Alimentos Nutrition*. 16(1):63-68.
 72. CODEX STAN 243-2003. Norma de Codex para leches fermentadas. www.codexalimentarius.org/input/download/standards/.../CXS_243s.pdf , pp. 3. 20 de Febrero de 2014.
 73. Norma Oficial Mexicana, NOM-181-SCFI-2010, yogurt-denominación, especificaciones fisicoquímicas y microbiológicas, información comercial y métodos de prueba. www.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5167303&fecha=16/11/2010 , pp. 3.
 74. Portal de Salud Alimenta tu Vida. <http://www.aliciacrococo.com.ar/2014/04/tabla-de-composicion-quimica-de-alimentos-azucares-y-dulces/> , 13 de Octubre de 2013.
 75. Cooperativa Láctea CALCAR. <http://www.calcar.com.uy/dulce-de-leche.html> , 13 de Octubre de 2013.
 76. Fuente: <http://www.quiminet.com/articulos/las-bases-de-la-potenciometria-28370.htm> 13 de Septiembre de 2013.
 77. Johnson, R., & Kubby, P. (2012). *Estadística Elemental*. México, D.F.: Cengage Learning. Pag. 60-90, Diciembre 2015.
 78. Montgomery, D. (2013). *Diseño y análisis de experimentos*. México, D.F.: Limusa Wiley. Pag. 60-70, Diciembre 2015.

ANEXO 1: Pruebas de Andén

8.3 Determinación de acidez

8.3.1 Fundamento

La leche generalmente tiene una acidez de 1,3 a 1,7 g/L expresada en ácido láctico. La acidez normal de la leche se debe principalmente a su contenido de caseína (0,05-0,08%) y de fosfatos. También contribuyen a la acidez el dióxido de carbono (0,01-0,02%), los citratos (0,01%) y la albúmina (menos de 0,001%).

La acidez se mide con base a una titulación alcalimétrica con hidróxido de sodio 0,1 N utilizando fenoltaleína como indicador o, en su caso, utilizando un potenciómetro para detectar el pH de 8,3 que corresponde al fin de la titulación.

8.3.2 Reactivos y materiales

8.3.2.1 Reactivos

- Hidróxido de Sodio 0,1 N (valorado) NaOH
- Solución indicadora al 1% de fenoltaleína (C₆H₄OH)₂COC₆H₄CO)
- Alcohol etílico (C₂H₅OH)
- Solución indicadora al 0,12% de cloruro o acetato de rosanilina
- Solución buffer pH 7
- Solución buffer pH 10

8.3.2.1.1 Preparación de soluciones

- Solución de fenoltaleína al 1%. Pesar 1,0 g de fenoltaleína en 100 mL de alcohol etílico (96°G. L).
 - Solución indicadora de cloruro o acetato de rosanilina al 0.12%. Pesar 0,12 de cloruro o acetato de rosanilina y disolverlo con alcohol etílico al 95% (v/v), adicionar 0,5 mL de ácido acético glacial y llevar a un volumen de 100 mL. Diluir 1 mL de esta solución con 500 mL de alcohol etílico al 95%.
- Almacenar ambas soluciones en frasco color ámbar.

8.3.2.2 Materiales

- Pipeta graduada de 10 mL
- Pipeta volumétrica de 20 mL
- Matraz de 125 mL

8.3.4. Equipo

- Bureta de 50 mL graduada en 0,1 mL.
- Potenciómetro

8.3.5. Procedimiento

Medir 20 mL de muestra en un matraz. Adicionar 40 mL de agua libre de CO₂. Añadir 2 mL de fenoltaleína y titular con hidróxido de sodio 0,1 N hasta la aparición de un color rosado persistente, cuando menos un minuto, empleando como guía de color una muestra de control de acetato o cloruro de rosanilina preparada de la siguiente manera:

Para el caso potenciométrico medir 20 mL de muestra adicionar 40 mL de agua libre de CO₂ y titular con hidróxido de sodio 0,1 N hasta pH de 8,3.

8.3.6. Cálculos y expresión de resultados

La acidez presente en la muestra, expresada en g/L, se calcula utilizando la siguiente fórmula:

$$V \times N \times 90$$

$$\text{Acidez (g/L)} = \frac{\text{-----}}{M}$$

M

donde:

V son los mililitros de solución de NaOH 0,1 N, gastados en la titulación.

N es la normalidad de la solución de NaOH.

M es el volumen de la muestra en mL.

Determinación de pH en alimentos

2. FUNDAMENTO

El método a que esta Norma se refiere, se basa en la medición electrométrica de la actividad de los iones hidrógeno presentes en una muestra del producto mediante un aparato medidor de pH (potenciómetro).

4 REACTIVOS Y MATERIALES

4.1 Reactivos

Los reactivos que a continuación se mencionan deben ser grado analítico, cuando se indique agua, se debe entender agua destilada libre de CO₂.

- a) Solución reguladora de pH 4
- b) Solución reguladora de pH 7
- c) Solución reguladora de pH 10

4.2 Materiales

- a) Utensilios apropiados para abrir los envases.
- b) Agitador de vidrio.
- c) Termómetro.
- d) Vasos de precipitados.
- e) Balanza con ± 0.1 g de sensibilidad.
- f) Embudo de separación.

5. APARATOS E INSTRUMENTOS

- a) Potenciómetro con su (s) electrodo (s) correspondiente(s).
- b) Agitador mecánico o electromagnético.
- c) Licuadora o mortero.

6. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

Los productos alimenticios podrán consistir de un líquido, una mezcla de líquido y sólido, los que pueden diferir en acidez. Otros productos alimenticios podrán ser semisólidos o de carácter sólido. Las siguientes preparaciones para examinar pH se recomiendan para cubrir esta situación.

6.1 Productos líquidos

Mezclar cuidadosamente la muestra hasta su homogeneización. (véase 6.2.2). Ajustar la temperatura a $20^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ y determinar su pH como se indica en 7.

6.2 Mezcla compuesta de sólido y líquido

6.2.1 Drenar el material del envase aplicando la Norma NMX-F-315 y registrar los pesos de las porciones líquida y sólida, manteniéndolas separadas.

6.2.2 Para aquellos productos en los que el líquido contenga aceite, separar la capa grasa en un embudo de separación y retener la capa acuosa. La capa grasa se descarta.

Ajustar la temperatura de la capa acuosa a $20^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ y determinar su pH como se indica en 7.

6.2.3 Remover la porción sólida del tamiz y colocarla en una licuadora o mortero.

Añadir de 10 a 20 ml de agua destilada recientemente hervida por cada 100 g de producto, con objeto de formar una pasta uniforme. Ajustar la temperatura a $20^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ y determinar su pH como se indica en 7.

6.2.4 Mezclar, para obtener una consistencia uniforme, la pasta anterior y la capa acuosa separada según los incisos 6.2.1 y 6.2.2 en la misma proporción que aparecen en el producto. Ajustar la temperatura de la mezcla a $20^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ y determine su pH como se indica en 7.

6.3 Productos sólidos

Proceder aplicando las indicaciones del inciso 6.2.3.

6.4 Productos semisólidos

Mezclar el producto para obtener una pasta uniforme. Adicionar cuando el caso lo requiera entre 10 y 20 ml de agua destilada recientemente hervida por cada 100 g de producto, ajustar la temperatura a $10^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ y determinar su pH como se indica en

7. PROCEDIMIENTO

7.1 Calibrar el potenciómetro con las soluciones reguladoras de pH 4, pH 7 y pH 10 según la acidez del producto.

7.2 Tomar una porción de la muestra ya preparada, mezclarla bien por medio de un agitador y ajustar su temperatura a $20^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$.

7.3 Sumergir él (los) electrodo (s) en la muestra de manera que los cubra perfectamente. Hacer la medición del pH. Sacar el (los) electrodo (s) y lavarlos (s) con agua.

8. EXPRESIÓN DE RESULTADOS

El valor del pH de la muestra se lee directamente en la escala del potenciómetro.

9. REPRODUCIBILIDAD

La diferencia máxima permisible en el resultado de pruebas efectuadas por duplicado, no debe exceder de 0.1 unidades de pH, en caso contrario se debe repetir la determinación.

A.1. Prueba del alcohol al 72 % v/v

A.1.1 FUNDAMENTO

Cuando se mezcla un volumen dado de alcohol con leche, provoca una deshidratación parcial de ciertos coloides hidrofílicos presentes en la muestra, desnaturalizándolos y alcanzando un estado de desequilibrio entre sus dos fases discontinuas (emulsión grasa y suspensión coloidal) por lo que flocculan. Este cambio sólo se produce cuando la mezcla final alcanza un cierto contenido de alcohol, abajo del cual la leche térmicamente estable no flocculará y por lo tanto la leche resistirá un tratamiento térmico.

A.1.2 REACTIVOS Y MATERIALES

A.1.2.1 Alcohol etílico al 72 % v/v

A.1.2.2 Tubos de ensayo de 10 ml.

A.1.2.3 Pipetas de 20 ml.

A.1.2.4 Alcohómetro o aerómetro graduado.

A.1.2.5 Probeta.

A.1.3 PROCEDIMIENTO

Medir 2 ml de muestra y colocarla en un tubo de ensayo, agregar 2 ml de alcohol etílico al 72 % v/v, mezclar y observar si hay formación de grumos.

A.1.4 CÁLCULOS Y EXPRESIÓN DE RESULTADOS

La formación de grumos (reacción positiva), es clara evidencia de que la estabilidad de la suspensión coloidal de la leche se encuentra afectada, por lo que no resistirá el proceso térmico de la pasteurización.

Expresar el resultado como positivo o negativo.

Determinación de la densidad en leche fluida

2. FUNDAMENTO

Este método se basa en la determinación de la densidad de la leche utilizando el lactodensímetro de Quévenne, haciendo la lectura a 288 K (15°C), aunque también puede efectuarse a otras temperaturas pero corrigiendo la lectura a 288 K (15°C)

3. MATERIALES

Probeta de vidrio, plástico o metal, de 500 cm³
Lactodensímetro de Quévenne.
Termómetro certificado de escala corta de 273 K - 323 K (0°C - 50°C).
Material común de laboratorio.

