



FACULTAD DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA
ESCUELA DE INGENIERÍA EN ALIMENTOS

**Aplicación de diseño experimental de respuesta de superficie box
behnen para el desarrollo de una leche probiótica hidrolizada.**

Trabajo de graduación previo a la obtención del título de:

INGENIERO DE ALIMENTOS

Autor:

DORIS ALEXANDRA PACHECO VANEGAS

Director:

MARÍA FERNANDA ROSALES MEDINA

CUENCA, ECUADOR

2016

DEDICATORIA

A Dios, por darme la oportunidad de vivir y por estar conmigo en cada paso que doy, por fortalecer mi corazón e iluminar mi mente y por haber puesto en mi camino a aquellas personas que han sido mi soporte y compañía durante todo el periodo de estudio.

A mis padres César y Mariana por darme la vida, por el amor que me brindan a diario, por todo su apoyo y sacrificio que me han permitido alcanzar cada una de las metas que me trazado en la vida, gracias por darme el estudio que es la mejor herencia que un hijo puede tener, todo lo que soy se los debo a Uds.

A mis abuelos por todas las enseñanzas y amor que me brindan, especialmente a mi ángel por darme tantas enseñanzas de vida por ser la guerrera que fue, me demostró que todo lo que uno se propone se puede lograr.

A mis hermanos, Santy y Jacky, por estar conmigo y apoyarme siempre, les amo.

A Pablo por la persona que siempre ha estado conmigo en las buenas y en las malas, a la cual le debo tanto, por su amor y apoyo.

A mis amigos, Emi, Gaby, Ivi, Vladi, Xavi, por compartir los buenos y malos momentos.

AGRADECIMIENTOS

Un agradecimiento muy especial a Dios por ser el eje fundamental en mi vida.

A mis padres por ser mi apoyo incondicional en todo momento por formarme con principios, valores y con su ejemplo para ser una persona de bien.

Un agradecimiento especial al Ingeniero Claudio Sánchez por sus aportes de conocimientos científicos, y por toda la ayuda recibida durante la elaboración del trabajo.

A la Ingeniera María Fernanda Rosales por la ayuda brindada y por la dirección del trabajo.

A la Ingeniera María Alicia Peña por el aporte de sus conocimientos y por toda la ayuda brindada.

.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

CONTENIDOS	pág.
DEDICATORIA	II
AGRADECIMIENTOS	III
INDICE DE TABLAS	IX
INDICE DE FIGURAS.....	XII
INDICE DE ANEXOS.....	xv
RESUMEN.....	XVI
ABSTRACT.....	XVII
INTRODUCCION.....	1
CAPITULO 1	6
1.1 Lactasa.....	6
1.2 Fermentación ácido láctica:	7
1.2.1 Fermentación de hexosas	9
1.2.2 Fermentación de disacáridos.	13
1.3 Hidrólisis de lactosa por vía enzimática.....	16
1.3.1 Transporte de la Lactosa para la hidrólisis por la ruta metabólica EMBDEN-MEYERHOF-PARNAS.....	16

1.3.2 Ruta metabólica de Leloir de la galactosa luego de la hidrólisis enzimática.....	17
1.4 Intolerancia a la lactosa.	17
1.5 Microorganismos probióticos.....	19
1.5.1 Definiciones.	19
1.5.2 Tipos (Lactobacilos, Bifidobacterias)	20
1.5.2.1 Lactobacillus acidophilus	20
1.5.2.2 Bididumbacterium breve	20
1.5.2.3 Lactobacillus rhamnosus	21
1.5.3 Características e Importancia para la salud	22
1.6 Leches fermentadas con acidez controlada.	23
1.6.1 Ventajas	23
1.6.2 Productos existentes en el mercado internacional	23
1.7 Aspectos Tecnológicos.....	25
1.8 Diseño de Box-Behnken.....	25
1.9 Fluidos no Newtonianos.....	27
1.9.1 Fluidos Pseudoplásticos.	27
1.9.2 Fluidos plásticos	27
1.9.3 Fluidos dilatantes.....	28
1.10 Extensión de la vida de estante.	28
1.11 La vida útil sensorial	29
1.12 Análisis de Weibull	29

CAPITULO 2.....	32
2.1 Materiales y métodos	32
2.2 Materias primas y suministros.....	32
2.3 Métodos de control que se utilizarán en la investigación.....	32
2.3.1 Métodos físico químicos	32
2.3.2 Microbiológicos	33
2.3.3 Evaluación sensorial.....	33
2.4 Diseño de los experimentos.....	33
2.4.1 Diseño del experimento 1. Hidrólisis de la lactosa	33
2.4.2 Diseño del experimento 2. Mezclas de cepas BAL para elaboración del cultivo mixto	35
2.4.3 Experimento 3. Fermentación de leches deslactosadas con las mejores variantes de cultivo.....	37
2.4.4 Experimento 4. Estudio de almacenamiento de la leche fermentada	37
2.4.4.1 Evaluación bajo condiciones controladas en la cámara climatizada Binder.....	37
2.4.5 Experimento 5. Producción en planta piloto	38
2.5 Evaluación del costo de producción por unidad.....	41
CAPITULO 3	42
3.1 Desarrollo del Diseño Experimental	42

