Universidad del Azuay

Facultad de Ciencia y Tecnología

Escuela de Ingeniería en Alimentos

“DISEÑO DE MODELOS ESTANDARIZADOS DE HIDRÓLISIS DE LACTOSA COMO SUSTRATO PARA FERMENTACIÓN LÁCTICA”

Trabajo de graduación previo a la obtención del título de Ingeniera en Alimentos

Autora:

Ana Cristina Bustamante Gavilanes

Director:

Claudio Esteban Sánchez Jáuregui

Cuenca-Ecuador

2014

DEDICATORIA

Quiero dedicar este trabajo en primer lugar a Dios quien ha guiado mi camino siempre, también a mis padres, hermanos que han sido mi apoyo permanente durante toda etapa de preparación profesional.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer especialmente al Ing. Claudio Sánchez Jáuregui director de este proyecto de grado quien en todo momento me apoyó como un guía para poder salir adelante.

De la misma, forma quiero agradecer a todas las personas que laboran dentro de los laboratorios de la Universidad del Azuay, Ing. Mónica Tinoco, Ing. Fernanda Rosales, Ing. Johana Tacuri, Dr. Piercosimo Tripaldi, quienes han sido de mucha ayuda.

Finalmente agradezco a todas las personas quienes estuvieron siempre ahí con su apoyo para poder cumplir con esta meta propuesta.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

Dedicatoria II
Agradecimientos III
Índice de tablas VI
Índice de figuras VII
Resumen IX
Abstract X
Introducción 2

CAPÍTULO I : LACTOSA

1.1.1 Generalidades 4
1.1.3. Estructura 5
1.1.4. Propiedades Físicas Y Químicas 7
1.1.5. Hidrólisis 11
1.1.6 Métodos de determinación de lactosa 13
1.1.7 Usos 13
1.1.8 Glucosa y Galactosa 14
1.1.8.3 Ruta metabólica de la glucosa y galactosa 14

CAPITULO II: ENZIMOLOGÍA

2.1.1. Generalidades 17
2.1.2. Mecanismo de acción 17
2.1.3. Enzimas importantes presentes en la leche 18
2.1.4 Enzima β- Galactosidasa 19

CAPITULO III: TAXONOMÍA DE LAS BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS (BAL)

3.1.2. Probióticos 24
3.1.3. Prebióticos 26

CAPITULO IV: MATERIALES Y MÉTODOS

4.1.1 Materia prima 28
4.1.2 Inoculación 28
4.1.3 Análisis de muestras hidrolizadas 29
4.1.4. Crecmiento de Cepas LAB 32
4.1.5. Análisis Sensorial 33

CAPITULO V: RESULTADOS

5.1.1. Hidrólisis de muestras 35
5.1.2. Inoculación de muestras..... 49
5.1.3. Curva de Acidificación 49
5.1.4. Análisis Sensorial 50

CONCLUSIONES……52
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS: 55
ANEXOS..... …….60

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Hidrolisis de lactosa a temperatura de 4°C por 12 horas.....34

Tabla 2: Hidrolisis de lactosa a temperatura de 32°C por 2 horas.....35

Tabla 3: Hidrolisis de lactosa a temperatura de 50°C por 30 minutos.....36

Tabla 4: Resumen de tiempo, temperatura, cantidad de enzima utilizada y resultados del % de hidrolisis en la primera muestra.....37

Tabla 5: Contenido de lactosa inicial; Ácido láctico, lactosa y glucosa producida después del proceso de hidrolisis..... 38

Tabla 6: Hidrolisis de lactosa a temperatura de 4°C por 12 horas.....39

Tabla 7: Hidrolisis de lactosa a temperatura de 32°C por dos horas.....40

Tabla 8: Hidrolisis de lactosa a temperatura de 50°C por treinta minutos.....41

Tabla 9: Resumen de tiempo, temperatura, cantidad de enzima utilizada y resultados del % de hidrolisis en la segunda muestra..... 42

Tabla 10: Contenido de lactosa inicial; Ácido láctico, lactosa y glucosa producida después del proceso de hidrolisis, en la segunda muestra..... 43

Tabla11: Hidrolisis de lactosa a temperatura de 4°C por 12 horas..... 43

Tabla12: Hidrolisis de lactosa a temperatura de 32°C por 2 horas..... 44

Tabla13: Hidrolisis de lactosa a temperatura de 50°C por 30 min.....45

Tabla 14: Resumen de tiempo, temperatura, cantidad de enzima utilizada y resultados del % de hidrolisis en la tercera muestra.....46

Tabla 15: Contenido de lactosa inicial; Ácido láctico, lactosa y glucosa producida después del proceso de hidrolisis, en la tercer muestra..... 47

Tabla 16: Recuento de cepas LAB en agar MRS.....48

Tabla 17: Control de Acidez..... 48

Tabla 18: Resultados obtenidos de la ficha de catación en relación al aspecto visual..... 49

Tabla 19: Resultados obtenidos de la ficha de catación en relación al sentido del olfato.....50

Tabla 20: Resultados obtenidos de la ficha de catación en relación al sabor.....51

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Síntesis de formación de la lactosa..... 5
Figura 2: Composición de la lactosa. 6
Figura 3: Propiedades físicas de lactosa 6
Figura 4: Hidrolisis de lactosa por acción enzimática y formación de ácido láctico. . 8
Figura 5: Solubilidad de la lactosa en agua..... 8
Figura 6: Esquema de fermentación de la lactosa. 10
Figura 7 : Producción de oligosacáridos durante la hidrolisis de lactosa por β -galactosidasa. 12
Figura 8: Representación de la ruta metabólica de síntesis de glucosa y galactosa. 15
Figura 9: Principales enzimas presentes en la leche y sus caracteristicas.....18
Figura 10: Propiedades de diferentes β-galactosidasas.....20
Figura 11: Proceso de Hidrólisis de lactosa. 21
Figura 12: Utilización de las principales bacterias lácticas…….22
Figura 13: Bacterias consideradas como probióticos……..….25
Figura 14: Curva del porcentaje hidrólisis a 4°C por 12 horas…….....35
Figura 15: Hidrolisis de lactosa a temperatura de 32°C por 2 horas……..……..…..36
Figura 16: Hidrolisis de lactosa a temperatura de 50°C por 30 minutos……..……..……..….37
Figura 17: Contenido de lactosa, glucosa y galactosa en función del tiempo……..……...…38
Figura 18: Hidrolisis de lactosa a temperatura de 4°C por 12 horas……..…….....39
Figura 19: Hidrolisis de lactosa a temperatura de 32°C por 2 horas…….....40
Figura 20: Hidrolisis de lactosa a temperatura de 50°C por 30 minutos……..……...41

Figura 21: Resultado de la muestra dos del contenido de lactosa, glucosa y galactosa en función del tiempo……..…….42
Figura 22: Hidrolisis de lactosa a temperatura de 4°C por 12 horas……...…..……...…….....44
Figura 23: Hidrolisis de lactosa a temperatura de 32°C por 2 horas……..……...45
Figura 24: Hidrolisis de lactosa a temperatura de 50°C por 30 minutos……..……..46
Figura 25: Contenido de azúcares en la tercera muestra……..47
Figura 26: Curva de Acidificación en función del tiempo de almacenamiento..…….49
Figura 27: Estadísticas resultantes del aspecto visual obtenidos en la ficha de catación……..…….. 50
Figura 28: Estadísticas resultantes obtenidos en la ficha de catación para el sentido del olfato ……..……..…….51
Figura 29: Estadísticas resultantes de la ficha de catación para el sabor……..……52

DISEÑO DE MODELOS ESTANDARIZADOS DE HIDRÓLISIS DE LACTOSA COMO SUSTRATO PARA FERMENTACIÓN LÁCTICA

RESUMEN

Mediante estudios realizados a nivel mundial existe aproximadamente un 70% de personas no logran tolerar la lactosa, para ello es necesario diseñar estándares que controlen el proceso de hidrólisis y a su vez permitan cuantificar las concentraciones de glucosa, galactosa, lactosa generadas; En el presente estudio se realizó una hidrólisis enzimática de la leche mediante β-galactosidasa a diferentes temperaturas, seleccionando la muestra con mejores resultados para proceder a la elaboración de yogurt. Simultáneamente se analizó microbiológicamente para determinar la inocuidad y viabilidad de crecimiento de las cepas utilizadas en medios de cultivo específicos, obteniéndose resultados favorables. El producto estandarizado cumple con la normativa vigente para leches fermentadas siendo considerado como un funcional y a su vez probiótico, pudiendo ser consumido por personas que presentan intolerancia a la lactosa y necesitan productos alternativos para su nutrición.

Palabras clave: lactosa, hidrólisis enzimática, β–galactosidasa, *glucosa, galactosa*

Ing. Fausto Tobías Parra Parra

Director de Escuela

Ing. Claudio Sánchez Jáuregui

Director del Trabajo de Grado

Ana Cristina Bustamante Gavilanes

Autora del Trabajo de Grado

ABSTRACT

"DESIGN OF STANDARDIZED LACTOSE HYDROLYSIS MODELS AS SUBSTRATE TO LACTIC FERMENTATION"

Through worldwide studies it is known that about 70% of people are lactose intolerant. For this reason, it is required to design standards in order to control the hydrolysis process, and in turn quantify the concentrations of glucose, galactose, and lactose produced. In the present study, a milk enzymatic hydrolysis by β - galactosidase was performed at different temperatures, selecting the sample with the best results to proceed with yogurt production. Simultaneously, we performed a microbiologically analysis to determine the safety and feasibility of strains growth used in specific culture media, yielding favorable results. The standardized product complies with current regulations for fermented milks, being considered as functional and at the same time as probiotic, and which could be consumed by people with lactose intolerance that need alternatives for nourishment.

Keywords: Lactose, Enzymatic Hydrolysis, β – Galactosidase, Glucose, Galactose.

Ing. Fausto Tobías Parra
School Director

Ing. Claudio Sánchez Jáuregui
Thesis Director

Ana Cristina Bustamante
Author

UNIVERSIDAD DEL AZUAY
DPTO. IDIOMAS

Translated by,
Lic. Lourdes Crespo

Ana Cristina Bustamante Gavilanes

Trabajo de graduación

Ing. Claudio Sánchez Jáuregui

Enero 2014

DISEÑO DE MODELOS ESTANDARIZADOS DE HIDRÓLISIS DE LACTOSA COMO SUSTRATO PARA FERMENTACIÓN LÁCTICA

INTRODUCCIÓN

Desde el punto fisicoquímico la leche es considerada como un fluido muy complejo debido a sus componentes, los mismos que son producidos en tres fases. La primera y en mayor proporción esta constituida por una solución de lactosa, La segunda, se conforma por sales orgánicas e inorgánicas, vitaminas; mientras que la ultima está formada de pequeñas porciones de moléculas disueltas en el agua.

La lactosa es el principal carbohidrato de la leche, encontrandose en concentraciones próximas al 5%, presenta multipes usos en nuestro medio, entre ellos alimentación animal, formulación de fármacos y fermentación alimentaria. Pero a su vez, es la causante de varias controversias, debido que en algunos casos puede presentar una limitada capacidad de digestión tras su ingesta, hechos que pueden restringir sus aplicaciones para la industria (*Finocehiaro C., 1980*).

Como una breve reseña historica se puede mencionar que “en el período comprendido entre 1955 y 1975, después de la II Guerra Mundial, la U.S. Agency for International Development envió numerosas toneladas de leche en polvo a países necesitados, estos envíos de leche eran los causantes de varios episodios de diarreas y malestar gástrico intestinal en los destinatarios. En 1965, un equipo de investigadores del Johns Hopkins Medical School (EE.UU.) descubrió que muchas de las personas presentaban este cuadro clínico debido a que no podían digerir la lactosa.” (*Piñeiro E., 2009*)

En la actualidad, estudios realizados determinan que aproximadamente un 70% de la población a nivel mundial presenta problemas de intolerancia, esto se produce por la disminución o ausencia de lactasa en el tracto digestivo, esta es la enzima responsable de transformar este hidrato de carbono en azúcares más sencillos permitiendo su fácil absorción en el intestino. (*Criado M, 2014*)

La deficiencia de lactasa puede presentarse por diferentes causas, entre ellas: por carácter hereditario, presentandose principalmente en adolescentes, puede ser adquirida, generado casi siempre cuando existe algún cuadro de gastroenteritis, el mismo que es ocasionando por daños en la mucosa intestinal, y por ultimo; congénitamente, que hace referencia a una ausencia total de lactasa durante las primeras horas del nacimiento. (*Zúñiga G., 2005*)

Los sintomas que se presentan estarán en función de la cantidad de lactosa ingerida y de la tolerancia de cada individuo. La población donde se presenta mas altos índices, se encuentra primordialmente en países donde los lácteos no han sido una fuente importante en la alimentación. (*Pessela Ch.,2002*)

El tratamiento que se recomienda llevar a cabo en la mayoría de casos es seguir una dieta sin lactosa o consumir productos con un minimo contenido de lactosa, esto será de acuerdo al límite de tolerancia para cada individuo. La restricción de leche y alimentos lácteos, provocará déficits de calcio, riboflavina y vitamina D, presentandose especialmente en personas que requieren un mayor porcentaje de estos nutrientes, siendo tal el caso de niños, adolescentes y embarazadas.

Todas estas razones han producido que la industria alimenticia se preocupe cada vez más para satisfacer las necesidades presentadas por los consumidores, entre ellas las más importantes son las industrias lácteas; pues buscan solucionar este problema mediante la elaboración de productos que presenten las mismas cualidades pero, a la vez hayan sido modificados mínimamente su composición, es decir disminuyan los niveles de concentración de lactosa, pero para poder disminuir estos niveles es necesario someter a diferentes procesos entre ellos el de hidrólisis, realizado mediante diferentes métodos de análisis, considerando además varios factores que influyen, entre ellos: concentración de lactosa, tiempo, temperatura pH, entre otros.

CAPITULO I

LACTOSA

La leche y sus derivados son considerados como uno de los alimentos más importantes para el consumo humano, debido a su alto valor nutricional, por esta razón se debe tomar en cuenta que no pueden ser fácilmente desplazados ni sustituidos por otros alimentos.

Entre los compuestos presentes de alto valor nutritivo podemos encontrar proteínas, minerales tales como fósforo, potasio, calcio, cobre, yodo, siendo básicos para la formación ósea y el desarrollo de los dientes, además se encuentran vitaminas, como A, B en mayor proporción y en pequeñas cantidades la C, D, E. Por último encontramos hidratos de carbono, el más importante es la lactosa, por ser responsable de estimular la absorción del calcio en nuestro organismo. (*Delgado H. Mejía L., 2001*)

1.1.1 Generalidades

La lactosa, el carbohidrato de la leche, es el principal responsable de regular el volumen de leche segregado; es decir, de el dependerá la cantidad de leche producida en la glándula mamaria.

Su concentración promedio es de 45 a 50 gramos por cada litro, estos datos son similares en todas las razas animales y no son alterados fácilmente, Existen ocasiones puntuales donde se puede alterar: debido a la variación de nutrientes durante el consumo alimenticio del animal, en la fase de lactancia o también cuando se presentan enfermedades como la mastitis.

Ésta es constituida por dos hidratos de carbono, la glucosa y galactosa, las mismas que se encuentran en pequeñas cantidades: glucosa 14 mg y galactosa 12 mg por cada 100 g de leche. (*Michel A, 2003*.)

1.1.2. Síntesis de la lactosa

La lactosa es sintetizada únicamente por las glándulas mamarias, a partir de varios metabolitos que son segregados por la glucosa y sus derivados. Estos

metabolitos están presentes en la sangre del animal, pero su fuente original es por la absorción y transformación de nutrientes durante el rumen del animal.

Este proceso está regulado por un complejo enzimático denominado lactosa-sintetasa, se produce por la interacción de dos proteínas: la proteína A o galactosil transferasa presente en diversos tejidos y la proteína B o alfa lacto albúmina que es una proteína sintetizada por las células epiteliales ubicadas en el tejido mamario.(*Michel A., 2003*)

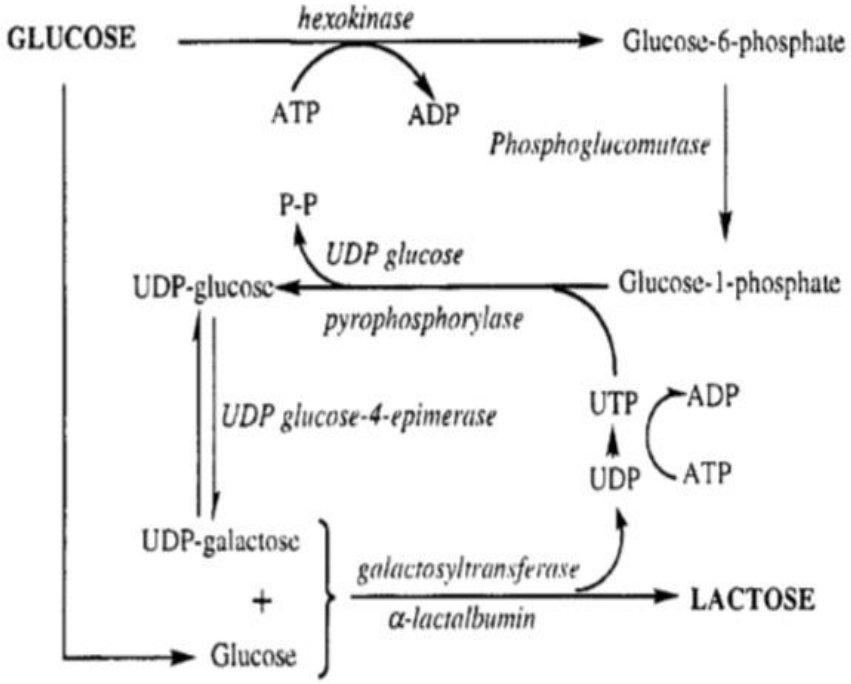


Figura 1: Síntesis de formación de la lactosa

Fuente: McSWEENEY. Dairy Chemistry and Biochemistry.

1.1.3. Estructura

La lactosa, tiene una estructura 4-O-(β-D-galactopiranosil-D-glucopiranosa), es una hexobiosa de fórmula condensada $C_{12}H_{22}O_{11,}$ y su peso molecular es de 342 g/g-mol.

Está formada por la unión de una molécula de β-galactosa y de glucosa que puede ser α o β. Esta orientación depende del grupo aldehídico, en el un caso el primera está unido al enlace β y el segundo está libre (en forma pseudo-aldehídica).

Existen dos formas isómeras: α y β, que se diferencian únicamente en la posición de un grupo –OH en el carbono C1 de la glucosa (isomería ciclánica).

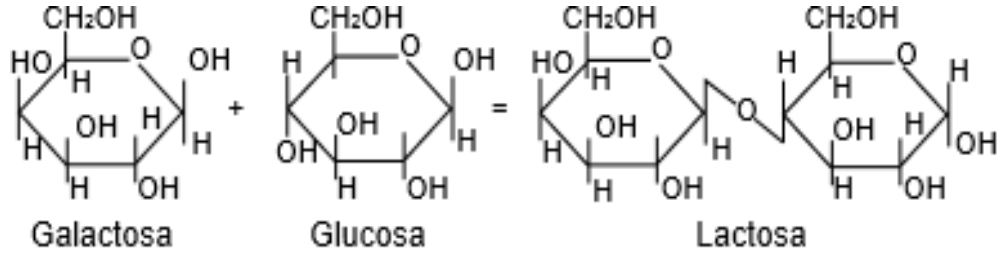


Figura 2: Composición de la lactosa.

Fuente: Michel A. Wattiaux, 2007.

Las dos formas pueden ser diferenciadas por las propiedades físicas; y son la solubilidad, cristalización, dulzura, entre otros.

	Isómeros de la lactosa	
	α	β
Poder rotatorio	+89	+35
Temperatura de fusión	202ºC	252ºC
Concentración de equilibrio a 15ºC	38%	62%
Cristalización de las soluciones saturadas: - Por encima de 94ºC - Por debajo de 94ºC	 α-hidratada	 β -anhidra

Figura 3: Propiedades físicas de lactosa

Fuente: Alais Charles, Ciencia de la leche, 1998.

1.1.4. Propiedades Físicas Y Químicas

1.1.4.1. Propiedades Físicas

1.1.4.1.1. Poder edulcorante

El poder edulcorante de la lactosa es cinco veces menor que el de la sacarosa. Está en conjunto a las sales de la leche son los responsables de su sabor característico.

1.1.4.1.2. Estabilidad

La lactosa sometida a temperaturas alrededor de los 110ºC puede ser degradada, la lactosa hidratada (α); pierde su agua y se transforma en lactosa anhídrido, causando la pérdida de compuestos esenciales como aminoácidos por ejemplo la lisina.