4 PROCEDIMIENTO

Colocar la muestra ya homogénea (haciéndola pasar previamente una o dos veces de un recipiente a otro) en la probeta, sobre una superficie plana y horizontal. Evitar la formación de espuma. Introducir el lactodensímetro en la parte central, evitando que se adhiera a la pared interna de la probeta. Transcurridos aproximadamente 30 segundos hacer la lectura en la escala correspondiente, evitando error de paralaje. Corregir la lectura del lactodensímetro de acuerdo con la temperatura de la leche al tiempo de la medición. La lectura correspondiente a la escala está considerada para determinaciones a 288 K (15°C).

Sumar 0.0002 por cada grado mayor de 288 K (15°C) y restar 0.0002 por cada grado menor de 288 K (15°C).

Cuando se utiliza el lactodensímetro de Quévenne, la escala de graduaciones indica las milésimas por agregar a la unidad (1.000) por cada grado de temperatura, superior o inferior a 288 K (15°C); sumando o restando respectivamente la cifra 0.2 a la lectura obtenida.

D.1 Reducción de azul de metileno

D.1.1 FUNDAMENTO

Cuando se añade una pequeña cantidad de azul de metileno a la leche y la mezcla se incuba a 37 °C, se produce una decoloración debida al metabolismo bacteriano; la velocidad a la que se produce el cambio de color es directamente proporcional al número de gérmenes presentes.

NOTA - La mayor parte de los microorganismos cuando se multiplican son capaces de modificar el potencial de oxido-reducción (rH) de la leche lo suficiente como para transformar el azul de metileno en su derivado incoloro, pero lo hacen de forma sensiblemente diferente según sus características. Algunas especies reducen el rH mucho más rápidamente que otras. Por lo tanto, esta prueba de reducción no se puede considerar como una prueba exacta para valorar el número de bacterias realmente presentes pero en la práctica resulta de gran utilidad.

D.1.2 MATERIALES Y REACTIVOS

D.1.2.1 Tubos con tapón de baquelita 16 X 160 estériles

D.1.2.2 Pipetas graduadas de 10 mL estériles

D.1.2.3 Frascos color ámbar con tapón de rosca de 200 mL estériles

D.1.2.4 Solución de azul de metileno, disolver 5 mg de azul de metileno en 100 mL de agua destilada estéril. Esta solución se conserva durante dos semanas protegida de la luz, en un frasco bien cerrado y a una de temperatura de 4 °C.

NOTA - Todo el material e instrumentos que tengan contacto con las muestras de leche por analizarse deben esterilizarse mediante:

horno, durante 2 horas a 170 - 175 °C ó 1 hora a 180 °C

autoclave, durante 15 minutos como mínimo a 121 °C + 1 °C

D.1.3 EQUIPO

D.1.3.1 Baño con circulación mecánica a 37 °C

D.1.4 PROCEDIMIENTO

Colocar de manera aséptica 10 mL de la muestra de leche por analizar en un tubo estéril y añadir de igual forma 1 mL de la solución de azul de metileno. Cerrar el tubo con el tapón e invertir el tubo una o dos veces para mezclar la leche con el colorante. Incubar a 37 °C en baño de agua, cuidando que el nivel del agua del baño sobrepase el de la mezcla de leche contenida en el tubo. Registrar con precisión la hora de la inmersión. Observar el tubo cada media hora, para controlar la reacción. Los tubos con la mezcla de leche decolorada se sacan del baño, registrando el tiempo en el que se ha producido la decoloración. Los tubos cuyo contenido

permanece azul, se invierten una vez cada media hora y se continúa la incubación hasta la desaparición del color azul. Es frecuente que en la zona de contacto de la leche con el aire persista una franja coloreada que no se toma en cuenta para la interpretación de la prueba.

D.1.5 INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

Se pueden calcular aproximadamente los resultados de la prueba del azul de metileno de la siguiente forma: Tiempo de decoloración	Número estimado de bacterias por mL	Calidad de la leche
5 horas	100 000 a 200 000	Buena
2 a 4 horas	200 000 a 2 millones	Buena a regular
menos de 2 horas	2 a 10 millones	Mala

ANEXO 2: Técnicas de Análisis Químico Proximal

Determinación de humedad por el Método de Estufa.

Principio del Método:

Este método se basa en la pérdida de peso debido a la evaporación del agua bajo condiciones establecidas.

Equipo:

Balanza analítica con sensibilidad de 0, 1 mg.

Estufa eléctrica con regulador de temperatura a 100 102º C.

Materiales:

Desecador de vidrio con sílica gel con indicador de humedad u otro desecante activo.

Cápsulas de vidrio, acero inoxidable, níquel o aluminio de 50 a 90 mm de diámetro y de 12 a 25 mm de altura.

Pinzas metálicas especiales para las cápsulas.

Procedimiento:

Preparación de la Muestra.

Cuando se tome la muestra operar tan rápido como sea posible. Evitar la absorción de humedad del medio ambiente durante la preparación de la muestra. Mezclar el producto transfiriéndolo a un frasco seco y bien tapado con capacidad aproximada al doble del tamaño de la muestra. Mezclar cuidadosamente agitando e invirtiendo repetidamente.

Sólo para muestras que presentan grumos o terrones, tamizar la muestra a través de una malla número 20 y si es necesario frotar el material a través de la malla y golpear vigorosamente.

Preparación de las Cápsulas.

Secar las cápsulas destapadas en una estufa controlada a 100-102°C por una hora. Taparlas e introducir las en un desecador y dejarlas enfriar a temperatura ambiente. Pesarlas con una precisión de 0,1 mg.

Secado de las Muestras.

En las cápsulas previamente secadas y pesadas, pesar con exactitud y distribuir homogéneamente de 1 a 3 g de muestra. Secar en estufa (100-102°C) durante 4 horas consecutivas, dejando las cápsulas descubiertas, pero manteniendo las tapas correspondientes identificadas cerca de ellas. Al término del periodo, introducir las en el desecador. Enfriar a temperatura ambiente y pesar.

Cálculos:

$$\% \text{ de Humedad} = \frac{m_1 - m_2}{m_1 - m_0} * 100$$

En donde:

m_0 = masa en gramos de la cápsula y la tapa.

m_1 = masa en gramos de la cápsula y tapa con la muestra antes de secar.

m_2 = masa en gramos de la cápsula y la tapa con la muestra después de secar.

Expresión de Resultados:

% Humedad

Grasa butírica

Fundamento:

La grasa existe en la leche en forma de emulsión que se estabiliza por medio de los fosfolípidos y las proteínas. El método Gerber se basa en la ruptura de la emulsión por la adición de ácido sulfúrico concentrado. La grasa libre puede separarse por centrifugación por la adición de una pequeña cantidad de alcohol amílico, el cual actúa como un agente tensoactivo que permite la separación nítida de las capas de grasa y la capa ácido-acuosa.

Reactivos:

Todos los reactivos que se indiquen deben ser grado analítico; cuando se indique agua, debe entenderse agua destilada.

Acido sulfúrico puro, de peso específico 1,820 +/- 0,005 a 20 °C aproximadamente al 90 %, libre de óxido de nitrógeno y otras impurezas. Se puede preparar a partir de H₂SO₄ 98 % w/w, midiendo aproximadamente 908 mL de éste más 160 mL de agua (verificar sistemáticamente el peso específico del ácido sulfúrico).

Alcohol amílico 98 % v/v, densidad a 20 °C de 0,808 a 0,818 g/mL. En lugar de alcohol amílico se puede utilizar alcohol iso-amílico libre de grasa y furfurool, de peso específico de 0,810-0,812 a 20 °C.

Tanto el ácido sulfúrico como el alcohol de cada remesa debe someterse a un control de pureza, colocando en un butirómetro, 11 mL de agua destilada, añadir 10 mL de ácido sulfúrico y 1 mL de alcohol amílico, cerrar el butirómetro y centrifugar durante 3 minutos. Después de 24 h de reposo, no debe observarse ningún trozo de grasa visible en la superficie.

Materiales:

Gradillas de acero inoxidable o de material plástico resistente a los ácidos para los butirómetros.

Pipetas volumétricas de 11 mL/20 °C.

Pipetas de 10mL.

Tapones tipo Gerber.

Equipos:

Butirómetro de vidrio, resistente a soluciones ácidas, con las características:

Butirómetro	Tipo de leche fluida	Nota
Rango de escala de 0 a 0,5%, con división de 0,02%	Leche descremada	Para este caso se puede utilizar el doble de volumen de leche y reactivos
Rango de escala de 0 a 4,0%, con división de 0,05%	Leche entera y parcialmente descremada	-
Rango de escala de 0 a 5%, 0 a 6%, 0 a 7%, 0 a 8%, con división de 0,1%	Leche entera	-
Rango de escala de 0 a 10%, con división de 0,2%	Leche entera con alto contenido de grasa	-

Centrífuga capaz de girar a una velocidad media de 1 200 rpm y puede o no tener control de temperatura.

Baño María con control de temperatura para mantener a 65 °C ± 2 °C y altura tal para sumergir los butirómetros en posición vertical, con toda la escala completamente inmersa.

Termómetro de mercurio con capacidad para medir 65 °C ± 2 °C.

Preparación de la muestra:

Antes de analizar las muestras de leche deben atemperarse a 20 °C. Es preciso alcanzar esta temperatura, porque todas las pipetas aforadas están calibradas a 20 °C.

Procedimiento:

Colocar los butirómetros limpios y secos en una gradilla, se introducen en cada uno de ellos 10 mL de ácido sulfúrico, cuidando de no impregnar el cuello del butirómetro.

Mezclar la muestra a analizar, invirtiendo el recipiente tapado en tres o cuatro tiempos e inmediatamente medir 11 mL de leche (realizar el análisis por duplicado), depositándola en los butirómetros, de la siguiente manera:

La punta de la pipeta debe estar apoyada en posición oblicua (aproximadamente en ángulo de 45°) contra la pared interna del cuello del butirómetro, para permitir que la leche se deslice a lo largo del vidrio y se superponga al ácido sulfúrico sin producir rastros de ennegrecimiento (evitar que el ácido y la leche se mezclen).

Para terminar, se añade 1,0 mL de alcohol amílico (ó alcohol isoamílico) dentro de cada butirómetro.

Tapar el butirómetro, utilizando el pulsador como punto de presión.

Agitar los butirómetros en dos tiempos; en un primer tiempo se debe realizar una agitación vigorosa, sin interrupción y sin inversiones, hasta conseguir que la leche y el ácido sulfúrico se mezclen y la proteína se disuelva.

Posteriormente invertir los butirómetros unas cuantas veces, permitiendo que el ácido de la sección de la escala graduada y el de la ampolla terminal se mezclen.

La agitación termina cuando se obtenga un tono rosado.

Durante esta operación se recomienda tener el butirómetro envuelto en una tela, ya que la mezcla de ácido sulfúrico con la leche ocasiona una reacción exotérmica.

Inmediatamente colocar los butirómetros en la centrífuga.

Centrifugar los butirómetros durante 5 minutos, a la velocidad de 1000 a 1200 rpm.

Una vez concluida la centrifugación, colocar los butirómetros, con la escala hacia arriba, en un baño María a 65 °C, durante 5 min-10 min (tiempo necesario para permitir la separación total de la grasa), es imprescindible que la capa de la grasa en la escala se mantenga enteramente inmersa en el agua caliente.

Remover el butirómetro del baño de agua y alzarlo verticalmente hasta que el menisco de la columna de grasa esté al nivel de los ojos. Ajustar la columna de grasa, girando con cuidado el tapón hasta colocar los límites de la capa de grasa dentro de la escala, haciendo coincidir la parte inferior de la capa de grasa con una de las divisiones de la escala del butirómetro.

La diferencia entre esta división y la correspondiente al menisco de la parte superior de la capa de grasa, indica el contenido de grasa de la leche en porcentaje w/v.

Cálculos y expresión de resultados:

El contenido de grasa presente en la muestra, expresado en porcentaje, se calcula de la siguiente manera:

$$\% \text{ de Grasa} = B - A$$

En donde:

A= es la lectura al inicio de la columna de grasa.

B= es la lectura de la parte superior de la columna de grasa.

Expresión de Resultados:

El resultado se expresa directamente en por ciento de la grasa contenida en la leche (% w/v) es decir g de grasa/100 mL de leche.

Para convertir el resultado expresado en peso/volumen (w/v), se divide el valor numérico de la lectura entre la densidad de la leche. Expresando el resultado en (w/w), es decir gramos/100 g de leche.

Método de Roesse-Gottlieb (Hidrólisis alcalina)

Fundamento:

El método descrito es una modificación al de Roesse-Gottlieb. Se utiliza amoníaco 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.

Reactivos:

Hidróxido de amonio G.R.

Alcohol etílico de 96°

Eter etílico (libre de peróxidos)

Eter de petróleo (P.E. 30 - 60°C)

Materiales:

Tubos de Roesse-Gottlieb o de Mojonier

Vasos de precipitados de 125 ml

Pipetas de 10 ml graduadas en 0,1 ml

Matraz bola de 250 ml

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

Rotavapor

Procedimiento:

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 ml de hidróxido de amonio y mezclar perfectamente. Agregar 10 ml de alcohol etílico, tapar y agitar fuertemente; Poner en baño maría durante una hora. Dejar enfriar a temperatura ambiente. 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. Verter en el matraz a peso constante. Lavando el tubo y el tapón del tubo con una mezcla de partes iguales de los dos éteres. Agregar estos lavados al matraz. Repetir la extracción del líquido sobrante en el tubo, dos veces más utilizando 25 ml de cada disolvente. Destilar los disolventes del matraz en un Rotavapor, a una temperatura apropiada que permita la eficiente evaporación, secar la grasa en estufa a 80°C, enfriar y pesar.

Cálculos:

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

En donde:

% G = Por ciento de grasa

PG = Peso de la grasa extraída

PM = Peso de la muestra

Expresión de Resultados:

% Grasa

Determinación de proteínas por micro Kjeldahl

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.

Reactivos:

Ácido sulfúrico concentrado al 98 % (libre de nitrógeno)

Hidróxido de sodio al 40 %

Sulfato de Sodio

Sulfato de Cobre pentahidratado

Ácido bórico al 2 %

Solución de ácido clorhídrico 0.01 N

Indicador Wesslob

Materiales:

Probeta de 50 mL

Material común de laboratorio (Vasos de precipitados y pipetas graduadas)

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.

Preparación de la muestra:

Agregar al tubo de digestión 1.5 g de sulfato de sodio y 0.2 g de sulfato de cobre pentahidratado. Calentar la leche a $38\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$. 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).

Procedimiento:

Digestión

Al inicio se fija una temperatura baja en el equipo de digestión ($180\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $230\text{ }^{\circ}\text{C}$) 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 $410\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $430\text{ }^{\circ}\text{C}$ 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.

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 0,1 N utilizando el indicador Wesslob o el potenciómetro. Registrar el volumen utilizado de HCl con una exactitud de 0,05 mL.

Cálculos:

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

$$\% \text{ de nitrógeno} = \frac{V * N * 0.014 * 100}{M}$$

En 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 miliequivalentes del nitrógeno.

Expresión de Resultados:

El porcentaje de proteínas se obtiene multiplicando el % de nitrógeno obtenido, expresado en peso/peso (%w/w), por el factor de 6.38.

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

$$\text{Proteína en } \frac{g}{L} = \% \text{ de proteína} * 10 * \text{densidad de la leche}$$

Determinación de reductores directos (Lactosa)

Fundamento:

Las proteínas de la muestra de leche son desnaturalizadas, utilizando soluciones de acetato de zinc y ferrocianuro de potasio. Se filtra y en el filtrado se determina la lactosa aprovechando su propiedad de ser un

azúcar reductor directo el cual reduce el cobre de sus sales alcalinas mediante una valoración volumétrica, según el método de Lane y Eynon.

Reactivos:

Acetato de zinc
Ácido acético glacial
Ferrocianuro de potasio
Sulfato de cobre pentahidratado
Tiosulfato de sodio
Yoduro de potasio
Tartrato de sodio y potasio
Hidróxido de sodio
Azul de metileno
Lactosa anhidra pura
Ácido benzoico

Preparación de soluciones:

Solución de acetato de zinc. Disolver 21.9 g de acetato de zinc (Cristalino) y 3 mL de ácido acético glacial en agua y diluir a 100 mL.

Solución de ferrocianuro de potasio. Disolver 10.6 g de ferrocianuro de potasio en 100 mL de agua destilada.

Solución (A) de sulfato de cobre. Disolver 34.639 g de sulfato de cobre pentahidratado en agua destilada y diluir a 500 mL, utilizando un matraz volumétrico de 500 mL; filtrar a través de papel filtro whatman número 4 o equivalente. Ajustar la solución determinando el contenido de cobre en una alícuota con tiosulfato de sodio 0.1 N y yoduro de potasio al 20 % hasta obtener 440.0 mg de cobre por cada 25 mL.

Solución (B) de tartrato de sodio y potasio. Disolver 173 g de tartrato de sodio y potasio y 50 g de hidróxido de sodio en agua y diluir a 500 mL; dejar reposar 2 días y filtrar a través de papel filtro whatman número 4 o equivalente.

Solución acuosa de azul de metileno al 0.2%. Disolver 0.2 g de azul de metileno en 100 mL de agua.

Solución patrón de lactosa. Disolver 10 g de lactosa anhidra pura y diluir a 1 litro con solución acuosa al 0.2% de ácido benzoico.

Titulación de la solución A - B. Medir con una pipeta volumétrica 5mL de la solución A y 5mL de la solución B en un matraz Erlenmeyer de 500mL. Agregar 100mL de agua, unos cuerpos de ebullición y calentar en parrilla cerrada a ebullición; agregar poco a poco con una bureta, solución patrón de lactosa hasta la casi reducción total del cobre. Añadir 1mL de azul de metileno y continuar la titulación hasta la desaparición del color azul. Calcular los miligramos de lactosa que se necesitan para titular la solución A - B.

Con este valor se calcula el tamaño de muestra necesaria.

50= este valor corresponde al factor (F) del reactivo.

Materiales:

Matraz volumétrico de 250 mL
Matraz Erlenmeyer de 250 mL
Matraz Erlenmeyer de 500 mL
Pipetas volumétricas de 5 mL
Pipetas graduadas de 5 mL
Bureta de 50 mL graduada en décimas
Placa caliente

Balanza analítica con sensibilidad de 0,1 mg.

Procedimiento:

Pesar la muestra homogénea en un vaso de precipitados de 50 mL, transferir cuantitativamente con 200 mL de agua destilada caliente (40 °C a 50 °C) a un matraz volumétrico de 250 mL, mezclar y dejar reposar 30 min. Agregar 4 mL de la solución de ferrocianuro de potasio y 4 mL de acetato de zinc, mezclar. Aforar y filtrar.

Medir con una 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 y calentar en parrilla cerrada a ebullición; agregar poco a poco con una bureta, el filtrado obtenido de la muestra, hasta la casi reducción total del cobre. Añadir 1 mL de azul de metileno y continuar la titulación hasta la desaparición del color azul.

En algunos casos, al tener un producto o un derivado de la leche deslactosada, se debe de realizar una hidrólisis.

****Hidrólisis:**

Después de agregar la muestra en el matraz de 500mL, se le agregan 50mL de agua a 70°C y 5mL de HCl (60%). Después poner en la estufa toda la noche. (O dependiendo del producto, puede requerir de un tiempo menor)

Cálculos y expresión de resultados:

La concentración de lactosa contenida en la muestra, expresada en porcentaje, se calcula con la siguiente fórmula:

$$\frac{mg\ encontrados}{100mL} = \frac{F_f}{mL\ gastados} * 100$$
$$\%Azúcares\ Reductoes\ Directos = \frac{mg\ encontrados}{mg\ muestra} * 100$$

En donde:

F_f es el factor de Fehling, en gramos de lactosa (50)

Fibra dietética total.