Mientras que a temperaturas superiores de 130ºC se produce la reacción de Maillard o más conocida como reacción de pardeamiento enzimático, se ocasiona por la alteración entre el grupo carboxilo de la lactosa y los grupos aminos de las proteínas, originando un tono pardo no característico del color de la leche, influyendo a su vez el sabor del producto..

1.1.4.1.3 Solubilidad

La solubilidad de la lactosa está directamente relacionada con la temperatura, en la Figura 5 podemos observar un resumen este comportamiento.

La solubilidad de una α- lactosa dependerá de la β- Lactosa, esto a su vez se relaciona con el poder edulcorante; Cuando se somete a un proceso de hidrólisis se aumenta aproximadamente el 80% de dulzor a comparación de la lactosa, y la vez este hidrolizado influirá 3 ó 4 veces sobre su solubilidad de la lactosa. (*Bylund, 2003*)

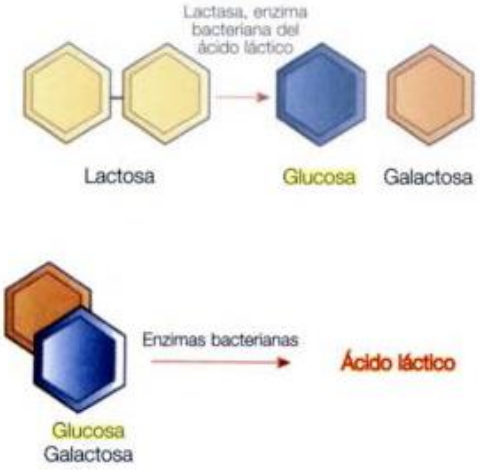


Figura 4: Hidrolisis de lactosa por acción enzimática y formación de ácido láctico

Fuente: Gösta Bylund. Manual de Industrias lácteas, 2003.

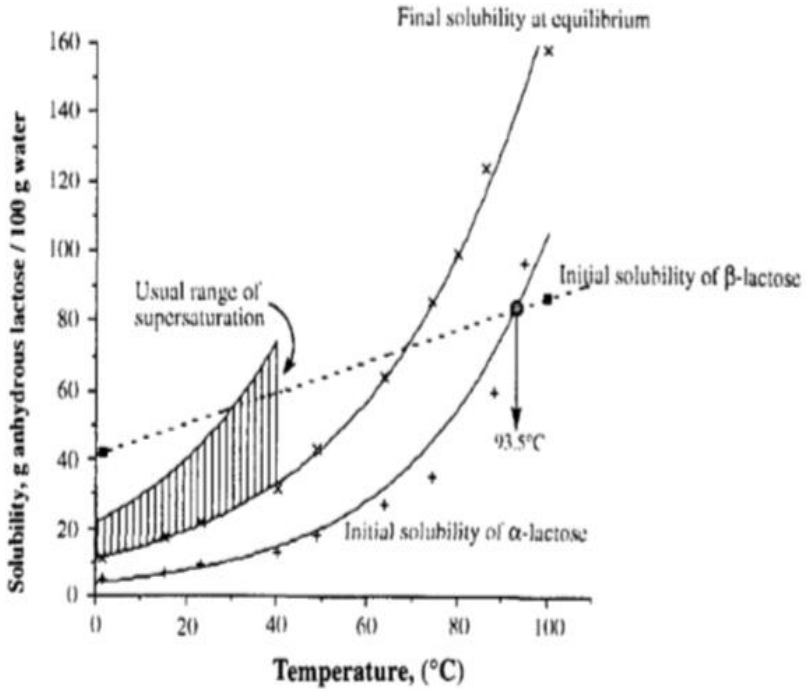


Figura 5: Solubilidad de la lactosa en agua.

Fuente: McSWEENEY. Dairy Chemistry and Biochemistry. Thomson Science.

1.1.4.2. Propiedades Químicas

1.1.4.2.1 Fermentación

La lactosa puede ser fermentada por varias causas, la principal es por acción de bacterias lácticas, transformándose siempre en mayor porcentaje en ácido láctico.

$$C_{12}H_{22}O_{11}.H_2O \rightarrow 4\ CH_3 — CH\ O\ H — COOH$$

Lactosa Ácido láctico

En algunas ocasiones esta transformación puede generar algunos compuestos deseables como aromáticos, como: l acetil - metil carbinol y diacetilo.

El ácido láctico, posteriormente también puede ser transformado por acción bacteriana en ácido propiónico, ácido acético y CO_2, ocasionando muchas veces que esta reacción sea indeseable, un claro ejemplo es la acción de bacterias anaerobias que lo transforman en ácido butírico.

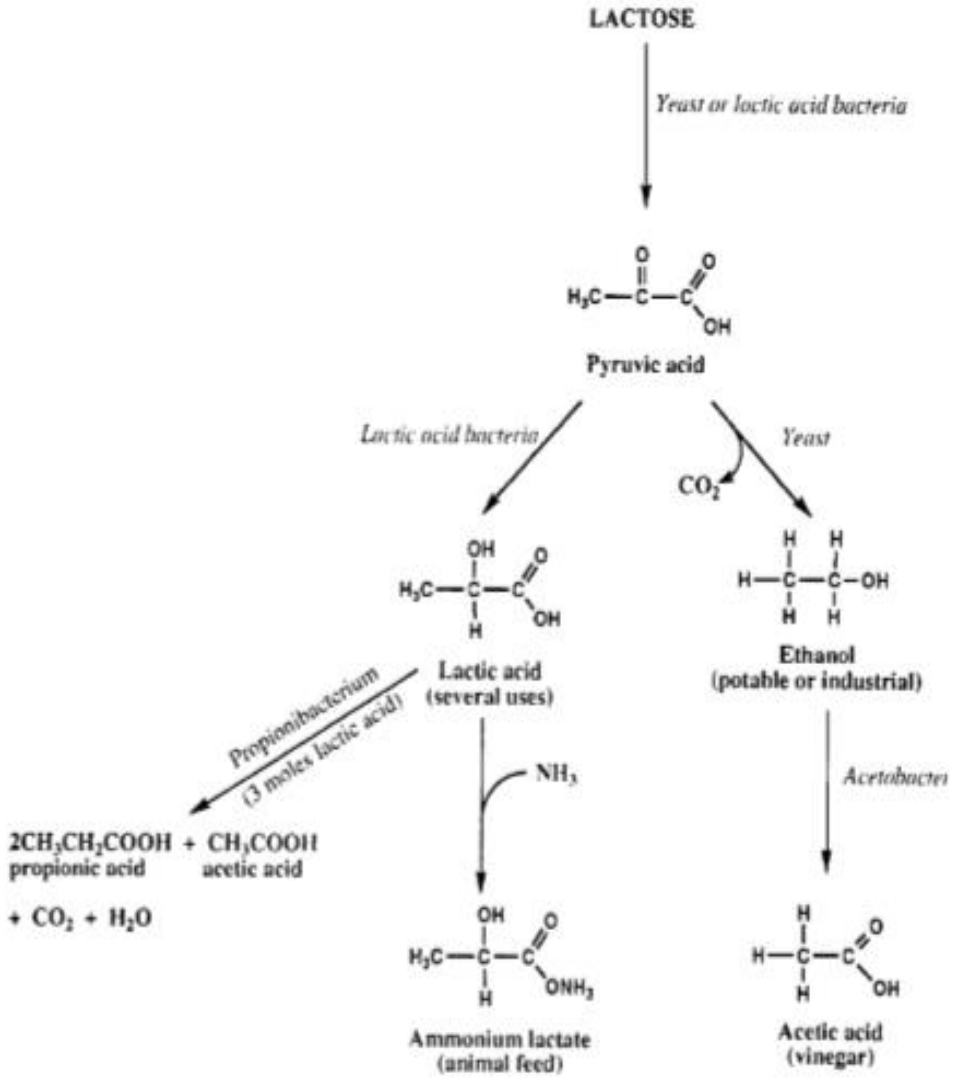


Figura 6: Esquema de fermentación de la lactosa.

Fuente: McSWEENEY. Dairy Chemistry and Biochemistry. Thomson Science

1.1.4.2.1. Propiedades Reductoras

La lactosa, al poseer un grupo aldehído libre, es considerada un azúcar reductor. Esta reacción se cumple por el fundamento del el método de Fehling reducido por el licor cupro-alcalino.

1.1.5. Hidrólisis

Los disacáridos y polisacáridos deben ser hidrolizados a monosacáridos para ser fácilmente absorbidos en la pared intestinal, y de esta manera llegar al torrente sanguíneo y ser distribuido para cumplir con su actividad metabólica normal.

En la hidrolisis de la lactosa el hidrógeno del agua se une al oxígeno externo de las moléculas de azúcar, el OH se une al carbono libre del otro residuo de azúcar, obteniendo como resultado un monosacárido.

$$Lactosa + H_2O \xrightarrow{lactasa} glucosa + D\ galactosa \quad (\beta 1-4)$$

$$C_{12}H_{22}O_{11} + H_2O \rightarrow C_6H_{12}O_6 + C_6H_{12}O_6$$

La leche cuando es hidrolizada se digiere rápidamente en el tracto digestivo, existe también una ligera variación en su sabor tornándose más dulce debido a la presencia de glucosa libre.

La hidrolisis puede realizarse mediante diferentes métodos, los más utilizados son: por ácidos fuertes o por enzimas, siendo este último método el que asegura un proceso de hidrólisis sin alterar el valor nutricional de la leche. (*Mogrovejo, K. Úrgiles, G. 2009*)

1.1.5.1. Hidrólisis Química

Se realiza en medio ácido y a altas temperaturas, utilizando ácidos orgánicos como el sulfúrico o el clorhídrico a concentraciones elevadas.

1.1.5.2. Hidrólisis Enzimática

La enzima utilizada para dicha hidrólisis se denomina β-Galactosidasa o más comúnmente lactasa.

Dicha enzima está compuesta por una oxidasa, encargada de romper el enlace β-1,4-glicosídico, liberando la glucosa y galactosa**.**

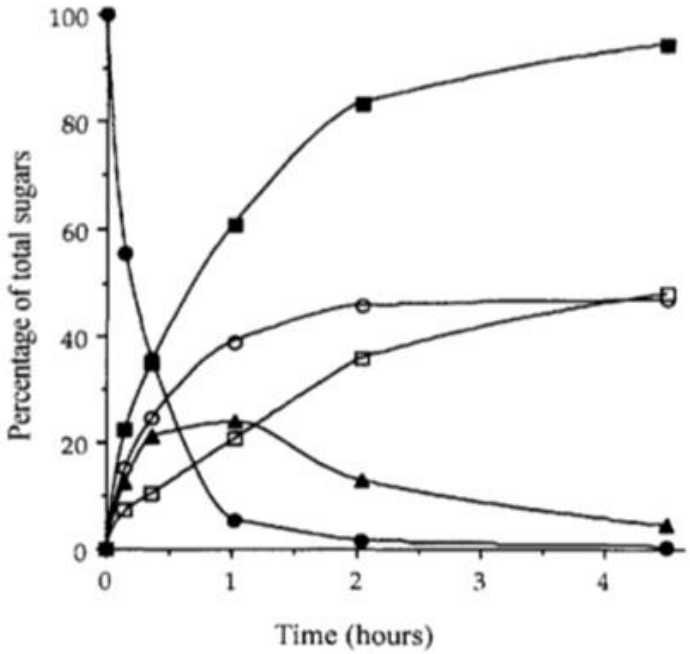


Figure 2.17 Production of oligosaccharides during the hydrolysis of lactose by β-galactosidase; ●, lactose; ■, monosaccharides; ○, glucose; ▲, oligosaccharides; □, galactose (modified from Mahoney, 1997).

Figura 7 : Producción de oligosacáridos durante la hidrolisis de lactosa por β -galactosidasa.

Fuente: McSWEENEY. Dairy Chemistry and Biochemistry. Thomson Science.

1.1. 5.3 Uso de las lactasas

Las lactasas son utilizadas en diferentes campos:

- Leches deslactosadas para personas con requerimientos especiales, principalmente de niños.
- Elaboración de edulcorantes y jarabes.
- Productos concentrados.
- Helados con mínimo contenido lactosa. (*Juca C, A. Pérez , 2010*)

1.1.6 Métodos de determinación de lactosa

1.1.6.1 Punto crioscópico

Para esté método se utiliza un crioscópico, cuya mecanismo de funcionamiento se fundamenta en la disminución del punto de congelación.

El momento de hidrolizar una muestra de leche la lactosa tiende a desdoblarse formándose glucosa y galactosa incrementando el contenido solutos en la solución.

1.1.6.2 Titulación Volumétrica

Los azúcares reductores reducen en medio alcalino los iones cúpricos del Reactivo de Fehling a iones cuproso, los cuales pueden ser determinados por gravimetría o titulación con permanganato de potasio o yodo y tiosulfato de sodio.

$$\underset{\text{Lactosa hidratada}}{C_{12}H_{22}O_{11} \cdot H_2O} \longrightarrow \underset{\text{a láctico}}{4\ CH_3 - CHOH - COOH}$$

Se usa como referencia el procedimiento descrito en la NORMA MEXICANA NMX-F-219-1972. Determinación de lactosa en leche. (Ver Anexos)

1.1.7 Usos

La lactosa juega un papel importante en la elaboración de productos lácteos, a todo se le atribuye las cualidades en las que influye, entre éstas se encuentra la textura de ciertos productos, sabor, etc.

La lactosa al momento de pasar por un proceso de fermentación láctica y alcohólica, tiene una gran importancia en la industria láctea, favorece la maduración del queso y se utiliza en la preparación de leches ácidas.

Finalmente, puede ser usado como: producto dietético para mejorar las texturas, estabilizador de proteínas, sustituto de la sacarosa, medio de cultivo en la producción de antibióticos, en bollería para que se produzca la reacción de

pardeamiento y de un color característico tostado, en la industria cárnica como agentes aglutinantes, de extensión y modificación de textura.

1.1.8 Glucosa y Galactosa

La glucosa y galactosa son azúcares simples o monosacáridos formados por seis átomos de carbono, el momento de ser ingerido convierte en glucosa en el hígado como aporte energético, su principal fuente proviene de la ingesta de lactosa de la leche.

Sus fórmulas moleculares son iguales: $C_6H_{12}O_6$, la galactosa difiere de la glucosa por ser un epímero de esta en el Carbono número 4, es decir, que el grupo de alcohol de este carbono está dirigido hacia la izquierda.

1.1.8.3 Ruta metabólica de la glucosa y galactosa

Después de la ingesta de leche, las enzimas propias del organismo sintetizan la lactosa absorbida y la transforman en glucosa y galactosa.

La galactosa sigue una vía que epimeriza el C4 de la glucosa. Este proceso ocurre a través de una serie de pasos:

Primero la galactosa es fosforilada por la galactoquinasa para formar galactosa-1-fosfato. La epimerización de la galactosa-1-fosfato a glucosa1-fosfato requiere la transferencia de UDP desde la uridinafosfoglucosa (UDP-glucosa) catalizada por la galactosa-1-fosfato uridiltransferasa, esto genera UDP-galactosa y glucosa-1-fosfato.

La UDP-galactosa es epimerizada a UDP-glucosa por la UDP-galactosa4 Epimerasa y el resultado es aumento de la síntesis de glucógeno.

En ayunas la UDP-glucosa formada se utiliza para metabolizar a la galactosa dando glucosa-1-fosfato, que entonces es convertida a glucosa6-fosfato por la fosfoglucomutasa.

La epimerasa cataliza una reacción reversible la glucosa puede convertirse en galactosa, para la síntesis de lactosa (en glándula mamaria), proteoglicanos, glicolípidos y glicoproteínas.(*Stephanopoulos G , Aristidou A , Nielsen J. 1998*)

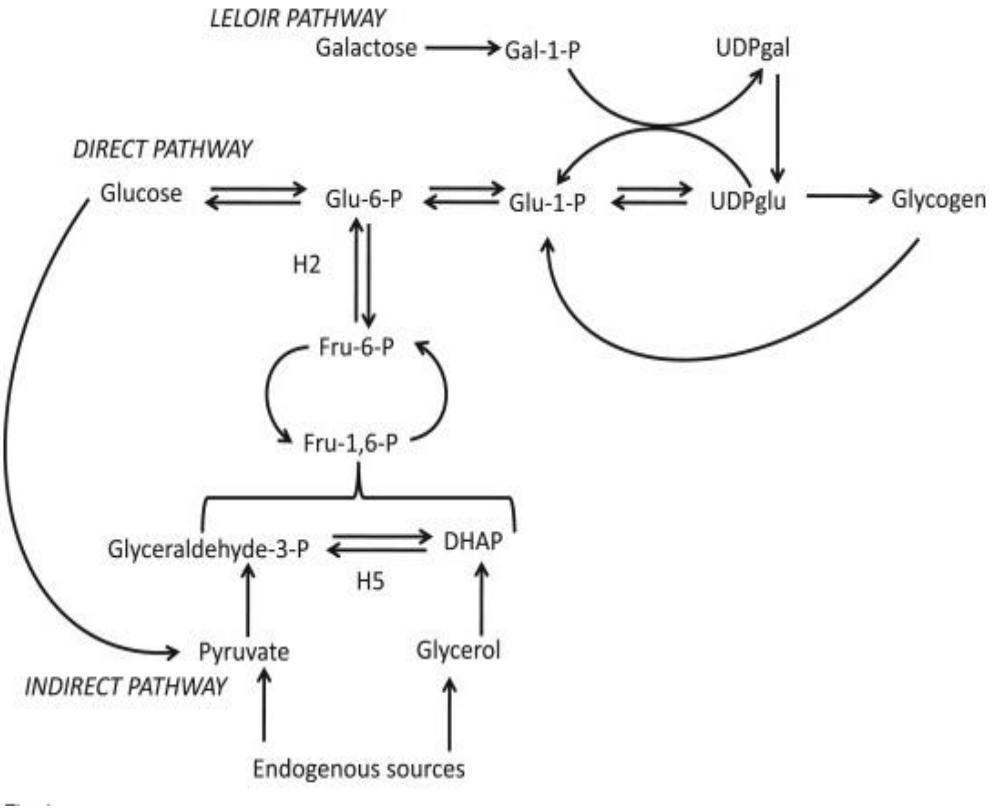


Figura 8: Representación de la ruta metabólica de síntesis de glucosa y galactosa

Fuente: Stephanopoulos G , Aristidou A , Nielsen J, 1998.

1.1.9 Intolerancia a la Lactosa

La enzima responsable de desdoblar la lactosa es la lactasa, presenta un típico patrón de actividad a lo largo de la vida de los mamíferos, la actividad enzimática se detecta en el intestino fetal a partir de la octava semana de gestación, aumentando gradualmente hasta alcanzar su máxima actividad el momento del nacimiento.

La dificultad de asimilación de lactasa se puede clasificar en tres tipos, de acuerdo a su origen:

- Deficiencia congénita

Se caracterizada por la ausencia total o la disminución de la enzima desde el nacimiento y permanecerá a lo largo de toda la vida.

- Deficiencia primaria

Llamada también no persistencia de lactasa, es la más común y aparece a los pocos años del nacimiento, por lo que se la denomina la hipolactasia del adulto.

- Deficiencia secundaria

Puede aparecer en diferentes situaciones, afectando la mucosa intestinal en individuos cuya actividad enzimática ha sido normalmente activa.

Se puede presentar en personas que han ingerido proteínas, consumido ciertos fármacos o que presentan un cuadro patológico que podrían causar daños en la mucosa desde niveles mínimos hasta, graves..

Estas situaciones muchas veces son de carácter reversible, es decir una vez resuelta la malabsorción, ésta desaparece, mientras que en otros el daño podría ser de carácter permanente. (*Labayen I.; Martínez J. 2003*)

CAPITULO II

ENZIMOLOGÍA

Las enzimas cumplen funciones como catalizadores biológicos y son de naturaleza proteica, en varias ocasiones tienen la capacidad de producir reacciones químicas, influyendo en ciertas ocasiones sobre la calidad de la leche.

En la leche de vaca se encuentras un sin número de enzimas, pudiendo ser algunas propias u otras que se pueden ser generar por bacterias denominadas enzimas bacterianas.

2.1.1. Generalidades

A las enzimas las encontramos como proteínas simples o como complejos lipoprotéicos, y están repartidas sobre la superficie del glóbulo graso, asociado a las micelas de la caseína y en forma simple en suspensión coloidal.

En la leche de vaca se han determinado aproximadamente 60 enzimas diferentes de distinto origen.