Fundamento:

Muestras en duplicado de alimentos secos y desgrasados son gelatinizados con α-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.

Materiales y equipos:

Balanza analítica con sensibilidad de 0,1 mg.

Baño maría termoregurable.

Bomba de vacío.

Crisol con placa porosa, porosidad #2 o equivalente de 40-60µm.

Desecador con silicagel o similar.

Estufa de vacío a 70°C o alternativamente estufa de aire capaz de operar a 105°C.

Mufla a 525°C.

Vasos de precipitados altos de 400-600mL.

pHmetro.

Homogeneizador.

Tamiz de 0.3-0.5mm.

Reactivos:

Etanol al 95%, p.a.

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

Acetona, p.a.

Tampón fosfato 0.08 M, pH 6.0; Disolver 1.4 g de fosfato dibásico de sodio anhidro (Na_2HPO_4) (o 1.753g dihidratado) y 9.86g de fosfato monobásico de sodio monohidratado (NaH_2PO_4) (o 10.94g dihidratado) en alrededor de 700mL de agua. Diluir a 1L con agua. Chequear el pH con el pHmetro.

α -amilasa termoestable. Mantener refrigerada.

Proteasa. Mantener refrigerada.

Amilogucosidasa. Mantener refrigerada.

Hidróxido de sodio 0.275N. Disolver 11.00 g de NaOH en 700mL de agua en un matraz volumétrico de 1L. Diluir a volumen con agua.

Ácido clorhídrico 0.325N. Diluir una solución stock de HCl de título conocido. Por ejemplo, 325mL de HCl 1N a 1L con agua.

Celite C-211, lavado con ácido.

Éter de petróleo.

Preparación de la muestra y extracción:

Homogeneizar, secar y moler la muestra en un homogeneizador. Pasar por un tamiz de malla de 0.3-0.5 mm. Extraer con éter de petróleo si el contenido de grasa es superior al 10%, tres veces con porciones de 25mL/g de muestra. Anotar a pérdida de peso por la remoción de la grasa y considerarlo en el cálculo final.

Procedimiento:

Pesar cuatro muestras de 1 gramo de cada material que se prueba en vasos de forma alta. Ponderaciones de la muestra no deben diferir en más de 20mg. Registro de pesos a 0.1mg.

Añadir 50mL de tampón fosfato de pH 6.0 a cada vaso.

Añadir 0.10mL α -amilasa para cada vaso y mezclar bien.

Cubra cada vaso con una lámina de aluminio y colocarlo en un baño de agua hirviendo. Agitar suavemente a intervalos de 5 minutos. Incubar durante 15 minutos después de que la temperatura interna de los vasos alcanza 95°C.

Permitir que las soluciones se enfríen a temperatura ambiente.

Ajustar el pH de las soluciones a 7.5 ± 0.2 mediante la adición de 10mL de NaOH 0.275N a cada vaso. Verificar el pH, ajustar si es necesario ya sea con NaOH o HCl.

Inmediatamente antes de su uso, hacer una de 50mg/mL de solución de la proteasa en tampón fosfato. Pipeta de 0.1mL (5mg de proteasa) en cada vaso.

Cubra cada vaso con una lámina de aluminio y coloque en baño de agua a 60°C. Con agitación continua, incubar durante 30 minutos después de que la temperatura interna de los vasos llega a 60°C.

Permitir que las soluciones se enfríen a temperatura ambiente.

Ajustar el pH de las soluciones a un pH entre 4.0 y 4.6 mediante la adición de 10mL de 0.325M de HCl a cada vaso. Verificar el pH, ajustar si es necesario ya sea con NaOH o HCl.

Añadir 0.1mL de amilogucosidasa a cada vaso.

Cubra cada vaso con una lámina de aluminio y coloque en baño de agua a 60°C. Con agitación continua, incubar durante 30 minutos después de que la temperatura interna de los vasos llega a 60°C.

Añadir 4 volúmenes de etanol de 95% a cada vaso.

Dejar las soluciones toda la noche a temperatura ambiente para permitir la precipitación total.

Filtración húmeda y redistribución de la cama de celite en cada crisol utilizando 78% de etanol. Aplicar succión suave para dibujar en celite frita como incluso colchoneta. Mantener la succión suave y transferir cuantitativamente el precipitado y la suspensión de cada vaso a su crisol respectivo.

Lavar el residuo con tres porciones de 20mL de etanol de 78%, dos porciones de 10 mL de etanol de 95%, y dos porciones de 10mL de acetona.

Una de las encías pueden formar con algunas muestras, captura de líquido. Romper la película de la superficie con una espátula mejorará la tasa de filtración. Asegúrese de enjuagar cualquier material adherido a la espátula en el crisol. El tiempo para la filtración y lavado puede variar desde 0.1 hasta 6 horas al crisol, con un promedio de 0.5 horas por cada crisol.

Secar los crisoles que contienen los residuos durante la noche en una estufa de aire a 105°C o en estufa de 70°C. Enfriar todos los crisoles en desecador y pesar. Restar el peso del crisol y del celite para determinar el peso del residuo. Registrar como m_1 .

Analizar proteínas usando N*6.25 como factor de conversión en el residuo de una de las muestras de duplicados. Registrar como P.

Calcinar el residuo de la segunda muestra del duplicado durante 5 horas a 525°C. Enfriar en desecador y pesar. Restar el peso del crisol y del celite para determinar cenizas. Registrar como C.

Efectuar la determinación del blanco en duplicado y en las mismas condiciones descritas en el procedimiento para el análisis de muestras.

Cálculo y expresión de resultados:

Determinación del blanco:

$$B(mg) = \text{masa del residuo} - P_B - C_B$$

En donde:

B=blanco

Masa del residuo= promedio de masa del residuo (mg) para la determinación del blanco.

P_B y C_B = masa (mg) de proteína y cenizas respectivamente en los residuos de los blancos.

Fibra dietética total:

$$\%FDT = \left[\frac{(\text{masa del residuo} - P - C - B)}{\text{masa de la muestra}} \right] * 100$$

En donde:

m=masa de la muestra=promedio de la masa de 2 muestras (mg)

m_1 =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

Determinación de Cenizas Totales

Fundamento:

La determinación en seco es el método más común para cuantificar la totalidad de minerales en alimentos y se basa en la descomposición de la materia orgánica quedando solamente materia inorgánica en la muestra, es eficiente ya que determina tanto cenizas solubles en agua, insolubles y solubles en medio ácido.

En este método toda la materia orgánica se oxida en ausencia de flama a una temperatura que fluctúa entre los 550 -600°C; el material inorgánico que no se volatiliza a esta temperatura se conoce como ceniza.

Materiales:

Crisol de porcelana.

Pinzas para crisol.

Desecador.

Aparatos e Instrumentos:

Parrilla eléctrica con regulador de temperatura.

Mufla.

Balanza analítica con sensibilidad de 0.1 mg.

Procedimiento:

En un crisol a masa constante, poner de 3 a 5 g de muestra por analizar; colocar el crisol con muestra en una parrilla y quemar lentamente el material hasta que ya no desprenda humos, evitando que se proyecte fuera del crisol. Llevar el crisol a una mufla y efectuar la calcinación completa. Dejar enfriar en la mufla, transferirlo al desecador para su completo enfriamiento y determinar la masa del crisol con cenizas.

Cálculos:

Calcular el porcentaje de cenizas con la siguiente formula:

$$\% \text{ de Cenizas} = \frac{(P - p)}{M} * 100$$

En donde:

P = Masa del crisol con las cenizas en gramos.

p = Masa de crisol vacío en gramos.

M = Masa de la muestra en gramos.

ANEXO 3: Técnicas de Análisis Microbiológico

Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa

2. Fundamento

El fundamento de la técnica consiste en contar las colonias, que se desarrollan en el medio de elección después de un cierto tiempo y temperatura de incubación, presuponiendo que cada colonia proviene de un microorganismo de la muestra bajo estudio. El método admite numerosas fuentes de variación, algunas de ellas controlables, pero sujetas a la influencia de varios factores.

4. Definición

Para fines de esta norma se entiende por:

Unidades Formadoras de Colonias (UFC), término que debe utilizarse para reportar la cuenta de colonias en placa, las cuales pueden surgir de una célula o de un cúmulo de células.

6. Reactivos y materiales

6.1 Reactivos

Los reactivos que a continuación se mencionan, deben ser grado analítico.

Cuando se indique agua, debe entenderse agua destilada, con pH cercano a la neutralidad.

Medio de Cultivo.

Agar Triptona-Extracto de Levadura (agar para cuenta estándar).

FORMULA

INGREDIENTES CANTIDADES

Extracto de levadura 2,5 g

Triptona 5,0 g

Dextrosa 1,0 g

Agar 15,0 g

Agua 1,0 l

Preparación del medio de cultivo.

Suspender los componentes del medio deshidratado en un litro de agua. Hervir hasta total disolución.

Distribuir en recipientes de vidrio esterilizables de capacidad no mayor de 500 ml, cantidades de aproximadamente la mitad del volumen del mismo. Esterilizar en autoclave a $121 \pm 1,0$ °C, durante 15 minutos.

El pH final del medio debe ser $7,0 \pm 0,2$ a 25°C.

Si el medio de cultivo es utilizado inmediatamente, enfriar a $45^{\circ}\text{C} \pm 1,0$ °C en baño de agua y mantenerlo a esta temperatura hasta antes de su uso. El medio no debe fundirse más de una vez.

En caso de medios deshidratados seguir las instrucciones del fabricante.

El medio de cultivo anterior es el de uso más generalizado. Para algunos alimentos en particular se requerirá de un medio de cultivo especial que se debe indicar al describir la técnica para ese alimento.