Es de mucha importancia el estudio de dichas enzimas, por las siguientes razones:

- Sensibilidad al calor.
- Indicadores de contaminación microbiana.
- Pueden trabajar como bactericida para inhibir patógenos.
- Su función biológica. (*Ramírez G., 2008*)

2.1.2. Mecanismo de acción

La acción de las enzimas es específica y es influenciada por el pH y temperatura.

Su actividad óptima es entre 25 y 50°C, debido a que en temperaturas superiores a 120°C son desnaturalizadas, considerando que podrían variar entre algunas enzimas.

En cuanto al pH, la mayoría funcionan mejor en soluciones acidas y otras en medios alcalinos.

2.1.3. Enzimas importantes presentes en la leche

Las principales enzimas que se encuentran en la leche son: lactoperoxidasa, reductasualdolasa, catalasa, lipasas siendo estas importantes debido a que son responsables de producir la rancidez de la leche, fosfátasa, proteasas amilasas, lisozima es otra muy importante puesto que facilita la precipitación de la caseína cumpliendo con propiedades bacteriostáticas. (*Celis M., Juárez D., 2009*)

Las más importantes son: Fosfatasa alcalina que sirve como indicador de la deficiente pasteurización, Lipasa, Proteasa y Xantinaoxidasa

Nombre	Código "E.C."	Distribución	pH/temperatura óptimos	Peso molecular	Substrato	Coenzima
I. Oxidoreductasa						
Peroxidasa	1.11.1.7	Lactosuero	6,5/20°	82 000	H_2O_2 + aceptor	Hematina (Fe)
Xantina-oxidasa	1.2.3.2	Membrana glob.	7 /37°	275 000	Aldehídos, etc.	Flavina, Mo, Fe
Catalasa	1.11.1.6	Caseína y membrana glob.	7 / ?	240 000 (?)	H_2O_2	Hemo (Fe)
Superóxido dismutasa	1.15.1.1.1	Lactosuero			O_2	Cu/Zn
Sulfhidriloxidasa	1.8.4.2	Lactosuero	–	90 000	– SH	–
II. Transferasas						
Lactosa sintetasa	2.4.1.22	Lactosuero	7,2/37°	42 000	UDP-gal + gluc.	
Ribonucleasa	2.7.7.16	Lactosuero	7,5/37°	13 000	Ácidos ribonucleicos	–
III. Hidrolasas						
Lipasa	3.1.1.3	Leche descrem.	9 /37°	50 000	Glicéridos	
Fosfatasa alcalina	3.1.3.1	Membrana glob.	9,8/37°	170 000	Esteres fosfóricos	Zn + Mg
Proteasa (plasmina)	3.4.21.7	Caseína	8 /37°	48 000	Proteínas	
Proteasa ácida	X	Caseína	4 / ?	36 000	Proteínas	–
Amilasa	3.2.1.1	Lactosuero	7,4/34°		Almidón, etc.	Ca
Lisozima	3.2.1.17	Lactosuero	8 /37°	18 000	Paredes microbianas	

Figura 9: Principales enzimas presentes en la leche y sus caracteristicas.

Fuente: Charles Alais. Ciencia de la leche.

2.1.4 Enzima β- Galactosidasa

Son más conocidas como lactasas o formalmente como 3-D-galactosido galactohidrolasas, su sustrato es la lactosa, y son capaces de separarla en los dos azucares que la componen.

Se aplica para la elaboración de productos y subproductos lácteos, su función dependerá del origen de la enzima.

Al momento de ser hidrolizada en los azúcares que la componen que son glucosa y galactosa, los productos poseen mayor dulzor.

Los factores que influyen son la temperatura y el pH, sus rangos óptimos varían según el origen.

2.1.4.1 Características de la enzima β-galactosidasas

Las enzimas de uso comercial se encuentran dentro de dos grupos: “ácidas” y “neutras”.

Las primeras presentan una actividad óptima en un pH entre 3 a 5 y una temperatura entre 46 y 55 °C, mientras que las otras tienen rango de pH de 6,5 a 7,3 y temperaturas entre 35 y 40 °C.

Las enzimas neutras son obtenidas por levaduras mientras que la otra clasificación, a partir de hongos.

La principal levadura utilizada para la obtención de lactasa es la *Kluyveromyces lactis*, Mientras que los hongos son *Aspergillus oryzae y A. niger.* (*McSWEENEY.1998*)

Fuente	pH óptimo	T (°C)	P. Molecular	Activadores
A. niger	3,0-4,0	55-60	124 KD	Mg^{2+}
A. oryzae	5,0	50-55	90	Mg^{2+}
K. fragilis	6,6	37	201	Mn^{2+}, Mg^{2+}, K^{+}
K. lactis	6,9-7,3	35	135	Mn^{2+}, Na^{+}
E. coli	7,2	40	540	Na^{+}, K^{+},Mg^{2+}
L.thermophilus	6,2-7,1	55-57	530	-
S.thermophilus	7,5	55	500-600	-

Figura 10: Propiedades de diferentes β-galactosidasas.

Fuente: McSWEENEY. Dairy Chemistry and Biochemistry. Thomson Science, 1998.

2.1.4.2 Actividad Enzimática

La hidrólisis se realiza manteniendo la configuración del C-1 de la galactosa, carbono donde se une la glucosa.

El centro activo es un lugar específico para la unión de estos azúcares. Los aminoácidos que unen en esta zona tienen mayor afinidad de ligandos hidrofóbicos por la glucosa, está la afinidad aumenta drásticamente cuando se produce el complejo galactosil-enzima.

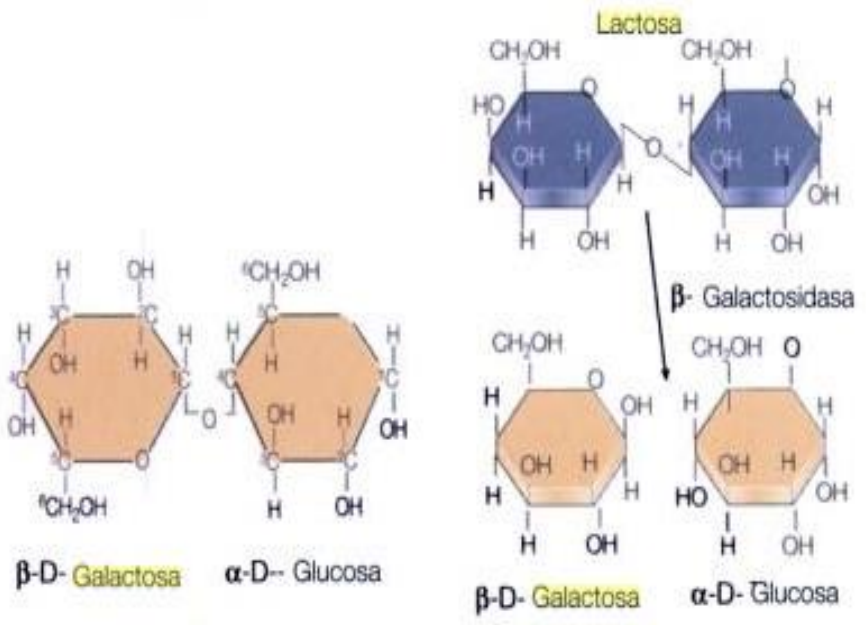


Figura 11: Proceso de Hidrólisis de lactosa.

Fuente: GÖSTA BYLUND, Manual de industrias lácteas, 2003.

2.1.4.2. Propiedades del producto hidrolizado con β-galactosidasa

El producto hidrolizado, siempre aumentará su poder edulcorante casi duplicando al dulzor producido por la sacarosa.

En la mayoría de ocasiones está hidrólisis genera una mezcla equimolar de glucosa y galactosa, pero esto dependerá de las condiciones en que se encuentre, ya que en algunas ocasiones la galactosa puede polimerizar o unirse a la lactosa para formar oligosacáridos.

Los monosacáridos que se obtienen de este proceso no presentan problemas para ser asimilados en el intestino de los animales y humanos.

CAPITULO III

TAXONOMÍA DE LAS BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS (BAL)

Las bacterias acido lácticas son un grupo de bacterias Gram-positivas, que no forman esporas y requieren una serie de nutrientes para continuar con su crecimiento entre ellos aminoácidos, proteínas, vitaminas, etc.

Estas bacterias se caracterizan por que regulan las poblaciones bacterianas que constituyen la “microbiota” intestinal, esto permite prevenir enfermedades, potenciar el sistema inmune, estimulan la digestión puesto que permite la asimilación de lactosa en ciertos pacientes, produce sustancias para evitar el desarrollo de bacterias patógenas, etc.

Todas estas funciones hacen que se les atribuya el nombre de “probióticos”, los mismos que no son más que organismos vivos que se ingieren en una dosis adecuada para cada individuo con el fin de tener efecto beneficioso para la salud. (*Mozzi Fernanda, Raya Raúl R. Vignolo Graciela M. 2010)*

3.1.1.1 Características de las bacterias ácido lácticas

Todas las bacterias lácticas poseen una característica común que es la producción de ácido láctico a partir de la fermentación de azúcares, obteniendo de ello en la mayoría de casos ácido láctico.

Las BAL fermentan las hexosas mediante dos formas; La primera la "vía homofermentativa", en donde el único producto final es ácido láctico, o la "vía heterofermentativa" en la que, además de producción de ácido láctico, puede formarse etanol (ácido acético) y CO2.

La obtención de los diferentes compuestos está en función de las enzimas que intervienen en la transformación, siendo la fructosa-1,6-bifosfato-aldolasa en el primer caso, y una fosfocetolasa, en el segundo.

A estos compuestos se les atribuye las características específicas que presentan cada producto para ser considerado como únicos, entre ellas aroma, sabor,

textura, cambios en las propiedades reologicas y acción específica contra microorganismos patógenos. (*Reginensi S., 2011*)

A continuación se detalla la influencia de las BAL en algunos productos:

a) Influyen en la textura de ciertos productos lácteos.
b) Debido a la variación de acidez que se ocasiona durante la fermentación de la lactosa, permite la coagulación proceso que es indispensable para la elaboración de yogurt y quesos.
c) Aumenta la viscosidad de la leche y cambia su textura esto es el caso para la elaboración de crema y mantequilla.

Género	Principales especies y aplicaciones
Streptococcus	*S. lactis, S. cremoris*. Mantequilla, queso, yogurt *S. thermophilus*. Yogurt, queso.
Pediococcus	*P. cerevisiae*. Cerveza, carne procesada. *P. halophilus*. Salsa de soya
Leuconostoc	*L. mesenteroides. L. citrovorum*. Alimentos fermentados, producción de dextrán.
Lactobacillus	*L. bulgaricus*. Yogurt, bebidas fermentadas a base de leche. *L. helveticus*. Queso, yogurt, bebidas a base de leche fermentada. *L. acidophilus*. Yogurt, bebidas a base de leche fermentada, preparación de *Lactobacillus*. *L. casei*. Quesos, leche refinada, bebidas a base de leche fermentada, preparación de *Lactobacillus*. *L. plantarum*. Diversos alimentos fermentados, ensilajes. *L. fermenti, L. brevis*. Productos fermentados.
Bifidobacterium	*B. bifidum, B. infantis, B. longum, B. adolescents*. Leche fermentada, preparación de bacterias lácticas. El intestino de infantes y adultos. *B. thermophilum, B. Pseudolongum*. El intestino de animales

Figura 12: Utilización de las principales bacterias lácticas.

Fuente: Torres, 2002.

3.1.1.2 Clasificación de Bacterias Ácido Lácticas

Las bacterias lácticas pertenecen a 19 géneros distribuidos en 6 familias dentro del orden *Lactobacteriaceae* y su rango de pH óptimo para su crecimiento es de 4 a 4,5.

Las bacterias homofermentivas pertenecen al género *Pediococcus, Streptococcus, Lactococcus* y varias especies de Lactobacillus, mientras que las heterofermentativas provienen del género *Leuconostoc y Lactobacillus.*

3.1.2. Probióticos

Son considerados como: "Microorganismos vivos que ejercen una acción benéfica sobre la salud del huésped al ser administrados en cantidades adecuadas".

La concentración de probióticos viables que se estima que debe llegar al intestino para obtener un efecto clínico es > 10^6 UFC/g en el intestino delgado y >10^8 UFC/g en el colon. Sin embargo una ingesta de 10^5 UFC/g ha sido sugerida como la mínima para proveer efectos terapéutico (*Roy, 2005*).

Los microorganismos comúnmente empleados como probióticos se encuentran disponibles comercialmente a través de laboratorios o industrias alimenticias a nivel internacional así como en colecciones de cultivos.

3.1.2.1 Mecanismo de Acción

El momento de ingerir estos organismos, ellos interaccionan con las bacterias de la microflora estomacal, colonizando el intestino grueso lo que permite estabilizarla y a su vez impide el desarrollo de patógenos.

Las BAL aportan además con propiedades que estimulan la producción de anticuerpos y refuerzan el sistema inmune.

3.1.2.1 Características de los probióticos

Un alimento para ser considerado como probiotico debe aportar con las siguientes características:

- No deben ser precedentes de enfermedades.
- El momento de ser ingeridas deben ser toleradas por el sistema inmunitario.

- Tienen que presentar resistencia a los ácidos gástricos y las sales biliares,
- Capacidad de adherirse a la superficie de la mucosa intestinal y de colonizar el segmento gastrointestinal.
- Sinergia con la microflora intestinal.
- Deben producir sustancias nutritivas favorables para la asimilación de alimentos en la mucosa intestinal.

Los probióticos naturales se encuentran en la alimentación cotidiana en lácteos fermentados como yogures, leche y quesos, vegetales fermentados, productos cárnicos, etc. (*Sáez Pérez, 2007*)

3.1.2.2. Clasificación de probióticos

Entre los microorganismos probióticos se encuentran numerosas bacterias y algunas especies de hongos, como los siguientes:

- Bacterias Lácticas de los géneros *Lactobacillus, Lactococcus, Streptococcus, Enterococcus, Propionibacterium.*
- Actinomycetaceas: *Bifidobacterium*.
- Hongos y Levaduras: *Saccharomyces.*

Género Lactobacillus

- *Lactobacilli acidophilus*
- *Lactobacilli bulgaricus*
- *Lactobacilli casei*
- *Lactobacilli reuteri*
- *Lactobacilli brevis*
- *Lactobacilli cellobiosus*
- *Lactobacilli curvatus*
- *Lactobacilli fermentum*
- *Lactobacilli helveticus*
- *Lactobacilli plantarum*

Género Saccharomyces

- *Saccharomyces boulardi*

Género Streptococcus

- *Lactococcus lactis cremoris*
- *Esteptococcus salivaris therm*
- *Enterococcus faecium*
- *Esteptococcus diacetyllactis*
- *Esteptococcus intermedius*
- *Estreptococcus thermophillus*

Géneros Bifidobacterium

- *Bifidobacteria bifidum*
- *Bifidobacteria adolescentis*
- *Bifidobacteria animalis*
- *Bifidobacteria infantis*
- *Bifidobacteria longum*
- *Bifidobacteria thermophilum*

Figura 13: Bacterias consideradas como probióticos.

Fuente: Marteau Y Gabonau-Rothian, 2000.

3.1.3. Prebióticos

Estos compuestos se consideran sustancias no digeribles, pero a su vez aportan beneficio a sus consumidores, como es la estimulación de crecimiento de organismos introducidos en el intestino como son los probióticos.

"Estos compuestos se caracterizan por ser moléculas de gran tamaño que no pueden ser digeridas por las enzimas digestivas del tracto gastrointestinal alto, alcanzando el intestino grueso donde no son degradados por la microflora bacteriana, principalmente por las Bifidobacterias y Lactobacilos, generando de esta manera una biomasa bacteriana saludable y un pH óptimo."(*Olagnero G., Abad A., Bendersky A., Genevois C., Granzella L, Montonati M., 2007*)

Un claro ejemplo son los géneros *Bifidobacteria y Lactobacilli* microorganismos que requieren de prebióticos para su desarrollo y son los responsables de inhibir

el crecimiento de bacterias putrefactivas (*Clostridium perfringens*) y patogénicas (*E. coli, Salmonella, Listeria y Shigella*).

3.1.3.1 Clasificación de prebióticos

Los únicos elementos que no son digeribles son los Fructo-Oligosacáridos, estos cumplen los parámetros para ser denominados como prebióticos y facilitan el desarrollo de Bifidobacterias y Lactobacillus en el organismo.

- Galacto-oligosacaridos (GOS): están presentes en la leche humana. Son cadenas cortas de oligosacáridos fermentados por la flora intestinal en la parte superior del colon.
- Fructo-oligosacáridos (FOS): están presentes en frutas y verduras, y son fermentados principalmente en la parte inferior del colon.
-

3.1.3. 2 Funciones de los prebióticos

Para seleccionar un ingrediente alimenticio con características prebióticas, se debe considerar lo siguiente:

- Ser fermentables por la microflora intestinal.
- Estimular el crecimiento y/o actividad de las bacterias intestinales.
- Producir ácidos grasos de cadena corta.
- Propiedades protectoras frente a cáncer colorectal.

CAPITULO IV

MATERIALES Y MÉTODOS

4.1.1 Materia prima

Las diferentes muestras de leche fueron recolectadas en una hacienda ganadera ubicada en la parroquia Victoria del Portete del Cantón Cuenca.

En las mismas se realizaron análisis de control (acidez, punto crioscopico) , los mismos fuereon realizados en el laboratorio de lácteos de la Universidad del Azuay.

4.1.1.1 Tratamiento Térmico de la Materia Prima

Una vez realizado los analisis de control en la leche cruda, las muestras fueron sometidas a diferentes tratamientos térmicos.

Para cada analisis se recolectaron tres muestras, de las cuales cada una de ellas se sometieron a diferentes tratamientos térmicos de pasteurización.

72°C por 15 seg.	85°C por 30min.	90°C por 5min.

Estos tratamientos realizados a cada una de las muestras, permitio evaluar el comportamiento sobre las muestras tratadas posteriormente, es decir que transformaciones deseables y no deseables se produjeron sobre cada una de ellas.

4.1.2 Inoculación

Una vez sometidas a los diferentes tratamientos térmicos fueron almacenadas en refrigeración a una temperatura de 4°C, posteriormente se inocularon cada una de las muestras con la enzima comercial β– galactosidasa a diferente tiempos y temperaturas como se muestra en el siguiente cuadro.

Temperatura	Tiempo de Inoculación
4°C	12 horas
32°C	2 horas
50°C	0,5 hora

La cantidad de enzima estuvo en función del volumen de leche utilizado en cada muestra, para ello nos basamos en una tabla de dosis estimada de lactasa que se muestra a continuación:

DOSIS DE HA-LACTASE (ml/l)	TIEMPO DE REACCIÓN (Horas)	TEMPERATURA DE REACCIÓN (°C)	GRADO DE HIDROLISIS (%)
0,3 – 0,5	10	5	20
0,5 - 0,8	4	30	50
2,9 – 4,4	1	40	80

4.1.3 Análisis de muestras hidrolizadas

4.1.3.1 Determinación del Porcentaje de Hidrólisis

El grado de hidrólisis se determinó mediante el análisis de descenso en el punto crioscópico.

Este método se fundamenta en la disminución del punto de congelación, el momento que ocurre la hidrólisis de la lactosa, se forman, glucosa y galactosa incrementando el contenido solutos en la solución.

Para este método se utilizó un crioscopio previamente calibrado, donde para cada una de las muestras resultantes del proceso de hidrolisis fueron leidas por duplicado para minimizar el porcentaje de error en el resultado de cada una de ellas.

Para determinar el porcentaje de hidrolisis se calculó con la siguiente fórmula:

$$\%\ Hidrolisis\ Alcanzada = 350{,}77 * (Crioscopía\ Final) - \frac{(Crioscopía\ Inicial)}{0{,}00285}$$

4.1.3.2 Cuantificación del Contenido de Lactosa

Para cuantificar el contenido de lactosa se tomó como referencia la Norma Mexicana, NMX-F-219-1972. Esta norma se basa en el siguiente procedimiento:

1. Se pesan exactamente en el vaso de precipitado 12.5 g (P) de la leche y se pasan cuantitativamente, lavando con agua, a un matraz aforado de 500 ml; se añaden cerca de 200 ml de agua y se mezcla muy bien mediante agitación cuidadosa del matraz, evitando la formación de espuma. Para defecar se añaden 15 ml de solución de Fehling I y se agita; después 10 ml de hidróxido de sodio 0.25 N y se agita. Se ajusta a la temperatura de 20°C y se afora el volumen con agua a 20°C. Se mezcla y se filtra.

En el vaso de precipitado de 600 ml se colocan:

- 25 ml de Fehling I.
- 25 ml de Fehling II.
- 50 ml de agua.

2. Se cubre con el vidrio de reloj y se hierve. Se toman con pipeta 50 ml de la solución defecada - filtrada, se vierte en la mezcla Fehling hirviente, continuando la ebullición durante 6 minutos exactos, sin quitar el vidrio de reloj.

3. Se retira el vaso del fuego y se lava con agua la parte convexa del vidrio de reloj, y su contenido se filtra por el embudo de Allihn conectado al sistema de vacío, enjuagando el vaso con agua caliente para eliminar las trazas de cobre adheridas al vaso y los lavados se pasan al embudo de Allihn.

4. Se coloca el embudo de Allihn en el matraz Erlenmeyer de 300 ml; se agregan 5 ml de ácido nítrico 1:1 a un matraz Erlenmeyer de 100 ml, y se calienta. La mitad del ácido se vierte con precaución en el embudo de Allihn, y el resto en el vaso para disolver las trazas de óxido de cobre; después de la disolución completa se filtra al vacío, se lava tres veces el embudo con pequeñas porciones de agua, recibiendo los líquidos en el Erlenmeyer.

5. Se calienta la solución de nitrato de cobre (volumen total 50 - 70 ml) hasta ebullición, se añaden con cuidado cerca de 1.5 g de urea y se continúa la ebullición durante un minuto. Se deja enfriar, se adicionan 10 ml de yoduro de potasio al 30 % y se titula inmediatamente el yodo liberado con tiosulfato de sodio N/10, añadiendo al final de la titulación 10 ml de la solución de almidón como indicador.

Ver Anexos.

Para calcular el porcentaje de lactosa se utilizaron las siguientes formulas:

Mg de Cu_2O= V. titulante x 0,1N x 63,54

$$\% \, Lactosa = \frac{M \times 10 \times 100}{P}$$

M= mg de Cu_2O calculados

P= peso de la muestra

Equivalencias	
1 mol lactosa	4 moles de ácido láctico
340,64g de lactosa	360,4g de ácido láctico
69,5 mg de lactosa	50mg de glucosa
	7,0 mg. de galactosa

4.1.4. Crecmiento de Cepas LAB

Para poder cumplir con el objetivo planteado que hace referencia sobre la utilización de muestras como sustrato para fermentación láctica, fue necesario verificar el crecimiento y la viabilidad.

Para poder verificar la viabilidad fue necesario elaborar un producto fermentado en este caso un yogurt, la base principal para la elaboración fueron las diferentes muestras de leche ya hidrolizadas.

Una vez obtenidas estas muestras se seleccionó la muestra que presentó los mejores resultados en cuanto al % de hidrolisis obtenido, resultando como mejor la muestra pasteurizada a 72°C por 15 segundos y con una temperatura de inoculación a 32°C por un tiempo de dos horas.

Posteriormente de obtener la muestra hidrolizada se sometió a un nuevo proceso de pasteurización de 85°C por un tiempo de 30 min, este paso es necesario para inhibir la enzima, luego de haber realizado este proceso a la muestra se disminuiyó su temperatura a 40°C para elaborar el producto fermentado que consistia en la siguiente formulación:

Ingrediente	**Cantidad**
Inulina	3g/l
Carragenato	1,5 g/ l
Citrato de Potasio	3g/l
Tari k7	0,2 g/l

El fermento utilizado fue ABY- 3(*Lactobacillus acidophilus, Bifidobacterium, Streptococcus thermophilus and Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*.), este fue inoculado a una temperatura de 40°C por un tiempo aproximado de tres horas, para comprobar su inoculación se utilizó un potenciometro que permitió

controlar la disminución de pH hasta llegar a un valor aproximado entre 5,2 a 5. En la ficha técnica se pueden encontrar mas especificaciones de este fermento.

Ver Anexos.

4.1.4.1 Control Microbiologico de Crecmiento de Cepas LAB

La muestra utilizada para control microbiologico debe ser previamente envasada en un frasco completamente esteril.

Se realizaron dos controles el primero para comprobar el crecimiento de cepas LAB (probioticas), para ello se preparó agua peptonada para realizar dilusiones de 10^1 hasta 10^8 , el medio de cultivo para sembrar las muestras fue el agar MRS, el mismo es un agar especifico para el crecimiento de este tipo de microorganismos.

El segundo control se realizó para llevar a cabo para determinar la presencia de microorganismos patógenos que permitan asegurar la inocuidad del producto, este control se realizó de manera mas estricta con las muestras que fueron utilizadas para la catación.

En los dos controles se tomo como referencia la norma ecuatoriana para leche fermentadas(NTE INEN 2395:2011), es decir se elaboró y controló el proceso de elaboración del producto de tal manera que este se encuentre bajo los requisitos establecidos por dicha norma.

Ver Anexos.

4.1.5. Análisis Sensorial

Una vez obtenido el producto se realizó la catación para determinar la aceptación que podría tener el producto elaborado. Previo a ello se elaboró la ficha de cata que consitió en tres puntos principales: el primero un analisis visual, segundo olfativo y de sabor.

Ver Anexos.

Además se selecciónó el grupo a catar quienes debian ser personas que conozcan cuales son las caracteristicas requeridas en este producto.

La catación se realizó en los laboratorios de la Universidad del Azuay cumpliendo con todos los requisitos para catación de un nuevo producto.

Finalmente se desarrollaron tablas que muestran los resultados obtenidos despues de la valoración del mismo.

CAPITULO V

RESULTADOS

5.1.1. Hidrólisis de muestras

MUESTRA 1

Esta muestra fue previamente analizada, después fue pasteurizada a una temperatura de 72°C por 15 segundos. Finalmente se realizaron las pruebas de hidrólisis a temperaturas de 4, 32 y 50 °C por determinados tiempos, obteniéndose de esta manera los siguientes resultados:

Tiempo en Horas (4°C)	Punto Crioscópico	Punto Crioscópico	°H	Y	%Hidrolisis
0	-0,543	0,543	0,523	523,00	-5,11
2	-0,603	0,603	0,581	580,73	15,96
4	-0,642	0,642	0,618	618,26	29,66
6	-0,697	0,697	0,671	671,19	48,98
8	-0,712	0,712	0,686	685,63	54,24
10	-0,722	0,722	0,695	695,25	57,76
12	-0,784	0,784	0,755	754,91	79,53

Tabla 1: Hidrolisis de lactosa a temperatura de 4°C por 12 horas.

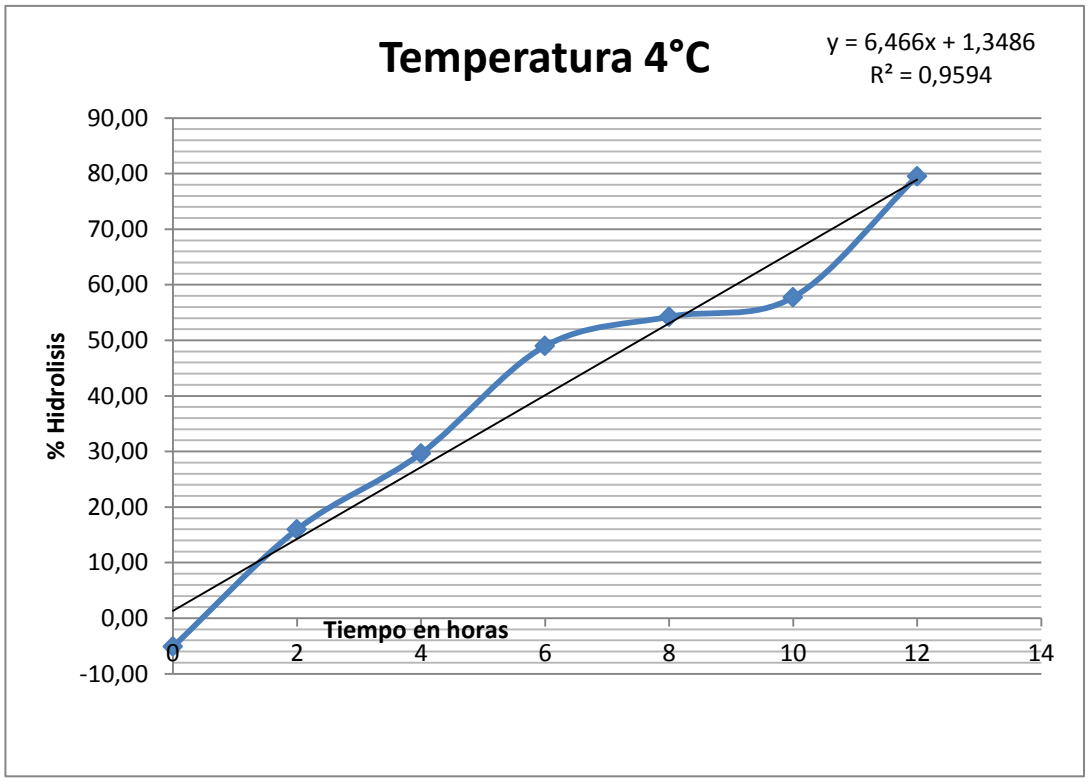


Figura 14: Curva del porcentaje hidrólisis a 4°C por 12 horas.

Tiempo (32°C) min	Punto Crioscópico	Punto Crioscópico	°H	Y	% Hidrolisis
0	-0,543	0,543	0,523	523,00	-5,11
20	-0,619	0,619	0,596	596,13	21,58
40	-0,729	0,729	0,702	701,99	60,21
60	-0,774	0,774	0,745	745,29	76,02
80	-0,791	0,791	0,762	761,65	81,99
100	-0,806	0,806	0,776	776,08	87,26
120	-0,826	0,826	0,795	795,33	94,28

Tabla 2: Hidrolisis de lactosa a temperatura de 32°C por 2 horas.

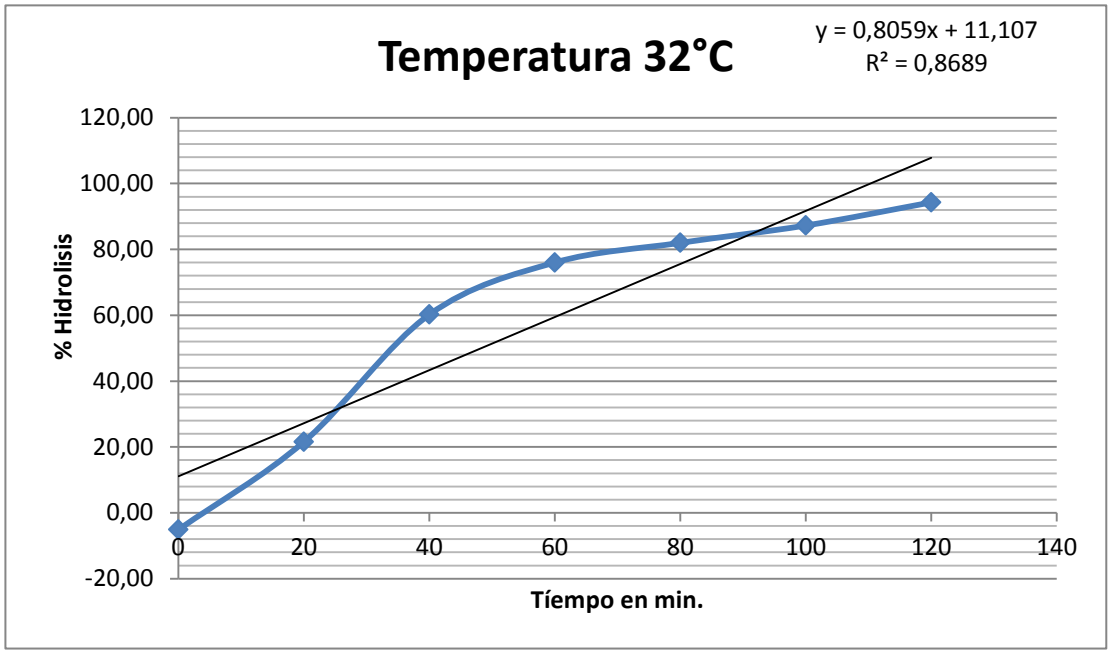


Figura 15: Hidrolisis de lactosa a temperatura de 32°C por 2 horas.

Tiempo (50°C) min	Punto Crioscópico	Punto Crioscópico	°H	Y	%Hidrolisis
0	-0,543	0,543	0,523	523,00	-5,11
5	-0,609	0,609	0,587	586,51	18,07
10	-0,715	0,715	0,689	688,51	55,30
15	-0,761	0,761	0,733	732,78	71,45
20	-0,799	0,799	0,769	769,35	84,80
25	-0,803	0,803	0,773	773,20	86,20
30	-0,825	0,825	0,794	794,37	93,93

Tabla 3: Hidrolisis de lactosa a temperatura de 50°C por 30 minutos.

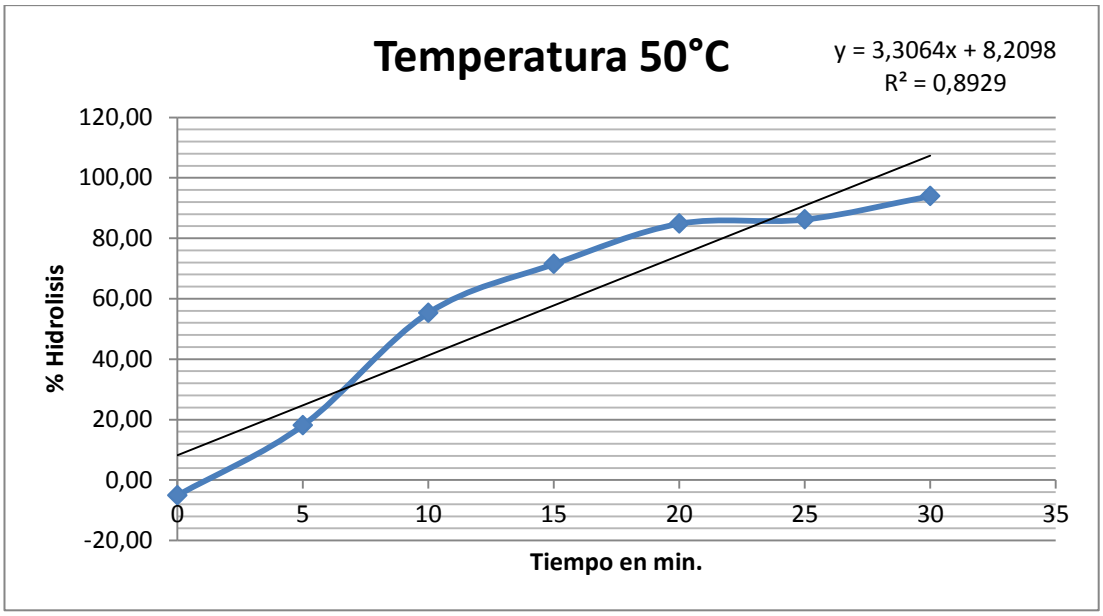


Figura 16: Hidrolisis de lactosa a temperatura de 50°C por 30 minutos.

RESUMEN DE DATOS OBTENIDOS DE LA PRIMERA MUESTRA

Tiempo	Temperatura	ml de galactosidasa	%Hidrolisis alcanzada
12h	4°C	0,37	81,29
2h	32°C	0,2	95,47
0,5h	50°C	2,05	95,13

Tabla 4: Resumen de tiempo, temperatura, cantidad de enzima utilizada y resultados del % de hidrolisis en la primera muestra.

Tiempo	Temperatura	mg. Lactosa	% Lactosa	Ácido láctico	mg. Glucosa	mg. de Galactosa
0	18°C	5240,769	5,2408	5,52	3770,34	1470,43
12	4°C	2386,755	2,3868	2,51	1717,09	669,67
2	32°C	3297,511	3,2975	3,47	2372,31	925,20
0,5	50°C	1626,806	1,6268	1,71	1170,36	456,44

Tabla 5: Contenido de lactosa inicial; Ácido láctico, lactosa y glucosa producida después del proceso de hidrolisis.

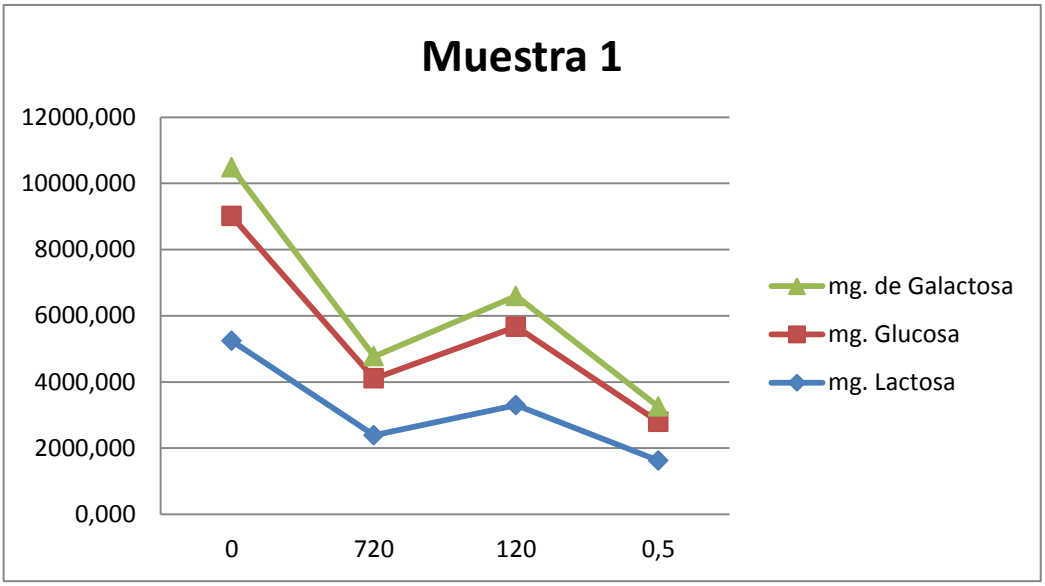


Figura 17: Contenido de lactosa, glucosa y galactosa en función del tiempo.

Interpretación: Una vez obtenidos los resultados se determinó que la muestra que alcanzó un mayor porcentaje de hidrólisis fue la que se realizó un tratamiento térmico de 32°C por un lapso de 2 horas.

MUESTRA 2

Para esta muestra se realizaron los mismos tratamientos de temperaturas para la hidrolisis, mientras que la temperatura de pasteurización previa fue a 85°C por 30 minutos.

Tiempo horas	Punto Crioscópico	Punto Crioscópico	°H	Y	%Hidrolisis
0	-0,541	0,541	0,520	520,15	-6,15
2	-0,617	0,617	0,593	593,29	20,54
4	-0,650	0,650	0,625	625,04	32,13
6	-0,717	0,717	0,690	689,52	55,66
8	-0,752	0,752	0,723	723,20	67,96
10	-0,818	0,818	0,787	786,71	91,14
12	-0,8271	0,8271	0,795	795,47	94,33

Tabla 6: Hidrolisis de lactosa a temperatura de 4°C por 12 horas.

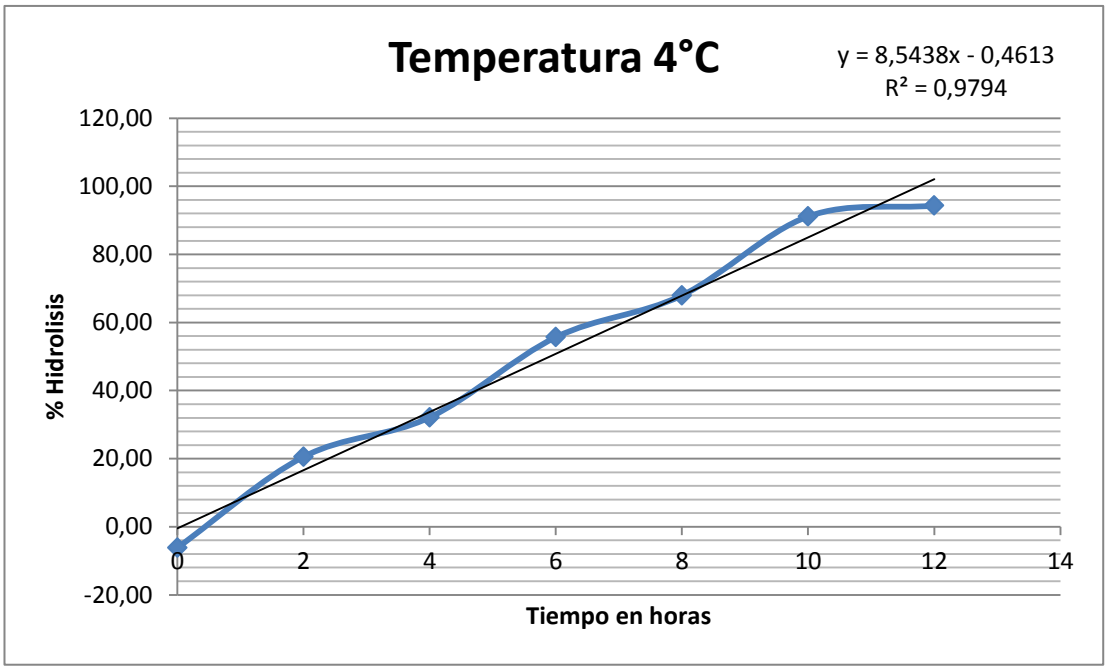


Figura 18: Hidrolisis de lactosa a temperatura de 4°C por 12 horas.