6.2 Materiales

Todo el material que tenga contacto con las muestras o los microorganismos debe estar estéril.

Se requiere, los materiales mencionados en la NOM-110-SSA1-1994, Preparación y Dilución de Muestras de Alimentos para su Análisis Microbiológico.

7. Aparatos e instrumentos

Se requiere, además de los mencionados en la NOM-110-SSA1-1994, Preparación y Dilución de Muestras de Alimentos para su Análisis Microbiológico, los siguientes:

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

Contador de colonias de campo obscuro, con luz adecuada, placa de cristal cuadrículada y lente amplificador.

Registrador mecánico o electrónico.

Microscopio óptico.

Baño de agua con o sin circulación mecánica, provista con termómetro calibrado con divisiones de hasta 1,0 °C y que mantenga la temperatura a $45 \pm 1,0$ °C.

8. Preparación de la muestra

Para la preparación de la muestra seguir la NOM-110-SSA1-1994, Preparación y Dilución de Muestras de Alimentos para su Análisis Microbiológico.

9. Procedimiento

9.1 Distribuir las cajas estériles en la mesa de trabajo de manera que la inoculación; la adición de medio de cultivo y homogenización, se puedan realizar cómoda y libremente. Marcar las cajas en sus tapas con los datos pertinentes previamente a su inoculación y correr por duplicado.

9.2 Después de inocular las diluciones de las muestras preparadas según la NOM-110-SSA1-1994, Preparación y Dilución de Muestras de Alimentos para su Análisis Microbiológico, en las cajas Petri, agregar de 12 a 15 ml del medio preparado, mezclarlo mediante 6 movimientos de derecha a izquierda, 6 en el sentido de las manecillas del reloj, 6 en sentido contrario y 6 de atrás a adelante, sobre una superficie lisa y horizontal hasta lograr una completa incorporación del inóculo en el medio; cuidar que el medio no moje la cubierta de las cajas. Dejar solidificar.

9.3 Incluir una caja sin inóculo por cada lote de medio y diluyente preparado como testigo de esterilidad.

9.4 El tiempo transcurrido desde el momento en que la muestra se incorpora al diluyente hasta que finalmente se adiciona el medio de cultivo a las cajas, no debe exceder de 20 minutos.

9.5 Incubar las cajas en posición invertida (la tapa hacia abajo) por el tiempo y la temperatura que se requieran, según el tipo de alimento y microorganismo de que se trate, véase el cuadro 1.

CUADRO 1

Grupo Bacteriano	Temperatura	Tiempo de Incubación
Termofílicos aerobios	$55 \pm 2^\circ\text{C}$	48 ± 2 h
Mesofílicos aerobios*	$35 \pm 2^\circ\text{C}$	48 ± 2 h
Psicrotróficos	$20 \pm 2^\circ\text{C}$	3 - 5 días
Psicrofílicos	$5 \pm 2^\circ\text{C}$	7 - 10 días

9.6 En la lectura seleccionar aquellas placas donde aparezcan entre 25 a 250 UFC, para disminuir el error en la cuenta.

9.7 Contar todas las colonias desarrolladas en las placas seleccionadas (excepto las de mohos y levaduras), incluyendo las colonias puntiformes. Hacer uso del microscopio para resolver los casos en los que no se pueden distinguir las colonias de las pequeñas partículas de alimento.

10. Expresión de resultados

10.1 Cálculo del método.

10.1.1 Después de la incubación, contar las placas que se encuentren en el intervalo de 25 a 250 colonias, usando el contador de colonias y el registrador. Las placas de al menos una de tres diluciones deben estar en el intervalo de 25 a 250. Cuando sólo una dilución está en el intervalo apropiado, véase el cuadro 2, ejemplo 1. Calcular la cuenta promedio por gramo o mililitro de dicha dilución y reportar.

10.1.2 Cuando dos diluciones están en el intervalo apropiado, determinar la cuenta promedio dada por cada dilución antes de promediar la cuenta de las dos diluciones para obtener la cuenta en placa por gramo o mililitro, véase el cuadro 2, ejemplo 2.

10.1.3 Con el fin de uniformar los criterios para el reporte de las cuentas en ensayos donde las placas presenten situaciones no contempladas en los ejemplos anteriores, se presentan las siguientes guías:

10.1.3.1 Placas con menos de 25 colonias.- Cuando las placas corridas para la menor dilución muestran cuentas de menos de 25 colonias, contar el número de colonias presentes en dicha dilución, promediar el número de colonias y multiplicar por el factor de dilución para obtener el valor estimado de cuenta en placa. Aclarar en su informe esta situación agregando la leyenda "valor estimado", véase el cuadro 2, ejemplo 3.

10.1.3.2 Placas con más de 250 colonias.- Cuando el número de colonias por placa exceda de 250, contar las colonias en aquellas porciones de la placa que sean representativas de la distribución de colonias. Contar por ejemplo, una cuarta parte o una mitad del área de la caja y multiplicar el valor obtenido por 4 ó 2, respectivamente. Si solamente pueden contarse algunos cuadros, considerar que el fondo de una caja Petri de

100 mm de diámetro contiene 65 cuadros de la cuadrícula del contador. Aclarar en el informe esta situación agregando la leyenda "valor estimado", véase el cuadro 2, ejemplo 4.

10.1.3.3 Colonias extendidas.- Las colonias extendidas pueden presentarse en las siguientes formas:

10.1.3.3.1 Cadenas de colonias no separadas claramente entre sí, que parecen ser causadas por la desintegración de un cúmulo de bacterias.

10.1.3.3.2 Colonias que se desarrollan en película entre el agar y el fondo de la caja.

10.1.3.3.3 Colonias que se desarrollan en película en la orilla de la caja sobre la superficie del agar.

10.1.3.3.4 Colonias de crecimiento extendido y en algunas ocasiones acompañadas de inhibición del crecimiento, que en conjunto exceden el 50% de la caja o represión del crecimiento que por sí mismo excede el 25% de la superficie de la caja.

10.1.3.3.5 Cuando es necesario contar en cajas que contienen colonias extendidas que no están incluidas en 10.1.3.3.4, contar cualquiera de los tipos 10.1.3.3.1, 10.1.3.3.2 ó 10.1.3.3.3, como provenientes de una sola fuente. En el caso de las colonias del tipo 10.1.3.3.1, si la caja contiene una sola cadena, contar como una sola colonia, si la caja contiene varias cadenas que parecen originarse de fuentes separadas, contar cada cadena como colonia individual. No contar cada colonia de la cadena individualmente. Las colonias del tipo 10.1.3.3.2 y 10.1.3.3.3 generalmente se observan como crecimiento diferenciable de otras colonias y se cuentan como tales. Los crecimientos tipo 10.1.3.3.4, reportarlos como crecimiento extendido. En caso de que una dilución se encuentre dentro del rango y otra dilución presente colonias de crecimiento extendido, reportar la dilución en la que se pueden contar las colonias, véase el cuadro 2, ejemplo 5

10.1.4 Placas sin colonias.- Cuando las placas de todas las diluciones no muestran colonias, reportar la cuenta en placa como menor que una vez el valor de la dilución más baja usada, véase el cuadro 2, ejemplo 6.

10.1.5 Placas corridas por duplicado, una con crecimiento dentro del intervalo adecuado y otra con más de 250 colonias.- Cuando una placa tiene entre 25 y 250 colonias y su duplicado más de 250 colonias, contar ambas placas incluyendo la que está fuera del intervalo para determinar la cuenta en placa, véase el cuadro 2, ejemplo 7.

10.1.6 Placas corridas por duplicado, una placa de cada dilución dentro del intervalo de 25 a 250 colonias.- Cuando una placa dentro de diferentes diluciones contiene el número de colonias especificadas en el intervalo, contar el número de colonias de las cuatro placas para calcular la cuenta en placa, véase el cuadro 2, ejemplo 8.

10.1.7 Placas corridas por duplicado, ambas placas de una dilución dentro del intervalo de 25 a 250 y sólo una de la otra dilución dentro del mismo. Contar las cuatro cajas incluyendo aquélla con menos de 25 o más de 250 colonias, para calcular la cuenta en placa, véase el cuadro 2, ejemplo 9.

10.1.8 Después de contabilizar las colonias en las placas seleccionadas, multiplicar por la inversa de la dilución para obtener el número de UFC por mililitro o gramo de la muestra. Redondear la cifra obtenida en la cuenta de manera que sólo aparezcan dos dígitos significativos al inicio de esta cifra. Para redondear, elevar el segundo dígito al número inmediato superior cuando el tercer dígito de la derecha sea cinco o mayor (por ejemplo: 128 redondear a 130). Si el tercer dígito es cuatro o menos, reemplazar el tercer dígito con cero y el segundo dígito mantenerlo igual (Por ejemplo: 2417 a 2400):

11. Informe de la prueba

Reportar como: Unidades formadoras de colonias, ___ UFC/g o ml, de bacterias aerobias en placa en agar tripton extracto de levadura o agar para cuenta estándar, incubadas _____ horas a _____ °C.

Método para la cuenta de microorganismos coliformes totales en placa

2. Fundamento

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.

6. Reactivos y materiales

6.1 Reactivos

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

6.1.1 Soluciones diluyentes

6.1.1.1 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 1,0 N.

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.

6.1.1.2 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 oscuro 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.

6.1.2 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.

6.2 Materiales

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.

Frascos de vidrio de 250 ml con tapón de rosca.

Tubos de 16 X 150 mm con tapón de rosca.

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

Cajas Petri.

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 $121 \pm 1,0^\circ\text{C}$.

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.

7. Aparatos e instrumentos

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

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

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 $45 \pm 1,0^\circ\text{C}$.

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

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

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

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

Registrador mecánico o electrónico.

Microscopio óptico.

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

8. Preparación de la muestra

La preparación de la muestra debe ser de acuerdo a lo establecido en la NOM-110-SSA1-1994 "Preparación y Dilución de Muestras de Alimentos para su Análisis Microbiológico".