Tiempo (32°C) min	Punto Crioscópico	Punto Crioscópico	°H	Y	% Hidrolisis
0	-0,541	0,541	0,520	520,15	-6,15
20	-0,618	0,618	0,594	594,25	20,89
40	-0,683	0,683	0,657	656,80	43,72
60	-0,714	0,714	0,687	686,63	54,61
80	-0,753	0,753	0,724	724,16	68,31
100	-0,775	0,775	0,745	745,33	76,03
120	-0,781	0,781	0,751	751,10	78,14

Tabla 7: Hidrolisis de lactosa a temperatura de 32°C por 2 horas.

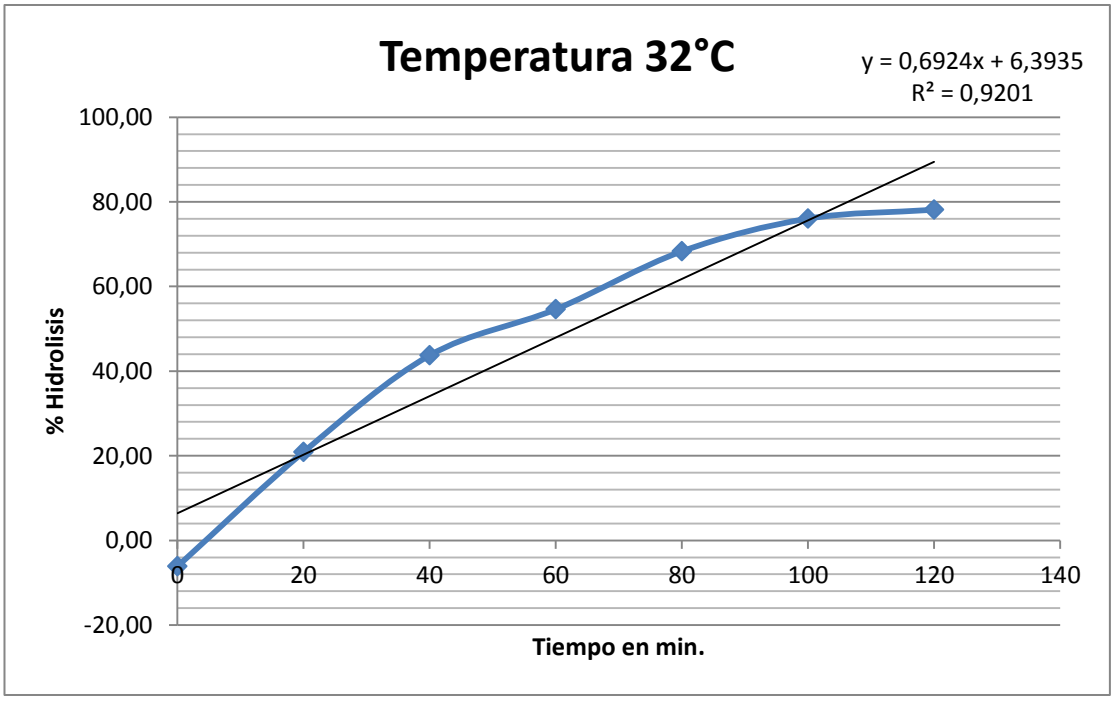


Figura 19: Hidrolisis de lactosa a temperatura de 32°C por 2 horas.

Tiempo (50°C) min	Punto Crioscópico	Punto Crioscópico	°H	Y	%Hidrolisis
0	-0,541	0,541	0,520	520,15	-6,15
5	-0,713	0,713	0,686	685,67	54,26
10	-0,774	0,774	0,744	744,37	75,68
15	-0,797	0,797	0,767	766,50	83,76
20	-0,812	0,812	0,781	780,94	89,03
25	-0,825	0,825	0,793	793,45	93,59
30	-0,836	0,836	0,804	804,03	97,46

Tabla 8: Hidrolisis de lactosa a temperatura de 50°C por 30 minutos.

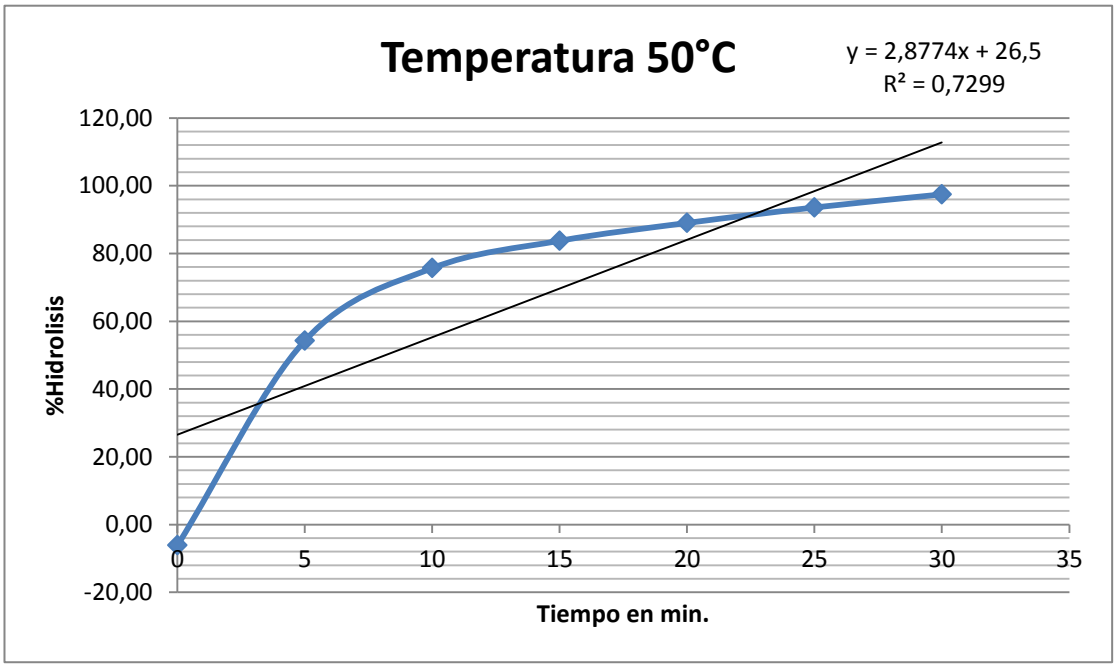


Figura 20: Hidrolisis de lactosa a temperatura de 50°C por 30 minutos.

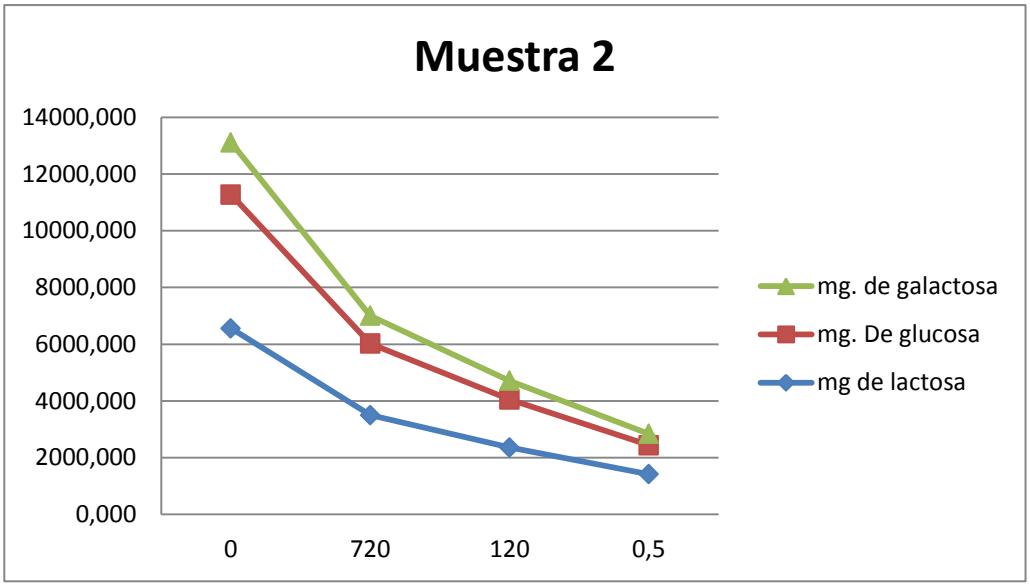


Figura 21: Resultado de la muestra dos del contenido de lactosa, glucosa y galactosa en función del tiempo.

RESUMEN DE DATOS OBTENIDOS DE LA SEGUNDA MUESTRA

Tiempo	Temperatura	ml de galactosidasa	%Hidrolisis alcanzada
12h	4°C	0,37	96,52
2h	32°C	0,2	80,96
0,5h	50°C	2,05	99,52

Tabla 9: Resumen de tiempo, temperatura, cantidad de enzima utilizada y resultados del % de hidrolisis en la segunda muestra.

Tiempo	Temperatura	mg de lactosa	% Lactosa	Ácido láctico	mg. De glucosa	mg. de galactosa
0	18°C	6656,809	6,6568	7,01	4789,0709	1867,738
12	4°C	3247,273	3,2473	3,42	2336,1676	911,105
2	32°C	2205,380	2,2054	2,32	1586,6042	618,776
0,5	50°C	1266,363	1,2664	1,33	911,0523	355,310

Tabla 10: Contenido de lactosa inicial; Ácido láctico, lactosa y glucosa producida después del proceso de hidrolisis, en la segunda muestra.

Interpretación: La muestra con mayor porcentaje de hidrólisis se representa en la muestra donde el tratamiento térmico fue de 50°C por un lapso de media hora.

MUESTRA 3

Esta muestra fue sometida a un temperatura de pasteurización de 90°C por 5 min, posteriormente se realizaron las diferentes pruebas de hidrolisis a las temperaturas determinadas.

tiempo(4°C) horas	Punto Crioscópico	Punto Crioscópico	°H	Y	%Hidrolisis
0	-0,535	0,535	0,514	514,38	-8,26
2	-0,626	0,626	0,602	601,95	23,70
4	-0,707	0,707	0,680	679,89	52,15
6	-0,712	0,712	0,685	684,71	53,91
8	-0,732	0,732	0,704	703,95	60,93
10	-0,758	0,758	0,729	728,97	70,06
12	-0,761	0,761	0,732	731,86	71,12

Tabla11: Hidrolisis de lactosa a temperatura de 4°C por 12 horas.

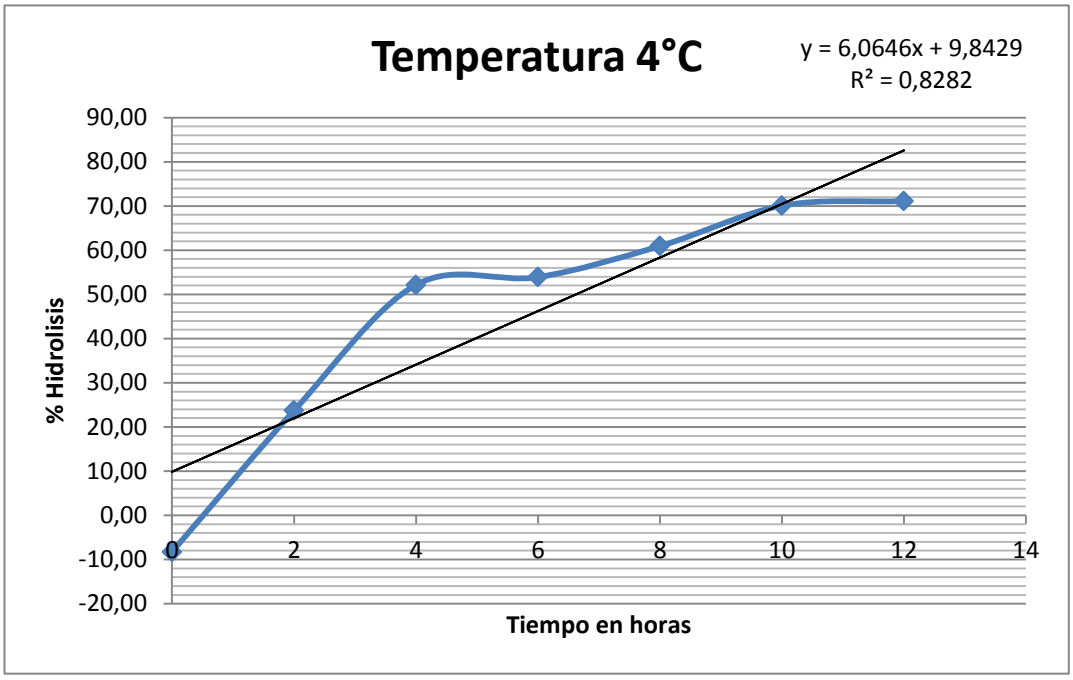


Figura 22: Hidrolisis de lactosa a temperatura de 4°C por 12 horas.

Tiempo(32°C) min	Punto Crioscópico	Punto Crioscópico	°H	Y	% Hidrolisis
0	-0,535	0,535	0,514	514,38	-8,26
20	-0,624	0,624	0,600	600,02	23,00
40	-0,676	0,676	0,650	650,06	41,26
60	-0,719	0,719	0,691	691,44	56,37
80	-0,756	0,756	0,727	727,05	69,36
100	-0,765	0,765	0,736	735,71	72,52
120	-0,803	0,803	0,772	772,28	85,87

Tabla12: Hidrolisis de lactosa a temperatura de 32°C por 2 horas.

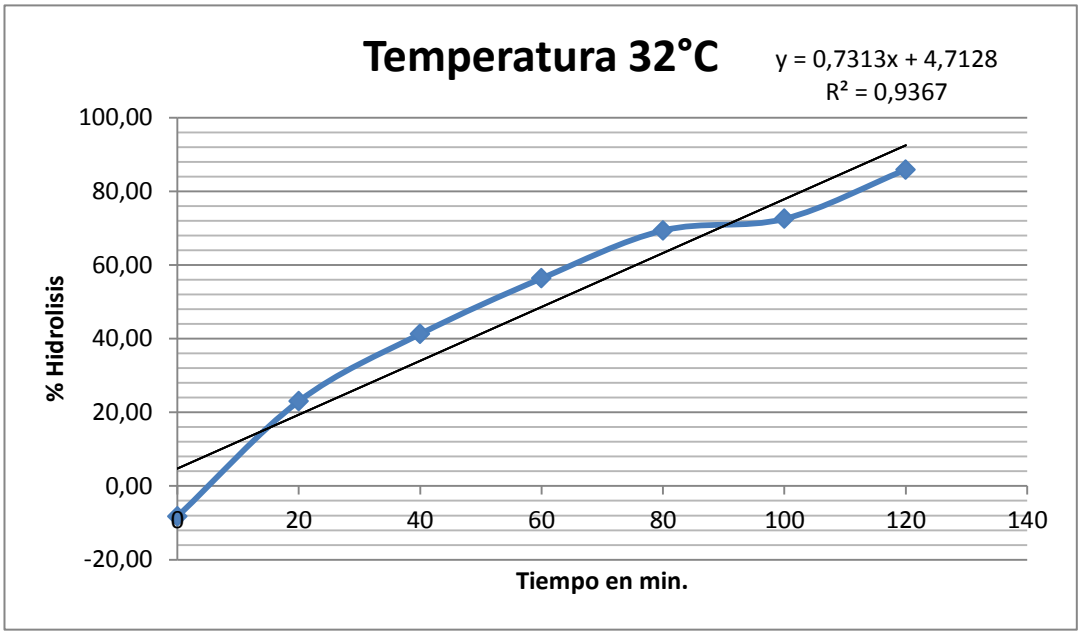


Figura 23: Hidrolisis de lactosa a temperatura de 32°C por 2 horas.

Tiempo(50°C) min	Punto Crioscópico	Punto Crioscópico	°H	Y	%Hidrolisis
0	-0,535	0,535	0,514	514,38	-8,26
5	-0,690	0,69	0,664	663,53	46,18
10	-0,708	0,708	0,681	680,86	52,50
15	-0,711	0,711	0,684	683,74	53,56
20	-0,720	0,72	0,692	692,40	56,72
25	-0,829	0,829	0,797	797,30	95,00
30	-0,835	0,835	0,803	803,07	97,11

Tabla13: Hidrolisis de lactosa a temperatura de 50°C por 30 min.

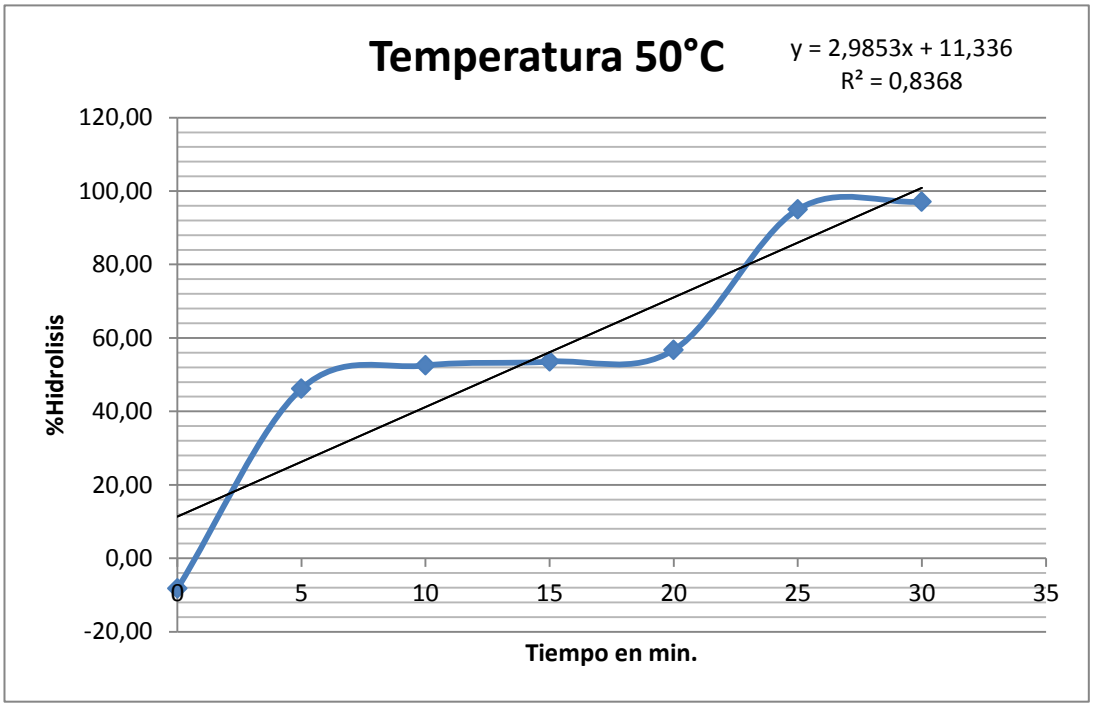


Figura 24: Hidrolisis de lactosa a temperatura de 50°C por 30 min.

RESUMEN DE DATOS OBTENIDOS DE LA TERCERA MUESTRA

Tiempo	Temperatura	ml de galactosidasa	%Hidrolisis alcanzada
12h	4°C	0,28	76,23
2h	32°C	0,56	90,41
0,5h	50°C	3,075	83,99

Tabla 14: Resumen de tiempo, temperatura, cantidad de enzima utilizada y resultados del % de hidrolisis en la tercera muestra.

Tiempo(H)	Temperatura	mg de lactosa	% Lactosa	Ácido láctico	mg. De glucosa	mg. de galactosa
0	18°C	6555,178	6,5552	6,90	4715,9553	1839,223
12	4°C	3500,966	3,5010	3,69	2518,6807	982,285
2	32°C	2355,747	2,3557	2,48	1694,7817	660,965
0,5	50°C	1418,326	1,4183	1,49	1020,3786	397,948

Tabla 15: Contenido de lactosa inicial; Ácido láctico, lactosa y glucosa producida después del proceso de hidrolisis, en la tercera muestra.

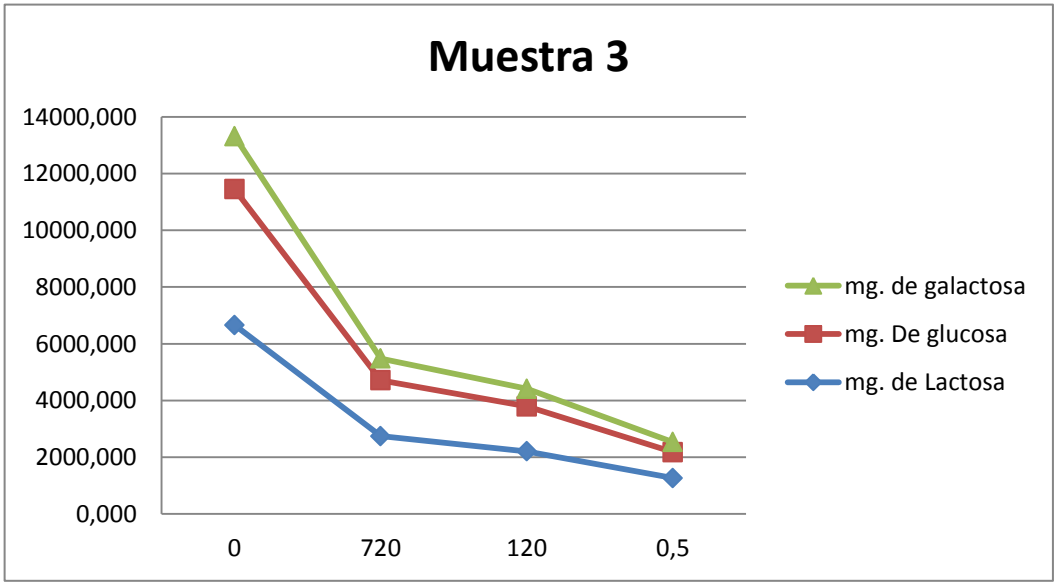


Figura 25: Contenido de azúcares en la tercera muestra.

Interpretación: Como se puede observar la muestra que presenta mejor hidrolisis es la muestra que fue sometida a 32°C por el tiempo de dos horas.

5.1.2. Inoculación de muestras

MUESTRAS	UFC
M1	$4*10^6$
M2	$3*10^6$
M3	$5*10^6$
M4	$6*10^6$

Tabla 16: Recuento de cepas LAB en agar MRS.

Interpretación: Despues de haber sembrado las muestras en el agar MRS, se realizó el conteo de microorganismo especificos (género: ***Lactobacillos***), y se obtuvieron resultados favorables que indican la viabilidad para que este producto sea considerado como probiotico, puesto que cumple con la norvativa ecuatoriana para leches fermentadas.

5.1.3. Curva de Acidificación

Tiempo	Acidez (°D)
0 horas	17
1,5 horas	60
3 horas	90
24 horas	90
48 horas	90
72 horas	90
Semana 2	90
Semana 3	90
Semana 4	90

Tabla 17: Control de Acidez

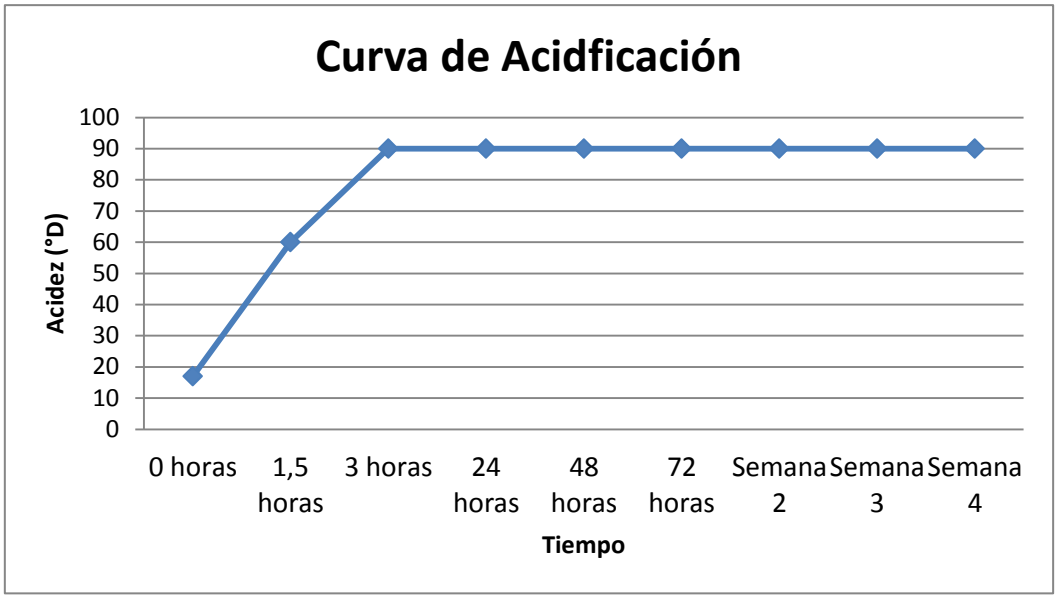


Figura 26: Curva de Acidificación en función del tiempo de almacenamiento.

Interpretación: Se realizó el control de acidez desde el inicio de la elaboración del producto, durante el proceso de fermentación y final del mismo, se obtuvo resultados favorables como se puede observar en el gráfico después de varias semanas la acidez del producto no varía y permanece estable.

5.1.4. Análisis Sensorial

	Muy Bueno	Bueno	Regular	Malo
Homogéneo	80	10	0	0
Fluido	70	20	0	0
Presenta Sinéresis	80	10	0	0

Tabla 18: Resultados obtenidos de la ficha de catación en relación al aspecto visual.

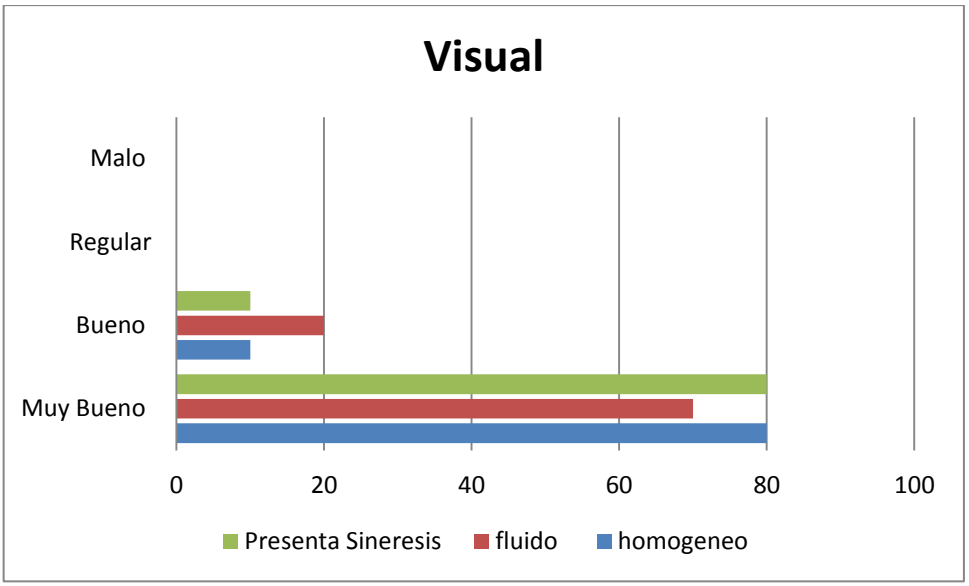


Figura 27: Estadisticas resultantes del aspecto visual obtenidos en la ficha de cataciòn.

	Muy Bueno	Bueno	Regular	Malo
Agradable	80	10	0	0
Propio	90	0	0	0
Frutal	60	30	0	0
Ácido	70	20	0	0

Tabla 19: Resultados obtenidos de la ficha de catación en relación al sentido del olfato.

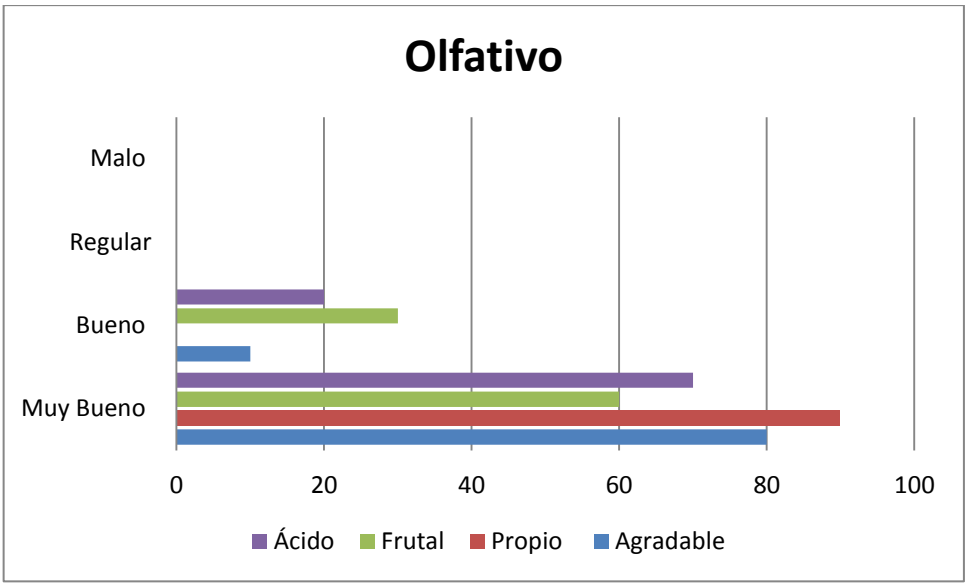


Figura 28: Estadisticas resultantes obtenidos en la ficha de cataciòn para el sentido del olfato.

	Muy Bueno	Bueno	Regular	Malo
Dulce	80	10	0	0
Ácido	80	0	10	0
Amargo	90	0	0	0
Salado	80	10	0	0
Picante	90	0	0	0

Tabla 20: Resultados obtenidos de la ficha de catación en relación al sabor

.

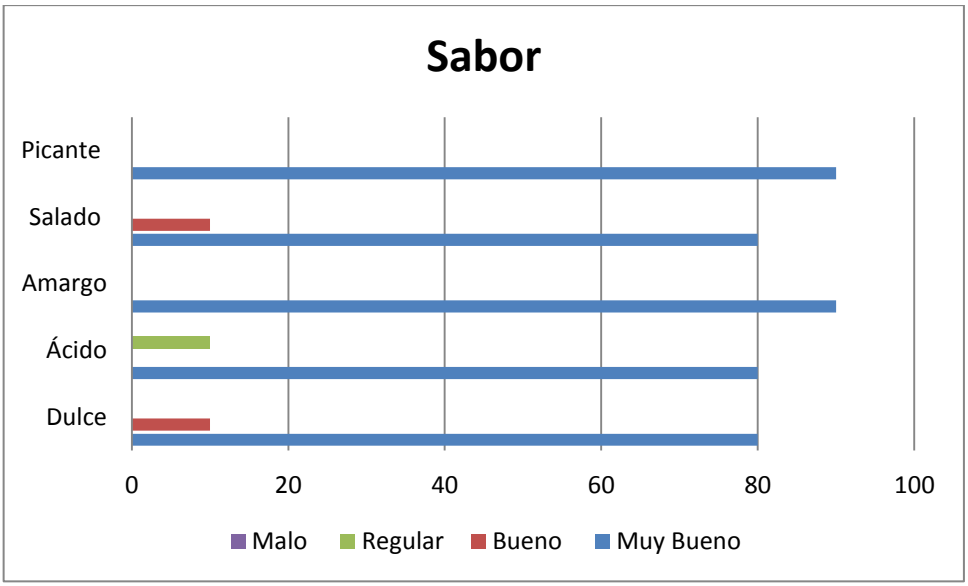


Figura 29: Estadísticas resultantes de la ficha de catación para el sabor.

Interpretación: Los resultados obtenidos en esta ficha de cataciòn permiten evaluar la aceptación del producto, es necesario mencionar que el producto tuvo una aceptación de un 93,3 % de las personas a las que se realizó la evaluación sensorial.

CONCLUSIONES

Una vez obtenidos los resultados se determinó que la muestra con mayor porcentaje de hidrolisis fue la muestra sometida una temperatura de 32°C por un lapso de dos horas (Temperatura de pasteurización previa de 72°C por 15 segundos) , se realizaron diferentes repeticiones y se hizo un promedio para disminuir el error en los resultados obtenidos; Además se cuantificó el contenido de lactosa glucosa y galactosa generado durante esta etapa, hay que recalcar que en nuestro pais no existen técnicas ni normativas que regulen estos procesos en las industrias, razón por la que se tomó como referencia la norma Mexicana para determinación de lactosa.

A partir de esta muestra se elaboraron diferentes pruebas de formulación de yogur, simultaneamente a estas se realizó un control microbiologico tanto para control y de viabilidad de crecimiento de cepas, de lo cual se obtuvieron resultados favorables en los dos tipos de análisis, el más importante de crecimiento de microorganismos probioticos cumplió con la normativa INEN para leches fermentadas en nuestro pais.

También se llevó un control para evaluar la calidad del producto, se hizo un seguimiento de la de acidez que presentaba el mismo, estos resultados se pueden observar en el gráfico de la curva de acidificación, aquí podemos observar que el producto al cumplir con su proceso de fermentación llega a una acidez máxima y no existe una variación de acidez al transcurrir del tiempo, tecnologicamente estos puntos permitiran prolongar la vida útil del producto; Estos resultados se complementaron con la evaluacion sensorial a personas entendidas en el tema, de lo cual se obtuvo una aceptación muy positiva del producto.

Para concluir, este producto al tener un proceso de elaboración estadarizado y contener cepas probioticas viables puede ser considerado como un producto funcional, debido al gran aporte nutricional que brinda a su consumidor, esta razón puede hacer al mismo objeto de una investigación mas completa, basado en otras condiciones más controladas como podrian ser temperatura de almacenamiento, tipo de envases y otros parámetros que puedan influir sobre la calidad del mismo, incluso se podria realizar estudios de intervención en personas que presenten cualquier tipo de intolerancia a la lactosa.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Bibliografía:

SMIT GERRIT. Dairy processing Improving quality. Woodhead Publishing Limited. England (2003)

ADAMS MARTIN R., MSC, M. J. ROBERT NOUT, Fermentation and Food Safety. Aspen Publishers, Inc. Gaithersburg, Maryland (2001)

SPENCER JOHN F. T., RAGOUT DE SPENCER ALICIA L.. Food Microbiology Protocols. Totowa, New Jersey. (2001)

TAMIME A.Y.. ROBINSON R. K.. YOGHURT Science and Technology Second edition. Woodhead Publishing Limited Abington Hall,Abington Cambridge . England (1999)

YANAHIRA S, KOBAYASHI T, SUGURI T, et al. Formation of oligossacharides from lactose by Bacillus circulans bet-galactosidase. Biosci Biotech Biochem (1995)

MOGROVEJO K., URGILES G. Optimización de las condiciones de hidrólisis utilizando β-galactosidasa inmovilizada por atrapamiento y determinación de lactosa residual. Universidad del Azuay, 2009.

JUCA C, A. PÉREZ P. "Determinación de lactosa en leche deslactosada y su comparación con la fórmula aplicada en la empresa de lácteos san antonio", Universidad de Cuenca, 2010.

GÖSTA BYLUND. Hidrolisis De Lactosa Por Acción Enzimática Y Formación

KOUAOUCI RACHID, Analytical Methods for Lactose Quantification in Milk and Milk Products. Canada. IDF International Symposium Lactose and itsDerivatives.

BRUMMER YOLANDA, CUI STEVE W. Understanding Carbohydrate Analysis. Taylor and France group. (2005)

AZNAR ROSA, ZÚÑIGA MANUEL. ¿Qué son las bacterias lácticas? Dpt. Biotecnología de Alimentos, Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos. Universidad de Valencia.

AOAC INTERNATIONAL, Official Methods of Analysis, 16th Ed., 4th Revision, 1998, , Gaithersburg, MD, methods 896.01, 984.15, 930.28 and972.16.

ODON JULIAN SOBRINO ABUJA. Caracterización parcial, bioquímica e inmunológica, de una sustancia antimicrobiana producida por Lactobacillus sake 148. Universidad Complutense De Madrid.

CABEZÓN PALOMINOS PATRICIA. Adición De Cepas Lácticas Probióticas En Leche En Polvo 26% MG. Universidad Austral de Chile. (2010)

ESCOBAR LUIS F., ROJAS CARLOS A., GIRALDO GERMÁN A., PADILLA SANABRIA Leonardo. Evaluación Del Crecimiento De Lactobacillus Casei Y Producción De Ácido Láctico Usando Como Sustrato El Suero De Leche De Vacuno. Universidad Del Quindío. (2010)

LLAMOSAS CORRALES JOSÉ. “Principios Bioactivos De La Leche “División Alimentos Corporación Gloria.(2011)

GARCÍA CARLOS A.,. ARRÁZOLA GUILLERMO S, DURANGO ALBA M.. Producción De Ácido Láctico Por Vía Biotecnológica. (2010)

EHRENPREIS E. Lactose Intolerance: Definition, Clinical Features and Treatment. Practical Gastroenterology. (1999).

SCHLIMME E. La leche y sus componentes Propiedades químicas y físicas. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza.(2002)

PANIAGUA DÍAZ HÉCTOR. Manual De Elaboración De Los Productos Lácteos En La Empresa Chelmar S.A. De C. V. En Saltillo, Coahuila. Universidad Michoacana De San Nicolás De Hidalgo. (2008)

COLLADO AMORES MARIA Carmen. Caracterización De Cepas Del Género Bifidobacterium Con Carácter Probiotico. Universidad Politécnica De Valencia. (2004)

MOZZI FERNANDA, RAYA RAÚL R.. VIGNOLO GRACIELA M. Biotechnology of Lactic Acid Bacteria Novel Applications. Blackwell Publishing. (2010)

Probióticos y prebióticos. Guía Práctica de la Organización Mundial de Gastroenterología: Probióticos y prebióticos. WGO Practice Guideline. (2011)

POLVOROSA MONTES ANA. Mesa Redonda: Alimentos Funcionales Oligosacáridos Prebióticos. División de Nutrición Infantil. Nutricia (2002)

GUNTHER BOEHM, BERNARD STAHL1, JOHANN GARSSEN, EUGENIA BRUZZESE, GUIDO MORO, SERTAC ARSLANOGLU. Prebióticos En Fórmulas Infantiles Inmuno Moduladores Durante La Infancia. Universidad De Napoles, Italia.

USME PILAR, JARAMILLO DIANA MARCELA , ÁLVAREZ FELIPE. Microencapsulación De La Lactasa Como Estrategia Para Mejorar La Estabilidad Y La Aplicación En La Industria De Alimentos. Universitaria Lasallista. (2013)

Referencias electrónicas.