9. Procedimiento

9.1 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.

9.2 Repetir el procedimiento tantas veces como diluciones decimales se requiera sembrar, utilizando una pipeta estéril diferente para cada dilución.

9.3 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.

9.4 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.

9.5 Preparar una caja control con 15 ml de medio para verificar la esterilidad.

9.6 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.

9.7 Invertir las placas y colocarlas en la incubadora a 35°C , durante 24 ± 2 horas.

9.8 Después del periodo especificado para la incubación, contar las colonias con el contador de colonias.

9.9 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.

10. Expresión de los resultados

10.1 Cálculo del método

10.1.1 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.

10.1.2 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.

10.1.3 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.

11. 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 bacterias coliformes. Técnica del número más probable.

2. Fundamento

El método se basa en que las bacterias coliformes, fermentan la lactosa incubadas a $35 \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 24 a 48 horas, resultando una producción de ácidos y gas el cual se manifiesta en las campanas de fermentación.

6. Reactivos y materiales

Los reactivos que a continuación se mencionan deben ser grado analítico. Cuando se indique agua debe entenderse como agua destilada con pH cercano a la neutralidad.

6.1 Reactivos

6.1.1 Soluciones diluyentes

6.1.1.1 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 N.

Llevar a un litro con agua.

Esterilizar durante 15 minutos a $121 \pm 1,0$ °C.

Conservar en refrigeración (solución concentrada).

Tomar 1,25 ml de la solución concentrada y llevar a un litro con agua.

Distribuir en porciones de 99, 90 y 9 ml según se requiera.

Esterilizar durante 15 minutos a 121 ± 1 °C.

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

6.1.1.2. 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 hidróxido de sodio 1 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 $121 \pm 1,0$ °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 oscuro 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.

6.1.2 Medios de cultivo.

Caldo lactosado (medio de enriquecimiento para agua potable y hielo).

Caldo lauril sulfato triptosa (medio de enriquecimiento selectivo).

Caldo lactosa bilis verde brillante (medio de confirmación).

En el caso del análisis de agua potable y hielo puede utilizarse caldo lactosado o caldo lauril sulfato triptosa con púrpura de bromocresol (concentración 0,01 g/l de medio), como alternativa al uso de campanas de fermentación. Los tubos positivos se manifiestan por el vire del indicador a color amarillo.

6.1.2.2 Caldo lauril sulfato triptosa.

CUADRO 2

Ingrediente	Medio de concentración 1,5 sencilla	Medio de concentración		
Triptosa 30,0	g 20,0	g		
Lactosa 7,5	g 5,0	g		
Fosfato dipotásico	4,125	g 2,75	g	
Fosfato monopotásico	4,125	g 2,75	g	
Cloruro de sodio 7,50	g 5,0	g		
Lauril sulfato de sodio	0,15	g 0,1	g	
Agua destilada	1000,0 ml	1000,0 ml		

Disolver los componentes en 1 l de agua, calentando si es necesario o el medio de cultivo completo deshidratado, siguiendo las instrucciones del fabricante.

Ajustar el pH de tal manera que después de la esterilización éste sea de $6,8 \pm 0,2$ a 25 °C.

Distribuir en volúmenes de 10 ml en tubos con dimensiones de 16 x 160 mm el medio de concentración sencilla y de 20 ml en tubos de 20 x 200 mm el medio de concentración 1,5, cada tubo debe tener campana de fermentación.

Esterilizar en autoclave por 15 minutos a $121 \pm 1,0$ °C.

Se recomienda almacenar el medio una vez preparado.

Las campanas de fermentación no deben de contener burbujas de aire después de la esterilización.

Se puede utilizar una concentración doble del medio de cultivo, en cuyo caso se emplearán 10 ml de caldo preparado, cuando se agreguen 10 ml de muestra.

6.2 Materiales

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.

Frascos de vidrio de 250 ml con tapón de rosca.

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

Tubos de cultivo 20 x 200 mm y de 16 x 160 mm con tapones metálicos o de rosca.

Campanas de fermentación (tubos de Durham).

Pipetas bacteriológicas graduadas de 10 y 1 ml.

Gradillas.

Asa de platino o nicromel de aproximadamente 3 mm de diámetro.

Todo el material que tenga contacto con las muestras bajo estudio debe esterilizarse mediante:

Horno, durante 2 horas a 170 a 175 °C o 1 h a 180 °C o autoclave, durante 15 minutos como mínimo a $121 \pm 1,0$ °C.

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

7. Aparatos e instrumentos

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

Incubadora con termostato que evite variaciones mayores de $\pm 1,0$ °C, provista con termómetro calibrado.

Termómetro de máximas y mínimas.

Autoclave que alcance una temperatura mínima de $121 \pm 1,0$ °C.

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

8. Preparación de la muestra

Las muestras deben prepararse y diluirse, siempre que sea posible, de acuerdo a la NOM-110-SSA1-1994.

Preparación y Dilución de Muestras de Alimentos para su Análisis Microbiológico.

9. Procedimiento

9.2 Para alimentos.

Preparar suficiente número de diluciones para asegurar que todos los tubos correspondientes a la última dilución rindan un resultado negativo.

9.2.1 Prueba presuntiva

9.2.1.1 Inoculación. Tomar tres tubos de medio de enriquecimiento de mayor concentración. Usar una pipeta estéril para transferir a cada tubo 10 ml de la muestra si es líquida o 10 ml de la dilución primaria inicial, en el caso de otros productos.

9.2.1.1.1 Tomar tres tubos de concentración sencilla del medio selectivo de enriquecimiento. Usar una pipeta estéril para transferir a cada uno de estos tubos 1 ml de la muestra si es líquida o 1 ml de la dilución primaria en el caso de otros productos.

9.2.1.1.2 Para las diluciones subsecuentes, continuar como se indica en el párrafo anterior, usando una pipeta diferente para cada dilución. Mezclar suavemente el inóculo con el medio.

9.2.1.2 Incubación. Incubar los tubos a $35 \pm 0,5$ °C por 24 ± 2 horas y observar si hay formación de gas, en caso contrario prolongar la incubación hasta 48 ± 2 horas.

9.2.2 Prueba confirmativa

De cada tubo que muestre formación de gas, tomar una azada y sembrar en un número igual de tubos con medio de confirmación. Incubar a $35 \pm 0,5$ °C por 24 ± 2 horas o si la formación de gas no se observa en este tiempo, prolongar la incubación por 48 ± 2 horas.

En esta Norma Oficial Mexicana se considera una combinación de tres tubos por cada dilución de la serie. Para algunos productos y siempre que se requiera una mayor precisión en los resultados, será necesario inocular una serie de cinco o diez tubos.

10. Expresión de los resultados

Tomar la serie de tubos de la prueba confirmativa que dé formación de gas después del periodo de incubación requerido y buscar el NMP en los cuadros correspondientes.

El cuadro 3 muestra algunos ejemplos que se pueden presentar.

Ejemplos: Ejemplo 1. Cuando sólo una dilución muestra tres tubos positivos, elegir ésta y las diluciones mayores posteriores.

Ejemplo 2. Cuando más de una dilución muestra tres tubos positivos y la última da menos de tres, elegir esta última y las dos diluciones anteriores más bajas.

Ejemplo 3. Cuando en ninguna dilución hay tres tubos positivos y éstos se encuentran en más de tres diluciones, seleccionar las dos diluciones mayores positivas y la siguiente.

Ejemplos 4 y 5. Cuando los tubos positivos sólo se encuentran en la muestra sin diluir (10 ml o 1 g) y en la primera dilución (1 ml o 10⁻¹ g), seleccionar las tres primeras diluciones para el cálculo del número más probable.

En cada caso se obtiene un número de tres cifras, lo cual es representado en los cuadros 4 al 7, según corresponda. En la columna que indica el número de tubos positivos se busca el índice del NMP.

La técnica de NMP puede admitir gran cantidad de variaciones. Los resultados obtenidos con esta técnica deben ser utilizados con precaución. Los límites de confianza están representados en los cuadros 4 al 7. Por ejemplo, para una muestra sólida con un NMP de 70 coliformes por gramo, los límites de confianza en el 95% de los casos variarán de 10 a 230 coliformes por gramo (ejemplo 3 del cuadro 3) y en un producto con 24 de NMP de coliformes por gramo, los límites de confianza son de 3,6 a 130 coliformes por gramo.

Método para la determinación de *Staphylococcus aureus* en alimentos

2. 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.

6. Reactivos y materiales

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.

6.1 Reactivos

6.1.1.2 Agua peptonada

FORMULA

Ingredientes	Cantidad
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.

6.1.2 Medios de cultivo

6.1.2.1 Medio de Baird-Parker

FORMULA

Ingredientes	Cantidad
Medio base (6.1.2.1.1)	95,0 ml
Solución de telurito de potasio (6.1.2.1.2)	1,0 ml
Emulsión de yema de huevo (6.1.2.1.3)	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.

6.1.2.1.2 Solución de telurito

FORMULA

Ingredientes	Cantidad
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.

6.1.2.1.3 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.

6.1.2.1.4 Solución salina isotónica

FORMULA

Ingredientes	Cantidad
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.

6.2 Materiales

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.

Cuchillos, pinzas, tijeras, cucharas, espátulas y separador de huevo.

Tubos de cultivo de 16 mm x 150 mm o frascos de 125 a 250 ml de capacidad.

Tubos de cultivo de 10 mm x 75 mm.

Cajas Petri de 90 a 100 mm de diámetro.

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.

Pipetas Pasteur.

Probetas.

Varillas de vidrio de 3,5 mm de diámetro aproximadamente y 20 cm de largo dobladas en ángulo recto.

Matraz Erlenmeyer con perlas de vidrio

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.

7. Aparatos

Horno para esterilizar que alcance 180°C.

Autoclave con termómetro.

Baño de agua con regulador de temperatura de 35 ± 0,5°C.

Baño de agua con regulador de temperatura de 45 ± 0,5°C.

Balanza con capacidad no mayor de 2,500 g y sensibilidad de 0,1 g.

Incubadora a 35 ± 1°C.

8. Preparación de la muestra

La preparación de la muestra se debe realizar de acuerdo a lo establecido en la NOM-110-SSA1-1994 "Preparación y Dilución de Muestras de Alimentos para su Análisis Microbiológico".

9. Procedimiento

9.1 Utilizando diferentes pipetas de 1 ml para cada dilución, depositar 0,1 ml sobre la superficie de las placas de agar Baird-Parker.

9.2 Distribuir el inóculo sobre la superficie del agar con varillas estériles de vidrio en ángulo recto, utilizando una para cada dilución.

9.3 Mantener las placas en su posición hasta que el inóculo sea absorbido por el agar.

9.4 Invertir las placas e incubar de 45 a 48 h a 35°C.

9.5 Seleccionar las placas que tengan entre 15 y 150 colonias típicas de *Staphylococcus aureus*; si no es posible, seleccionar las placas de las diluciones más altas no obstante tengan más de 150 colonias.

9.6 Cuando las placas tengan menos de 15 colonias típicas también pueden ser utilizadas y al informe se debe agregar la nota de "valor estimado".

9.7 Las colonias típicas son negras, circulares, brillantes, convexas, lisas, de diámetro de 1 a 2 mm y muestran una zona opaca y un halo claro alrededor de la colonia.

10. Cálculo y expresión de resultados

10.1 Cálculo

Hacer el cálculo del contenido de microorganismos en el producto tomando en cuenta el número de colonias totales, el número de colonias confirmadas, la dilución y el volumen inoculado (0,1 ml).

Ejemplo 1:

Si la caja tiene 80 colonias en la dilución 1:1000

Se toman 5 colonias para la prueba, de éstas dan 4 positivas, el cálculo es:

$$80 \times 4 = 64 \times 1000 \times 10 = 640\ 000$$

Ejemplo 2:

Si la caja tiene 14 colonias en la dilución 1:10

Se toman 3 colonias para la prueba, de éstas dan 2 positivas, el cálculo es:

$$14 \times 2 = 9,3 \times 10 \times 10 = 930$$

10.2 Expresión de los resultados:

Según ejemplo 1:

Informar como *Staphylococcus aureus* 640 000 UFC/g

Según ejemplo 2:

Informar como *Staphylococcus aureus* 930 UFC/g valor estimado

Si las pruebas confirmativas resultan negativas en todas las colonias probadas, informar como:

0 UFC/g en muestras directas

-10 UFC/g en muestras de dilución 1:10

-100 UFC/g en muestras de dilución 1:100

En la práctica los resultados pueden variar, esto dependerá del técnico que trabaje el método y el grado de confiabilidad del mismo, que en el 95% de los casos es de $\pm 16\%$ a $\pm 52\%$.

Método para la determinación de *Salmonella* en alimentos.

2. Fundamento

La presente técnica para la detección de *Salmonella* en alimentos, describe un esquema general que consiste de 5 pasos básicos:

2.1 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.

2.2 Enriquecimiento selectivo, empleado con el propósito de incrementar las poblaciones de *Salmonella* e inhibir otros organismos presentes en la muestra.

2.3 Selección en medios sólidos, en este paso se utilizan medios selectivos que restringen el crecimiento de otros géneros diferentes a *Salmonella* y permite el reconocimiento visual de colonias sospechosas.

2.4 Identificación bioquímica, este paso permite la identificación generica de los cultivos de *Salmonella* y la eliminación de cultivos sospechosos falsos.

2.5 Serotipificación, es una técnica serológica que permite la identificación específica de un cultivo.

6. Reactivos y materiales

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.

6.1 Reactivos

6.1.1 Medios de pre-enriquecimiento

6.1.1.1 Agua de peptona tamponada

Fórmula

Ingredientes	Cantidades	Unidades
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 $121 \pm 1^\circ\text{C}$.

6.1.2.2 Caldo tetrionato

Fórmula

Ingredientes	Cantidades	Unidades
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	1,0	l

pH final: $7,0 \pm 0,1$

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.

6.1.3 Medios de aislamiento

6.1.3.1 Agar verde brillante (VB)

Fórmula

Ingredientes	Cantidades	Unidades
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	1,0000	l

pH final: $6,9 \pm 0,2$

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.

6.1.3.4 Agar para Salmonella y Shigella (SS)

Fórmula

Ingredientes	Cantidades	Unidades
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 1,000 l

pH final: $7,0 \pm 0,2$

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.

6.1.5 Soluciones

6.1.5.2 Solución de yodo-yoduro

Fórmula

Ingredientes	Cantidades	Unidades
Cristales de yodo	6,0	g
Yoduro de potasio	6,0	g
Agua destilada	100,0	ml

Disolver los cristales y el yoduro de potasio en agua destilada hasta completar 100 ml.

Conservar en frasco ámbar.

6.1.5.3 Solución salina al 0,85%

Fórmula

Ingredientes	Cantidades	Unidades
Cloruro de sodio	0,85	g
Agua destilada	100,00	ml

Disolver el cloruro de sodio en el agua y esterilizar a $121^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 15 min.

6.2 Material

Matraces Erlenmeyer de 500 ml

Recipientes de boca ancha, de capacidad apropiada para contener las muestras simples y compuestas

Angulos de vidrio

Cucharas, bisturíes, cuchillos y pinzas

Tubos de ensaye de 16 x 150 mm y de 20 x 100 mm

Tubos para serología de 10 x 75 mm o de 13 x 100 mm

Pipetas bacteriológicas de 10,0 y 5,0 ml, graduadas en 0,1 ml y protegidas con tapón de algodón

Pipetas de 1 ml, con graduaciones de 0,01 ml

Cajas de petri estériles de vidrio o desechables

Rejillas para tubos de ensaye

Asa de platino o nicromel de aproximadamente 3 mm de diámetro

Papel pH (intervalo de 6-8) con graduaciones máximas de 0,4 unidades de pH para cambios de color

Todo el material que tenga contacto con las muestras bajo estudio debe esterilizarse mediante:

Horno, durante 2 horas a $170\text{-}175^{\circ}\text{C}$ o autoclave, durante 15 min como mínimo a $121^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$

7. Equipo

Horno para esterilizar que alcance los 180°C

Incubadora con termostato para evitar variaciones mayores de $\pm 0,1^{\circ}\text{C}$ y termómetro

Autoclave con termómetro o manómetro, probado con termómetro de máximas

Baño maría con termostato y termómetro

Balanza granataria con sensibilidad de 0,1 g

Licuada de una o dos velocidades controladas por un reóstato, con vasos esterilizables (vidrio o aluminio)

Mecheros Bunsen o Fisher

Potenciómetro

8. Procedimiento

8.1 Preparación de los alimentos para el aislamiento de Salmonella

Los siguientes métodos se basan en el análisis de 25 g de la muestra analítica en una proporción de 1:9 de muestra/caldo. Esta cantidad puede variarse siempre que se mantenga la misma proporción. Se recomienda una muestra de 25 g o más.

8.1.1 Procedimiento general para la preparación de muestras

Pesar asépticamente 25 g de la muestra en un vaso estéril de licuadora o en bolsa estéril para trabajar en homogeneizador peristáltico (stomacher). Adicionar 225 ml del medio de preenriquecimiento estéril (generalmente caldo lactosado, a menos que se indique otro) y licuar si es necesario durante un min. Transferir asépticamente la mezcla homogeneizada a un recipiente estéril de boca ancha con tapón de rosca y dejar reposar por 60 min a temperatura ambiente con la tapa bien enroscada. Mezclar bien y determinar el pH aproximado con papel pH. Ajustar, si es necesario, a un pH $6,8 \pm 0,2$ con hidróxido de sodio 1N o ácido clorhídrico 1N estériles. Mezclar y cubrir el recipiente enroscando suavemente la tapa.

Incubar 24 ± 2 h a 35°C . Continuar como se indica en 8.2.1.

8.1.2.4 Leche en polvo, entera, semidescremada o descremada

Seguir el procedimiento general para el pesado de la muestra y adicionarla lentamente a un matraz Erlenmeyer con 225 ml de solución verde brillante al 0,1%, procurando que el polvo quede en la superficie del líquido y se hidrate suavemente. Dejar la mezcla en reposo por 60 min, e incubar como se indica en 8.1.1.

8.1.2.9.1 Productos procesados térmicamente y productos secos. Se sigue el procedimiento señalado en 8.1.1 hasta la homogeneización. Si la muestra es en polvo o molida, el licuado puede omitirse. Después de reposar, mezclar bien y ajustar el pH como se indica en el procedimiento general. Para emulsionar las grasas, agregar los detergentes en las mismas proporciones y con las mismas recomendaciones que para el coco. La cantidad de los mismos dependerá en gran medida de la composición del alimento. Los detergentes no serán necesarios en los productos glandulares en polvo. Incubar las muestras como se indica en 8.1.1.

8.2 Aislamiento de Salmonella

8.2.1 Cerrar firmemente el tapón de rosca de los matraces con los cultivos de preenriquecimiento y agitar suavemente, transferir respectivamente 1 ml de la mezcla a un tubo que contenga 10 ml de caldo tetratonato y a otro con 10 ml de caldo selenito cistina. Como alternativa, en sustitución del caldo tetratonato puede emplearse el medio Vassiliadis-Rappaport.

8.2.2 Incubar de 18 a 24 h a 35°C o, para alimentos fuertemente contaminados a 42°C por el mismo periodo. Estriar los productos que fueron directamente enriquecidos en medios selectivos.

8.2.3 Mezclar el tubo con caldo selenito cistina y estriar en agar xilosa lisina desoxicolato (XLD), agar verde brillante (VB) y una tercera caja con cualquiera de los medios selectivos adicionales (agar entérico Hektoen, agar Sulfito de Bismuto o Agar SS).

Efectuar el mismo procedimiento para el caldo tetratonato.

Incubar las placas 24 ± 2 h a 35°C .