PIÑEIRO ELENA, Intolerancia A La Lactosa, Eroski Consumer Revista Digital. (2009). http://Www.Consumer.Es/Web/Es/Alimentacion/Tendencias/2008/10/17/180816.Php

CRIADO MIGUEL Á. Misterio De La Tolerancia A La Lactosa.(2014). http://Esmateria.Com/2014/01/22/Atapuerca-Tambien-Ayuda-A-Desentranar-El-Misterio-De-La-Tolerancia-A-La-Lactosa/

ZÚNIGA GUSTAVO A. Intolerancia a la Lactosa, Lactose Intolerance. Revista Médica Hondureña.(2005) http://www.bvs.hn/RMH/pdf/1995/pdf/Vol63-1-1995-6.PDF

PESSELA COSTA BENAVIDES CH. Ingeniería de Biocatalizadores y Bioprocesos: b-galactosidasa de Thermus sp. T2 Escuela Técnica Superior de Ingenieros Industriales. Universidad Politécnica de Madrid. Madrid. (2002) http://digital.csic.es/bitstream/10261/2715/1/05200202.pdf

DELGADO H, MEJÍA L. Taller Transición Nutricional En América Latina. Actas Del Congreso Latinoamericano De Nutrición; Octubre 2001, Caracas. Revista Scielo. (2001) http://www.scielo.org.ar/scieloOrg/php/reflinks.php

MICHEL A. WATTIAUX. Instituto Babcock. Louis E. Armentano. Departamento De Ciencia De Ganado Lechero. Metabolismo De Carbohidratos En Vacas Lecheras, 2007. http://Babcock.Wisc.Edu/Sites/Default/Files/De/Es/De_03.Es.Pdf

MICHEL A. WATTIAUX. Institute Babcock. Universidad De Wisconsin-Madison. Composición De La Leche Y Valor Nutricional,2007.. http://babcock.wisc.edu/sites/default/files/de/es/de_19.es.pdf

ALAIS CHARLES, Ciencia de la leche, Editorial Continental, México, 1998, Capítulo 8, Componentes de actividad biológica. http://books.google.es/books?id=bW_ULacGBZMC&hl=es

TARANTO MARÍA, MÉDICI MARTA, FONT DE VALDEZ GRACIELA. Laboratorio De Tecnología Y Genética, Centro De Referencia Para Lactobacilos.2005 Revista Química viva. Número 1, Año 4, http://Www.Quimicaviva.Qb.Fcen.Uba.Ar/V4n1/Alimprob.Pdf

SWEENEY. Dairy Chemistry and Biochemistry. Thomson Science, 2-6 Boundary Row, London SE1 SHN, UK. (1998) http://foodidea.ir/pr/ebook/Dairy%20Chemistry%20and%20Biochemistry.pdf

DÍAZ DE LA VEGA LUIS. Tecnología De La Leche Y Sus Derivados, Tomo Editorial Pueblo Y Educación. Http://Www.Ecured.Cu/Index.Php/Lactosa. http://books.google.com.ec/books?hl=es&lr=&id=9mGzkso4NVQC&oi=fnd&pg=PP2&dq=quantification+of+galactose+and++route+metabolic+after+hydrolysis+of+lactose&ots=sj4d8GPZt9&sig=M4S106i8f2JlIPjt-HQod4ugvA8#v=onepage&q&f=false

STEPHANOPOULOS GEORGE, ARISTOS A. ARISTIDOU, NIELSE JENS. Metabolic Engineering: Principles and Methodologies (1998) http://books.google.com.ec/books?id=9mGzkso4NVQC&dq=quantification+of+galactose+and++route+metabolic+after+hydrolysis+of+lactose&lr=&hl=es&source=gbs_navlinks_s

LABAYEN A., MARTÍNEZ A, Bacterias probióticas y deficiencia de lactasa. Departamento de Fisiología y Nutrición. Universidad de Navarra. Pamplona. (2003) http://zl.elsevier.es/es/revista/gastroenterologia-hepatologia-14/bacterias-probioticas-deficiencia-lactasa-13043247-prebioticos-probioticos-mecanismos-accion-sus-aplicaciones-clinicas-2003

RAMÍREZ LÓPEZ GLADYS. Estudio de la leche. Universidad De Antioquia, (2008). http://www.itescam.edu.mx/principal/sylabus/fpdb/recursos/r94473.PDF

CELIS MAURICIO. JUÁREZ DANIEL. "Microbiología de la Leche" . Universidad Tecnológica Nacional. (2009) http://www.edutecne.utn.edu.ar/sem_fi_qui_micrb_09/microbiologia_leche.pdf

RAMÍREZ JOSÉ, ULLOA PETRA, VELÁZQUEZ YANIRA, ULLOA JOSÉ, ROMERO FRANCISCO. Bacterias lácticas: Importancia en los alimentos y sus efectos en la salud. Universidad Autónoma de Nayarit. (2011) http://fuente.uan.edu.mx/publicaciones/03-07/1.pdf

GÖSTA BYLUND. Hidrolisis De Lactosa Por Acción Enzimática Y Formación De Ácido Láctico. Manual De Industrias Lácteas. Mundi-Prensa Libros (2003) http://Books.Google.Com.Ec/Books?Id=Xcan14splccc&Pg=Pa30&Lpg=Pa30&Dq=Produccion+De+Acido+Lactico+A+Partir+De+Glucosa+En+Leche&Source=Bl&Ots=Lqegta_Wpl&Sig=Ue9yejyiaxlwz173jw398rye5fk&Hl=Es&Sa=X&Ei=Cdnuutkglqoc2axm8ihibg&Ved=0ce0q6aewbjgk#V=Onepage&Q=Produccion%20de%20acido%20lactico%20a%20partir%20de%20glucosa%20en%20leche&F=False

MESTRES LAGARRIGA, JOSEP. Productos Lácteos, Tecnología. Universidad Politécnica De Catalunya. (2004) Http://Books.Google.Com.Ec/Books?Id=L5kpzuzucikc&Pg=Pa111&Lpg=Pa111&Dq=Cuantificacion+De+Acido+L%C3%A1ctico+En+Leche&Source=Bl&Ots=Ditwjzelfa&Sig=Fmwwugiu1jilgtcsnkyf8ckwbbc&Hl=Es&Sa=X&Ei=6wpbuu7xg6bk4apgz4didw&Ved=0cf8q6aewctgk#V=Onepage&Q=Cuantificacion%20de%20acido%20l%C3%A1ctico%20en%20leche&F=False

LEO M.L. NOLLET, TOLDRA FIDEL. Handbook of Dairy Foods Analysis Food science and technology. CRC Press, 2009. http://books.google.com.ec/books?id=UPEGQsTbjQYC&pg=PA397&lpg=PA397&dq=quantification+of+galactose+after+hydrolysis+of+lactose&source=bl&ots=cp5nhf-u_

&sig=kEL0qvOftg9m6QfH222b1SwSblk&hl=es&sa=X&ei=YNjVUubGB4bfsAS58oCIAw&ved=0CDkQ6AEwAQ#v=onepage&q=quantification%20of%20galactose%20after%20hydrolysis%20of%20lactose&f=false

TALENS PERALES DAVID , El yogur, un ejemplo de cooperación entre bacterias. Biología, Divulgación (2010) http://e-ciencia.com/blog/divulgacion/el-yogur-un-ejemplo-de-cooperacin-entre-bacterias/

ESPINOZA M ANDREA, ZAPATA C LORENA. Estudio De Yogur Evaluación De Calidad E Información Nutricional. (2010) http//. www.odecu.cl

RAMÓN LOBO RICO JOSÉ. Lo Que No Sabemos Sobre La Leche Y Los Lácteos. Htpp// Www.Unisalud.Es

ANEXO 1: NORMA MEXICANA (NMX-F-219-1972) PARA DETERMINACIÓN DE LACTOSA

RECOPILADO POR:
EL PROGRAMA UNIVERSITARIO DE ALIMENTOS

NMX-F-219-1972. MÉTODO DE PRUEBA PARA LA DETERMINACIÓN DE LACTOSA EN LECHE. TEST METHOD FOR DETERMINATION OF LACTOSE IN MILK. NORMAS MEXICANAS. DIRECCIÓN GENERAL DE NORMAS.

1. ALCANCE

1.1 Esta Norma tiene por objeto establecer el método de prueba para la determinación de la lactosa (método de Fehling) en la leche fresca industrializada, sin adición de azúcares reductores.

2. APARATOS Y EQUIPO

- Balanza analítica con sensibilidad de 0.0001 g.
- Sistema de filtración al vacío.
- Vasos de precipitado de 100 y de 600 ml.
- Matraz aforado de 500 ml.
- Papel filtro plisado.
- Vidrio de Reloj.
- Pipetas volumétricas de 20 y 50 ml.
- Matraz Erlenmeyer de 300 ml con tapón de hule bihoradado.
- Embudo de Allihn (ver 8.1.3).
- Bureta de 50 ml (al 0.1 ml).
- Termómetro.
- Contador de minutos.
- Material común de laboratorio.

3. MATERIALES Y REACTIVOS

Los reactivos que a continuación se mencionan, deben ser grado analítico a menos que se indique otra cosa. Cuando se hable de agua, se debe entender que se trata de agua destilada.

Fehling I.- Disolver 70 g de sulfato de cobre ($CuSO_4$ $5H_2O$) en agua caliente; se enfría y con agua se completa el volumen hasta un litro.

Fehling II.- Se disuelve 350 g de sal de Seignette (tartrato de sodio y potasio con 4 moléculas de agua) y 100 g de hidróxido de sodio en agua, calentar si es necesario. Se enfría y con agua se completa el volumen hasta un litro.

- Solución de hidróxido de sodio 0.25 N.
- Ácido clorhídrico 1 N.
- Ácido nítrico 1:1.
- Urea cristalizada.
- Yoduro de potasio al 30 %.

- Solución titulada de Tiosulfato de sodio N/10 (ver 8.1.2)
- Solución de almidón al 1%, estabilizada y recientemente preparada.

4 TOMA DE LA MUESTRA

Se toma una muestra representativa del lote de prueba, de acuerdo con la Norma Mexicana de Muestreo.- NMX-Z-12 en vigor.

5. PROCEDIMIENTO

5.1 Se pesan exactamente en el vaso de precipitado 12.5 g (P) de la leche y se pasan cuantitativamente, lavando con agua, a un matraz aforado de 500 ml; se añaden cerca de 200 ml de agua y se mezcla muy bien mediante agitación cuidadosa del matraz, evitando la formación de espuma. Para defecar se añaden 15 ml de solución de Fehling I y se agita; después 10 ml de hidróxido de sodio 0.25 N y se agita. Se ajusta a la temperatura de 20°C y se afora el volumen con agua a 20°C. Se mezcla y se filtra.

En el vaso de precipitado de 600 ml se colocan:

- 25 ml de Fehling I.
- 25 ml de Fehling II.
- 50 ml de agua.

5.2 Se cubre con el vidrio de reloj y se hierve. Se toman con pipeta 50 ml de la solución defecada - filtrada, se vierte en la mezcla Fehling hirviente, continuando la ebullición durante 6 minutos exactos, sin quitar el vidrio de reloj.

5.3 Se retira el vaso del fuego y se lava con agua la parte convexa del vidrio de reloj, y su contenido se filtra por el embudo de Allihn conectado al sistema de vacío, enjuagando el vaso con agua caliente para eliminar las trazas de cobre adheridas al vaso y los lavados se pasan al embudo de Allihn.

5.4 Se coloca el embudo de Allihn en el matraz Erlenmeyer de 300 ml; se agregan 5 ml de ácido nítrico 1:1 a un matraz Erlenmeyer de 100 ml, y se calienta. La mitad del ácido se vierte con precaución en el embudo de Allihn, y el resto en el vaso para disolver las trazas de óxido de cobre (I); después de la disolución completa se filtra al vacío, se lava tres veces el embudo con pequeñas porciones de agua, recibiendo los líquidos en el Erlenmeyer.

5.5 Se calienta la solución de nitrato de cobre (volumen total 50 - 70 ml) hasta ebullición, se añaden con cuidado cerca de 1.5 g de urea y se continúa la ebullición durante un minuto. Se deja enfriar, se adicionan 10 ml de yoduro de potasio al 30 % y se titula inmediatamente el yodo liberado con tiosulfato de sodio N/10, añadiendo al final de la titulación 10 ml de la solución de almidón como indicador.

6. CÁLCULOS Y RESULTADOS

6.1 Se convierten los ml de la solución de tiosulfato de sodio N/10 empleados en la titulación a mg de óxido de cobre, multiplicando por el factor de la solución de tiosulfato.

6.2 En la tabla se busca la cantidad de hidrato de lactosa correspondiente a los mg de óxido de cobre.

$$\% \text{ de lactosa} = \frac{M \times 10 \times 100}{P}$$

En donde:

M = Peso en gramos de la lactosa.
P = Peso en gramos de la muestra.
10 = Parte alícuota.

7. REPRODUCCIÓN DE LA PRUEBA

La determinación de la lactosa se realiza por duplicado, partiendo de la solución aforada a 500 ml (ver 5.1.), y los resultados no deben diferir en más de 0.3 %.

8. APÉNDICE

8.1 Observaciones

8.1.1 Esta determinación debe ser preliminar a la de la sacarosa en productos lácteos que hayan sido adicionados con ella (materia prima).

8.1.2 Para la titulación de la solución de tiosulfato de sodio de puede usar el método yodométrico con cobre electrolítico.

8.1.3 El embudo de Allihn debe ser de placa porosa de vidrio Jena 15, a G4-20 mm de diámetro aproximadamente.

8.3 BIBLIOGRAFÍA

Official Methods of Analysis Agricultural Chemists

Eleventh Edition Procedure 16050 p. 250.
(Manuel Suisse des Denrées Alimentaires, 4 eme edition, 1939, pags. 451 a 456).

México, D.F., Marzo 24, 1972
Fecha de aprobación y publicación: Abril 8, 1972.

ANEXO 2: FICHA TÉCNICA DE FERMENTO ABY-3

CHR. HANSEN

FD-DVS ABY-3

Product Information

Description

Thermophilic Lactic Culture.
Defined mixed strain culture containing LA-5™ *Lactobacillus acidophilus*, BB-12™ Bifidobacterium, *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. The probiotic strains in this culture have a long history of safe use.
ABY-3 is supplied in a convenient freeze-dried form.

Application

The culture will produce a fermented milk with high body and medium/mild flavor and a low post-acidification. ABY-3 is ideal for the manufacturing of the following types of fermented milk products:

- Cup Set
- Stirred
- Drinking

Packing

Packing size	Item number
10 x 50U	669852
25 X 200U	666092
20 X 500U	666091

Availability

The following ABY products are available as both/or frozen and freeze-dried DVS: ABY-1, ABY-2 and ABY-3.

Storage and shelf life

Freeze-dried cultures should be stored at -18°C (0°F) or below. If the cultures are stored at -18°C (0°F) or below, the shelf life is at least 24 months. At +5°C (41°F) the shelf life is at least 6 weeks.

Instructions for use

Remove the cultures from the freezer just prior to use. **DO NOT THAW THESE CULTURES.** Sanitize the top of the pouch with chlorine. Open the pouch and pour the freeze-dried granules directly into the pasteurized product using slow agitation. Agitate the mixture for 10-15 minutes to distribute the culture evenly.

Dosage

Recommended dosage of FD-DVS ABY-3:

DVS inoculation level	Amount of milk to be inoculated			
	1,000 l	5,000 l	500 gallons	1000 gallons
500U/2500 l 500U/660 gallons	200U	1000U	~400U	~750U
500U/5000 l 500U/1320 gallons	100U	500U	~200U	~400U

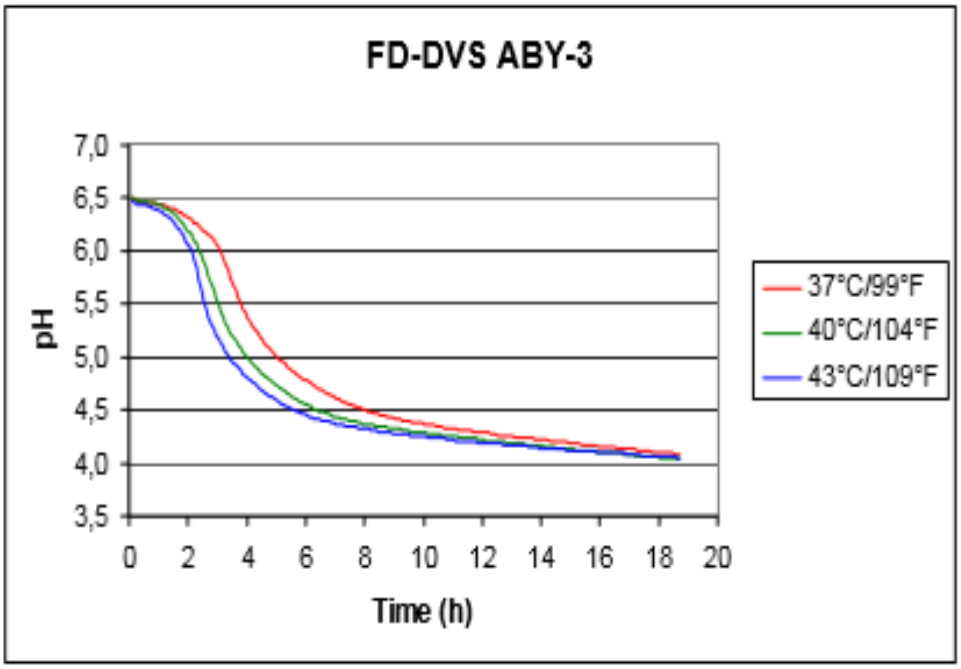
The full benefit of 0.02% inoculation, on acidification speed, is obtained at a fermentation temperature of 43°C (109°F). To obtain cell counts of BB-12 and LA-5 as stated in the "Nutrish technical brochure", an inoculation rate of minimum 0.02% must be applied.

CHR. HANSEN

Kosher status ABY-3 is Kosher approved (Circle K D) for year-round use, excluding Passover.

Technical information

Figure 1. The effect of temperature on acidification



Fermentation conditions:
Whole milk +2% skimmed milk powder (85°C (185°F)/30 min
500U/2500 l Inoculation

NB: Note that the accuracy of these curves is relative and subject to experimental error.

Technical service Chr. Hansen's worldwide facilities and the personnel of our Application and Technology Center are at your disposal with assistance and instructions.

References References and analytical methods are available upon request.

ANEXO 3: FICHA TÉCNICA DE NORMA ECUATORIANA PARA LECHES FERMENTADAS

INEN

INSTITUTO ECUATORIANO DE NORMALIZACIÓN

Quito - Ecuador

NORMA TÉCNICA ECUATORIANA **NTE INEN 2395:2011**
Segunda revisión

LECHES FERMENTADAS. REQUISITOS.

Primera Edición

FERMENTE MILKS. REQUIREMENTS.

First Edition

DESCRIPTORES: Tecnología de los alimentos, leche y productos lácteos procesados, leches fermentadas, requisitos.
AL 03.01-442
CDU: 637.146
CIIU: 3112
ICS: 67.100.01

CDU: 637.146
ICS: 67.100.01

CIIU: 3112
AL 08.01-442

Norma Técnica Ecuatoriana Voluntaria	LECHES FERMENTADAS. REQUISITOS	NTE INEN 2395:2011 Segunda revisión 2011-07

1. OBJETO

1.1 Esta norma establece los requisitos que deben cumplir las leches fermentadas, destinadas al consumo directo.

2. ALCANCE

2.1 Esta norma se aplica a las leches fermentadas naturales: yogur, kéfir, kumis, leche cultivada o acidificada; leches fermentadas con ingredientes y leches fermentadas tratadas térmicamente.

2.2 No se aplican a las bebidas de leches fermentadas

3. DEFINICIONES

3.1 Para efectos de esta norma se adoptan las siguientes definiciones:

3.1.1 *Leche Fermentada natural.* Es el producto lácteo obtenido por medio de la fermentación de la leche, elaborado a partir de la leche por medio de la acción de microorganismos adecuados y teniendo como resultado la reducción del pH con o sin coagulación (precipitación isoeléctrica). Estos cultivos de microorganismos serán viables, activos y abundantes en el producto hasta la fecha de vencimiento. Si el producto es tratado térmicamente luego de la fermentación, no se aplica el requisito de microorganismos viables. Comprende todos los productos naturales, incluida la leche fermentada líquida, la leche acidificada y la leche cultivada y al yogur natural, sin aromas ni colorantes.

3.1.2 *Producto natural.* Es el producto que no está aromatizado, no contiene frutas, hortalizas u otros ingredientes que no sean lácteos, ni está mezclado con otros ingredientes que no sean lácteos.

3.1.3 *Yogur.* Es el producto coagulado obtenido por fermentación láctica de la leche o mezcla de esta con derivados lácteos, mediante la acción de bacterias lácticas *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *Streptococcus salivaris* subsp. *thermophilus,* pudiendo estar acompañadas de otras bacterias benéficas que por su actividad le confieren las características al producto terminado; estas bacterias deben ser viables y activas desde su inicio y durante toda la vida útil del producto. Puede ser adicionado o no de los ingredientes y aditivos indicados en esta norma.

3.1.4 *Kéfir.* Es una leche fermentada con cultivos ácido lácticos elaborados con granos de kéfir, Lactobacillus kéfir, especies de géneros Leuconostoc, Lactococcus y Acetobacter con producción de ácido láctico, etanol y dióxido de carbono. Los granos de kéfir están constituidos por levaduras fermentadoras de lactosa (*Kluyveromyces marxianus*) y levaduras no fermentadoras de lactosa (*Saccharomyces omnisporus, Saccharomyces cerevisae* y *Saccharomyces exiguus*), *Lactobacillus casei, Bifibobacterium sp y Streptococcus salivarius subs. Thermophilus*, por cuales deben ser viables y activos durante la vida útil del producto.

3.1.5 *Kumis.* Es una leche fermentada con *Lactococcus Lactis subsp cremoris* y *Lactococcus Lactis subsp lactis*, los cuales deben ser viables y activos en el producto hasta el final de su vida útil, con producción de alcohol y ácido láctico.

3.1.6 *Leche cultivada, o acidificada.* Es una leche fermentada por la acción de *Lactobacillus acidophilus* (leche acidificada) o *Bifidobacterium sp.*, u otros cultivos lácticos inocuos apropiados, los cuales deben ser viables y activos durante la vida útil del producto.

3.1.7 *Leche fermentada tratada térmicamente.* Es el producto definido en el numeral 3.1.1 y 3.1.9, que ha sido sometido a tratamiento térmico, después de la fermentación. Los cultivos de microorganismos no serán viables ni activos en el producto final.