8.2.4 Examinar las placas para investigar la presencia de colonias típicas de Salmonella, de acuerdo con las siguientes características:

Agar XLD: colonias rosas o rojas que pueden ser transparentes con o sin centro negro. En algunos casos las colonias pueden aparecer completamente negras.

Agar VB: colonias rojas o rosas que pueden ser transparentes rodeadas por medio enrojado; las bacterias fermentadoras de la lactosa dan colonias amarillas.

Agar entérico Hektoen: colonias verdes o azulverdes con o sin centro negro. En algunos casos las colonias pueden aparecer completamente negras.

Agar Sulfito de Bismuto: las colonias típicas de Salmonella pueden ser cafés, grises o negras; con o sin brillo metálico. Generalmente el medio circundante (halo) es café, tornándose posteriormente negro. Algunas cepas producen colonias verdes sin la formación del halo oscuro. Si las placas no muestran colonias típicas o no se observa crecimiento, incubar 24 h adicionales.

Agar SS: colonias translúcidas, ocasionalmente opacas. Algunas colonias dan centro negro. Las colonias fermentadoras de la lactosa son rojas.

9. Cálculo y expresión de resultados

9.3 Informe de resultados

Informar: presencia o ausencia de Salmonella en _____ g o _____ ml de muestra.

Método para la cuenta de mohos y levaduras en alimentos

2. 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 $25 \pm 1^\circ\text{C}$, dando como resultado el crecimiento de colonias características para este tipo de microorganismos.

6. Reactivos y materiales

6.1 Reactivos

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

6.1.1 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 $45 \pm 1^\circ\text{C}$, acidificar a un pH de $3,5 \pm 0,1$ 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.

6.1.2 Soluciones.

6.1.2.1 Solución reguladora de fosfatos (solución concentrada)

FORMULA

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.

6.1.2.2 Solución estéril de ácido tartárico al 10%

FORMULA

INGREDIENTES CANTIDADES

Acido tartárico 10,0 g

Agua destilada 100,0 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 $0,45 \mu\text{m}$.

6.2 Materiales.

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.

Cajas Petri.

Frascos de vidrio de 250 ml con tapón de rosca.

Tubos de 16 x 150 mm con tapón de rosca.

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

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 $121 \pm 1,0^\circ\text{C}$.

7. Aparatos e instrumentos

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

Incubadora con termostato que pueda ser mantenido a $25 \pm 1,0^\circ\text{C}$ provista con termómetro calibrado.

Autoclave que alcance una temperatura mínima de $121 \pm 1,0^\circ\text{C}$.

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 $45 \pm 1,0^\circ\text{C}$.

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

Registrador mecánico o electrónico.

Microscopio óptico.

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

8. Preparación de la muestra

La preparación de la muestra debe ser de acuerdo a lo establecido en la NOM-110-SSA1-1994. Preparación y Dilución de Muestras de Alimentos para su Análisis Microbiológico.

9. Procedimiento

9.1 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.

9.2 Repetir el procedimiento tantas veces como diluciones decimales se requiera sembrar, utilizando una pipeta estéril diferente para cada dilución.

9.3 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.

9.4 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.

9.5 Preparar una caja control con 15 ml de medio, para verificar la esterilidad.

9.6 Invertir las cajas y colocarlas en la incubadora a $25 \pm 1^\circ\text{C}$.

9.7 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 aún de 3 días. En este caso, informar el periodo de incubación de 3 o 4 días en los resultados del análisis.

9.8 Si es necesario, cuando la morfología colonial no sea suficiente, examinar microscópicamente para distinguir las colonias de levaduras y mohos de las bacterias.

10. 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 de la NOM-092-SSA1-1994. Método para la Cuenta de Bacterias Aerobias en Placa, para la expresión de resultados.

11. 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 papa-dextrosa acidificado, incubadas a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 5 días.

ANEXO 4: Metodología Para el Recuento de *Lactobacillus paracasei*. Subsp., *paracasei*

1.1 REACTIVOS

- Agua peptonada
- Agar Man, Rogosa y Sharpe (MRS)

Ingredientes	Cantidades	Unidad
Proteosa peptona No. 3	10	g
Extracto de carne	10	g
Extracto de levadura	5	g
Glucosa	20	g
Monoleato de sorbitán	1	ml
Fosfato di potásico	2	g
Acetato de sodio	5	g
Citrato de amonio	2	g
Sulfato de magnesio	0.2	g
Sulfato de manganeso	0.05	g
Agar	13	g

1.2 PROCEDIMIENTO

Para obtener resultados más confiables se realizó la inoculación de las muestras de estudio, el mismo día de su elaboración.

Se deben seguir las recomendaciones de uso sugeridas por el proveedor del microorganismo probiótico. Se debe tomar en cuenta que cada microorganismo probiótico requiere condiciones y/o sugerencias de uso específicas de acuerdo al proveedor y/o fabricante.

- a) Pesar de forma aséptica y en condiciones estériles 1g del microorganismo *Lactobacillus paracasei subsp. Paracasei*
- b) Diluir 1g del microorganismo *Lactobacillus paracasei subsp. paracasei* en 100ml de leche de vaca entera pasteurizada.
- c) Agregar 8 ml de la leche inoculada con *Lactobacillus paracasei subsp. Paracasei* por cada kg de muestra de estudio, es decir la muestra 1 es el dulce de leche funcional adicionado con inulina e inoculado con *Lactobacillus paracasei subsp. Paracasei*, la muestra 2 es el dulce de leche funcional sin inulina en su formulación e inoculado con el microorganismo *Lactobacillus paracasei subsp. Paracasei*.
- d) Homogenizar hasta la completa incorporación de la leche sobre el dulce de leche.
- e) Distribuir en frascos de vidrio estériles en porciones de 15 g, tantos como sea necesario, para esta prueba se distribuyó en 9 frascos con 15 gramos cada uno.

- f) Etiquetar un frasco con la leyenda “día cero”, el siguiente frasco con la leyenda “día 4”, de esta forma sucesivamente hasta el noveno frasco que tendrá la leyenda “día 32”.
- g) En una botella de dilución diluir 10g de cada dulce de leche (marcados con la leyenda “día 0” inoculado con el cultivo probiótico por separado, con 90 ml de agua peptonada. Esta será la muestra base
- h) Homogeneizar hasta la completa incorporación de la muestra en el agua peptonada
- i) Marcar las cajas Petri con las diluciones pertinentes, para este caso se manejaron diluciones de 10^{-2} a 10^{-11} . El límite de diluciones se estableció en base al conteo inicial del cultivo probiótico, proporcionado por el proveedor del mismo.
- j) De igual forma marcar los viales que contienen 9 ml de agua peptonada con las mismas diluciones (de 10^{-2} a 10^{-11}).
- k) Con la ayuda de una pipeta estéril distribuir 1 ml de la muestra base sobre el vial marcado con la dilución 10^{-2} .
- l) Agitar suavemente por 3 segundos
- m) Del vial marcado con la dilución 10^{-2} , ya inoculado, mediante una pipeta estéril tomar una alícuota de 1ml y transferirla al vial marcado con la dilución 10^{-3} , agite suavemente durante 3 segundos. Repetir este procedimiento hasta inocular el vial marcado con la dilución 10^{-11} . Realizar este procedimiento para cada muestra de estudio.
- n) Utilizando una pipeta estéril transferir 0.1 ml del vial inoculado, marcado con la dilución 10^{-2} y transferir este volumen a una caja Petri estéril, marcada con la misma dilución.
- o) Tomar una alícuota de 0.1ml del vial con la dilución 10^{-3} , transferir el volumen a la caja Petri marcada con la misma dilución, repetir este procedimiento para las diluciones restantes y para todas las muestras de estudio.
- p) Agregar aproximadamente 15 ml del medio MRS para conteo de *Lactobacillus* a cada una de las cajas Petri inoculadas. Preparar una caja Petri sin inóculo como muestra testigo por cada muestra de estudio.
- q) En una superficie plana mover de izquierda a derecha 6 tiempos y de adelante hacia atrás 6 tiempos, para que el inóculo se distribuya por todo el medio.
- r) Dejar solidificar.
- s) Una vez que el agar haya solidificado, añadir una capa de aproximadamente 5ml de agar MRS sobre las cajas Petri, para evitar el esparcimiento de las colonias.
- t) Invertir las cajas Petri y colocarlas en un desecador, provisto con una vela y un vaso con agua corriente.
- u) Encender la vela y agregar 2 pastillas de alka Seltzer en el vaso con agua, esperar 8 segundos. Para que el CO_2 desplace al oxígeno fuera del desecador
- v) Poner la tapa al desecador y sellar con cinta transparente las uniones de la boca del desecador y la tapa del mismo. De esta forma se asegura la anaerobiosis dentro del desecador
- w) Incubar a una temperatura de $33 \pm 1^\circ\text{C}$, durante 4 días.

No se debe destapar ni mover el desecador antes del periodo de incubación, esto para asegurar la anaerobiosis, una vez transcurrido el tiempo de incubación. Realizar el conteo de las colonias formadas sobre el agar. Se debe repetir este procedimiento para las muestras marcadas con la leyenda día 4, el mismo día que se realiza la lectura de las muestras del día 0. De igual forma una vez transcurridos los 4 días de incubación de las muestras marcadas con “día 4”, se procede a realizar la lectura de las placas de estas muestras y se realiza la siembra de las muestras marcadas con la leyenda “día 8”. Este procedimiento se repite hasta llegar a las muestras marcadas con la leyenda “día 32”.

En cada caso contar las colonias formadas sobre el agar y multiplicar el número de estas por el inverso de la dilución.

INTERPRETACION DE RESULTADOS

Después del periodo de incubación, contar el número de colonias, presentes en cada placa que contenga entre 16 y 150 colonias características, las colonias características de *Lactobacillus* en el medio MRS son colonias blancas, de aspecto brillante, para realizar el conteo de *Lactobacillus*, se debe seguir la metodología descrita en la NOM-092-SSA1-1994.