(Continúa)

DESCRIPTORES: Tecnología de los alimentos, leche y productos lácteos procesados, leches fermentadas, requisitos

3.1.8 *Leche fermentada con ingredientes.* Son productos lácteos compuestos, que contienen un máximo del 30 % (m/m) de ingredientes no lácteos (tales como edulcorantes, frutas y verduras así como jugos, purés, pastas, preparados y conservantes derivados de los mismos, cereales, miel, chocolate, frutos secos, café, especias y otros alimentos aromatizantes naturales e inocuos) y/o sabores. Los ingredientes no lácteos pueden ser añadidos antes o luego de la fermentación.

3.1.9 *Leche fermentada concentrada.* Es una leche fermentada cuya proteína ha sido aumentada antes o luego de la fermentación a un mínimo del 5,6%. Las leches fermentadas concentradas incluyen productos tradicionales tales como Stragisto (yogur colado), Labneh, Ymer e Ylette.

3.1.10 *Leche fermentada adicionada con microorganismos probióticos.* Es el producto definido en el numeral 3.1.1 al cual se le han adicionado bacteria vivas benéficas, que al ser ingeridas favorecen la microflora intestinal.

3.1.11 *Microorganismo probiótico.* Microorganismo vivo, que suministrado en la dieta e ingerido en cantidad suficiente ejerce un efecto benéfico sobre la salud, más allá de los efectos nutricionales.

4. CLASIFICACIÓN

4.1 De acuerdo a sus características las leches fermentadas, se clasifican de la siguiente manera:

4.1.1 *Según el contenido de grasa en:*

a) Entera.

b) Semidescremada (parcialmente descremada).

c) Descremada.

4.1.2 *De acuerdo a los ingredientes en:*

a) Natural,

b) Con ingredientes,

4.1.3 *De acuerdo al proceso de elaboración en:*

a) Batido,

b) Coagulado o aflanado,

c) Tratado térmicamente

d) Concentrado,

e) Deslactosado.

4.1.4 *De acuerdo al contenido de etanol, el Kéfir se clasifica en:*

a) suave

b) fuerte

5. DISPOSICIONES ESPECÍFICAS

5.1 La leche que se utilice para la elaboración de leches fermentadas debe cumplir con la NTE INEN 09, y posteriormente ser pasteurizada (ver NTE INEN 10) o esterilizada (ver NTE INEN 701) y debe manipularse en condiciones sanitarias según el Reglamento de Buenas Prácticas de Manufactura del Ministerio de Salud Pública.

(Continúa)

5.2 Se permite el uso de otras leches diferentes a las de vaca, siempre que en la etiqueta se declare de que mamífero procede.

5.3 Las leches fermentadas, deben presentar aspecto homogéneo, el sabor y olor deben ser característicos del producto fresco, sin materias extrañas, de color blanco cremoso u otro propio, resultante del color de la fruta o colorante natural añadido, de consistencia pastosa; textura lisa y uniforme.

5.4 A las leches fermentadas pueden agregarse, durante el proceso de fabricación, crema previamente pasteurizada, leche en polvo, leche evaporada, grasa láctea anhidra y proteínas lácteas.

5.5 Los residuos de medicamentos veterinarios y sus metabolitos no deben superar los límites establecidos por el Codex Alimentario CAC/LMR 2 en su última edición.

5.6 Los residuos de plaguicidas, pesticidas y sus metabolitos, no deben superar los límites establecidos por el Codex Alimentario CAC/LMR 1 en su última edición.

5.7 Se permite el uso de vitaminas, minerales y otros nutrientes específicos, de acuerdo con lo establecido en la NTE INEN 1334-2.

6. REQUISITOS

6.1 Requisitos específicos

6.1.1 A las leches fermentadas podrán añadirse: azúcares o edulcorantes permitidos, frutas frescas enteras o en trozos, pulpa de frutas, frutas secas y otros preparados a base de frutas. El contenido de fruta adicionada no debe ser inferior al 5 % (m/m) en el producto final.

6.1.2 Se permite la adición de otros ingredientes como: hortalizas, miel, chocolate, cacao, coco, café, cereales, especias y otros ingredientes naturales. Cuando se utiliza café el contenido máximo de cafeína será de 200 mg/kg, en el producto final. El peso total de las sustancias no lácteas agregadas a las leches fermentadas no será superior al 30% del peso total del producto.

6.1.3 La leche fermentada con frutas u hortalizas, al realizar el análisis histológico deben presentar las características propias de la fruta u hortaliza adicionada.

6.1.4 Las leches fermentadas, ensayadas de acuerdo con las normas ecuatorianas correspondientes deben cumplir con lo establecido en la tabla 1.

TABLA 1. Especificaciones de las leches fermentadas

REQUISITOS	ENTERA		SEMIDESCREMADA		DESCREMADA		METODO DE ENSAYO
	Min %	Max %	Min %	Max %	Min %	Max %	
Contenido de grasa	2,5	---	1,0	<2,5	---	<1,0	NTE INEN 12
Proteína, % m/m En yogur, kéfir, kumis, leche cultivada	2,7	--	2,7	--	2,7	--	NTE INEN 16
Alcohol etílico, % m/v En kéfir suave En kéfir fuerte Kumis	0,5 -- 0,5	1,5 3,0 ---	0,5 -- 0,5	1,5 3,0 ---	0,5 -- 0,5	1,5 3,0 ---	NTE INEN 379
Presencia de adulterantes[1)] Grasa Vegetal Suero de Leche	Negativo Negativo Negativo		Negativo Negativo Negativo		Negativo Negativo Negativo		NTE INEN 1500 NTE INEN 1500 NTE INEN 2401

* Expresado como ácido láctico

1) Adulterantes: Harina y almidones (excepto los almidones modificados) soluciones salinas, suero de leche, grasas vegetales.

6.1.5 Las leches fermentadas deben cumplir con los requisitos del contenido mínimo del cultivo del microorganismo especifico *(Lactobacillus delbrueki* subsp. *bulgaricus* y *Streptococcus salivaris* subsp. *thermophilus*; *Lactobacillus acidophilus*, según sea el caso), y de bacterias prebióticas, hasta la fecha de vencimiento, de acuerdo con lo indicado en la tabla 2.

TABLA 2. Cantidad de microorganismos específicos en leche fermentada sin tratamiento térmico posterior a la fermentación

PRODUCTO	Yogur, kumis, kéfir, leche cultivada, leches fermentadas con ingredientes y leche fermentada concentrada Mínimo	kéfir y kumis Mínimo
Suma de microorganismos que comprenden el cultivo definido para cada producto	10^7 UFC/g	
Bacterias probióticas	10^6 UFC/g	
Levaduras		10^4 UFC/g

6.1.6 Requisitos microbiológicos

6.1.6.1 Al análisis microbiológico correspondiente las leches fermentadas deben dar ausencia de microorganismos patógenos, de sus metabolitos y toxinas.

6.1.6.2 Las leches fermentadas, ensayadas de acuerdo con las normas ecuatorianas correspondientes deben cumplir con los requisitos microbiológicos establecidos en la tabla 3.

TABLA 3. Requisitos microbiológicos en leche fermentada sin tratamiento térmico posterior a la fermentación

Requisito	n	m	M	c	Método de ensayo
Coliformes totales, UFC/g	5	10	100	2	NTE INEN 1529-7
Recuento de *E. coli*, UFC/g	5	<1	-	0	NTE INEN 1529-8
Recuento de mohos y levaduras, UFC/g	5	200	500	2	NTE INEN 1529-10

En donde:

n = Número de muestras a examinar.
m = Índice máximo permisible para identificar nivel de buena calidad.
M = Índice máximo permisible para identificar nivel aceptable de calidad.
c = Número de muestras permisibles con resultados entre m y M.

6.1.6.3 Cuando se analicen muestras individuales se tomaran como valores máximos los expresados en la columna m.

6.1.6.4 Las leches fermentadas tratadas térmicamente y envasadas asépticamente deben demostrar esterilidad comercial de acuerdo a NTE INEN 2335

6.1.7 *Aditivos*. Se permite el uso de los aditivos establecidos en la NTE INEN 2074 para estos productos

6.1.8 *Contaminantes*. El límite máximo de contaminantes no deben superar los límites establecidos por el Codex Stan 193-1995

6.2 Requisitos complementarios

6.2.1 Las leches fermentadas, siempre que no se hayan sometido al proceso de esterilización, deben mantenerse en refrigeración durante toda su vida útil.

(Continúa)

6.2.2 Las unidades de comercialización de este producto debe cumplir con lo dispuesto en la Ley 2007-76 del Sistema Ecuatoriano de la Calidad.

7. INSPECCIÓN

7.1 Muestreo. El muestreo debe realizarse de acuerdo con lo establecido en la NTE INEN 04.

7.2 Aceptación o rechazo. Se acepta el lote si cumple con los requisitos establecidos en esta norma; caso contrario se rechaza.

8. ENVASADO Y EMBALADO

8.1 Las leches fermentadas deben expenderse en envases asépticos, y herméticamente cerrados, que aseguren la adecuada conservación y calidad del producto.

8.2 Las leches fermentadas deben acondicionarse en envases cuyo material, en contacto con el producto, sea resistente a su acción y no altere las características organolépticas del mismo.

8.3 El embalaje debe hacerse en condiciones que mantenga las características del producto y aseguren su inocuidad durante el almacenamiento, transporte y expendio.

9. ROTULADO

9.1 El Rotulado debe cumplir con los requisitos establecidos en el RTE INEN 022

(Continúa)

ANEXO 4: FICHA TÉCNICA DE AGAR MRS

LACTOBACILLI MRS BROTH (7406)

Intended Use
Lactobacilli MRS Broth is used for the cultivation of lactobacilli.

Product Summary and Explanation
Lactobacilli MRS Broth is based on the formulations of deMan, Rogosa and Sharpe (MRS).[1] This medium supports luxuriant growth of lactobacilli from oral, fecal, dairy, and other sources.

Principles of the Procedure
Enzymatic Digest of Animal Tissue, Beef Extract, and Yeast Extract are the carbon, nitrogen, and vitamin sources used to satisfy general growth requirements in Lactobacilli MRS Broth. Dextrose is the fermentable carbohydrate. Sodium Acetate is an inhibitory agent. Sodium Acetate and Ammonium Citrate act as selective agents as well as energy sources. Potassium Phosphate is the buffering agent. Magnesium Sulfate and Manganese Sulfate provide cations used in metabolism. Polysorbate 80 is a surfactant, facilitating uptake of nutrients by lactobacilli.

Formula / Liter

Enzymatic Digest of Animal Tissue	10 g
Beef Extract	10 g
Yeast Extract	5 g
Dextrose	20 g
Sodium Acetate	5 g
Polysorbate 80	1 g
Potassium Phosphate	2 g
Ammonium Citrate	2 g
Magnesium Sulfate	0.1 g
Manganese Sulfate	0.05 g

Final pH: 6.5 ± 0.2 at 25°C
Formula may be adjusted and/or supplemented as required to meet performance specifications.

Precautions
1. For Laboratory Use.

Directions
1. Dissolve 55 g of the medium in one liter of purified water.
2. Mix thoroughly.
3. Autoclave at 121°C for 15 minutes.

Quality Control Specifications
Dehydrated Appearance: Powder is homogeneous with soft lumps and yellow-tan.

Prepared Appearance: Prepared medium is clear to slightly hazy with none to light precipitate and dark amber to red-amber.

Expected Cultural Response: Cultural response in Lactobacillus MRS Broth at 35 ± 2°C and examined for growth after 18 - 48 hours incubation.

Microorganism	Approx. Inoculum (CFU)	Expected Results
Lactobacillus casei ATCC® 393	10 - 300	Growth
Lactobacillus fermentum ATCC® 9338	10 - 300	Growth
Lactobacillus plantarum ATCC® 8014	10 - 300	Growth

The organisms listed are the minimum that should be used for quality control testing.

Test Procedure
1. Samples can be inoculated directly into Lactobacillus MRS Broth.
2. Incubate broth tubes at 35°C for 3 days, or at 30°C for 5 days in an aerobic atmosphere.
3. Subculture growth in broth tubes to appropriate solid media.

Results
Growth of *Lactobacillus* spp. appear turbid. Growth can be subcultured onto appropriate media for use in additional procedures. Refer to appropriate references for recommendation on the identification of *Lactobacillus* spp.[2-4]

Storage
Store sealed bottle containing the dehydrated medium at 2 - 8°C. Once opened and recapped, place container in a low humidity environment at the same storage temperature. Protect from moisture and light by keeping container tightly closed.

Expiration
Refer to expiration date stamped on the container. The dehydrated medium should be discarded if not free flowing, or if appearance has changed from the original color. Expiry applies to medium in its intact container when stored as directed.

Limitations of the Procedure
1. Due to varying nutritional requirements, some strains may be encountered that grow poorly or fail to grow on this medium.
2. Organisms other than lactobacilli may grow in this medium. Isolates must be confirmed as lactobacilli by appropriate biochemical testing.

Packaging

Lactobacilli MRS Broth	**Code No.**	**7406A**	**500 g**
		7406B	**2 kg**
		7406C	**10 kg**

References

1. **deMan, J. C., M. Rogosa, and M. E. Sharpe.** 1960. A medium for the cultivation of lactobacilli. J. Bacteriol. 23:130.
2. **MacFaddin, J. F.** 1985. Media for the isolation-cultivation-identification-maintenance of medical bacteria, vol. 1 Williams & Wilkins, Baltimore, MD.
3. **Vanderzant, C. and D. F. Splittstoesser (eds.).** Compendium of methods for the microbiological examination of foods, 3rd ed. American Public Health Association, Washington, D.C.
4. **Murray, P. R., E. J. Baron, M. A. Pfaller, F. C. Tenover, and R. H. Yolken (eds.).** 1995. Manual of clinical microbiology, 6th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

Technical Information
Contact Acumedia Manufacturers, Inc. for Technical Service or questions involving dehydrated culture media preparation or performance at (517)372-9200 or fax us at (517)372-2006.

ANEXO 5: FICHA DE CATACIÓN

UNIVERSIDAD DEL AZUAY
FACULTAD DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA
INGENIERÍA EN ALIMENTOS

Estimado consumidor:

La presente es una ficha de catación dirigida para la evaluación sensorial de un nuevo producto, razón por la que sus respuestas serán de gran utilidad.

¿Consume habitualmente yogur?

Si ☐ No ☐

Señale con una X la calificación de acuerdo a su Los valores a considerar son los siguientes:
4: Muy Bueno 3: Bueno 2: Regular 1: Malo

VISUAL

Aspecto	Calificación			
	4	3	2	1
Homogéneo				
Fluido				
Presenta Sinéresis				
Otro (especifique):				

OLFATIVO

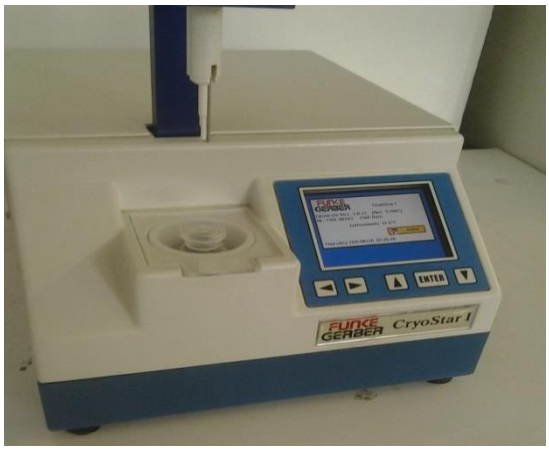
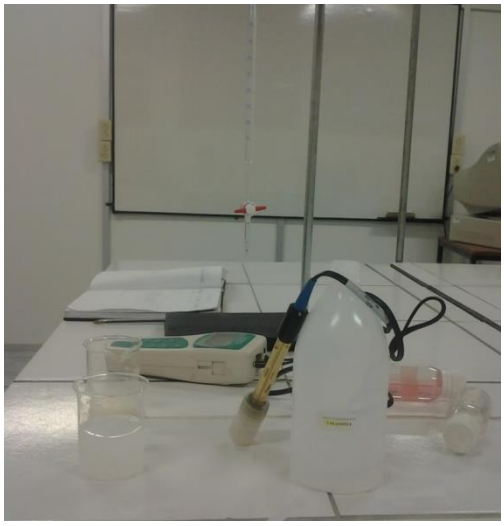
Olor	Calificación			
	4	3	2	1
Agradable				
Propio				
Frutal				
Acido				
Otro (especifique):				

SABOR

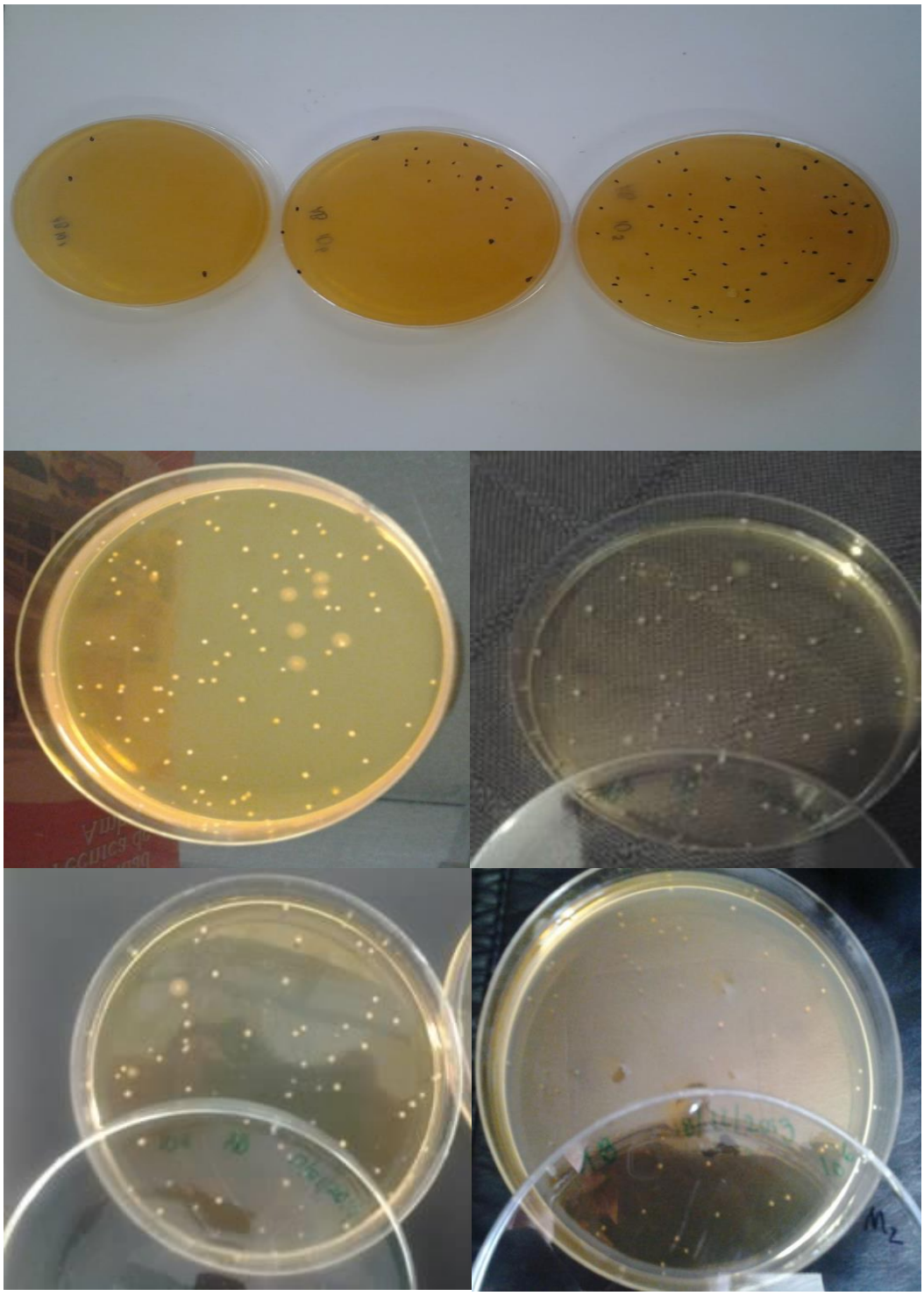
Sabor	Calificación			
	4	3	2	1
Dulce				
Ácido				
Amargo				
Salado				
Picante				
Otro (especifique):				

Observaciones:_____

ANEXO 6: IMÁGENES

Enzima Lactasa	**Crioscopio**
	
Incubadora	**Potenciómetro**
	

COLONIAS DE *BÁCTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS EN AGAR MRS*



Determinación de Lactosa 	**Muestras Hidrolizadas**
Inoculación y Fermentación 	**Preparación de disoluciones**