3.1.1	Sustrato 1.....	42
3.1.2	Sustrato 2.....	45
3.2.	Hidrólisis de lactosa	48
3.2.1	Sustrato 1: 85°C por 30 minutos.....	48
3.2.1.1	Resumen de datos obtenidos del primer sustrato (85°C por 30 minutos)	51
3.2.1.2.	Interpretación:	52
3.2.2	Sustrato 2: 90°C por 5 minutos.....	53
3.2.2.1	Resumen de los datos obtenidos en el segundo sustrato (90°C por 5 minutos).....	56
3.2.2.2	Interpretación	57
3.3.	Velocidad de Reacción.....	58
3.3.1	Sustrato 1: 85°C por 30 minutos.....	58
3.3.2	Sustrato2: 90°C por 5 minutos.....	59
3.4.	Mezclas de cepas BAL para elaboración del cultivo mixto	61
3.5.	Pruebas de determinación de capacidad probiótica.....	63
3.5.1.	Tolerancia al ácido	63
3.5.2	Tolerancia a la bilis	65
3.5.3.	Determinación Antipatógena.....	66
3.6	Identificación de bacterias beneficiosas en el microscopio	70
3.6.1	Interpretación	71
3.7	Curva de Acidificación.....	71

3.7.1 Interpretación:	73
3.8 Análisis sensorial.....	73
3.8.1 Interpretación	76
3.9 La vida útil sensorial	76
3.9.1 Análisis Weibull en el experimento 2.	78
3.9.2 Análisis Weibull en el experimento 5.	81
3.9.3 Interpretación:	84
3.10 Análisis Reológicos.....	84
3.10.1 Experimento 2	84
3.10.2 Experimento 5	85
3.10.3 Experimento Yogurt batido.....	86
3.11 Punto de Equilibrio de Producción Piloto.	86
3.12 Punto de Equilibrio de Producción Piloto.	88
3.13 Discusión.....	89
CONCLUSIONES.	91
RECOMENDACIONES.....	92
BIBLIOGRAFIA	93
ANEXOS	102

INDICE DE TABLAS

Tabla 1: Diseño de experimento para la hidrolisis de la lactosa	34
Tabla 2: Agares utilizados para las pruebas de aislamiento.....	35
Tabla 3: Diseño de las mezclas de cepas para el cultivo mixto.....	36
Tabla 4: Costos unitarios de materias primas e insumos	41
Tabla 5: Matriz del modelo Box-Behnken etapa de hidrólisis	43
Tabla 6: Coeficientes de las variables en la etapa de hidrólisis.....	44
Tabla 7: Valores experimentales para el diseño de máxima pendiente	44
Tabla 8: Matriz del modelo Box-Behnken etapa de hidrólisis.....	46
Tabla 9: Coeficientes de las variables en la etapa de hidrólisis.....	47
Tabla 10: Valores experimentales para el diseño de máxima pendiente	47
Tabla 11: Hidrólisis de lactosa a temperatura de 30°C.	48
Tabla 12: Hidrólisis de lactosa a temperatura a 40°C.	49
Tabla 13: Hidrólisis de lactosa a temperatura a 50°C.....	50
Tabla 14: Resumen de tiempo, temperatura, cantidad de enzima utilizada y resultados del % de hidrolisis en el primer sustrato.	51
Tabla 15: Contenido de lactosa, lactosa residual, glucosa y galactosas producida luego del proceso de hidrólisis a las diferentes temperaturas.....	52
Tabla 16: Hidrólisis de lactosa a temperatura de 30°C.....	53
Tabla 17: Hidrolisis de Lactosa a temperatura a 40°C	54

Tabla 18: Hidrólisis de Lactosa a temperatura a 50°C	55
Tabla 19: Resumen de tiempo, temperatura; cantidad de enzima utilizada y resultados del % de hidrólisis en el segundo sustrato.	56
Tabla 20: Contenido de lactosa, lactosa residual, glucosa y galactosas producida luego del proceso de hidrólisis a las diferentes temperaturas, en el segundo sustrato.	57
Tabla 21: Concentración de lactosa durante el proceso de hidrolisis de primera muestra	58
Tabla 22: Concentración de lactosa durante en el proceso de hidrólisis de la segunda muestra	59
Tabla 23: Agares utilizados para las pruebas de aislamiento	61
Tabla 24: Diseño de las mezclas de cepas para el cultivo mixto	62
Tabla 25: Recuento de cepas LAB en agar MRS	63
Tabla 26: Recuento en placa de los cultivos base	63
Tabla 27: Tolerancia a diferentes concentraciones de ácido clorhídrico	64
Tabla 28: Tolerancia a la bilis 2 porcentajes	66
Tabla 29: Halos de inhibición de la actividad antipatógena	67
Tabla 30: Tamaño de Halos	68
Tabla 31: Resultados de la prueba de evaluación sensorial.....	69
Tabla 32: Grados Dornic (Acidez titulable) de los experimentos 2 y 5	72
Tabla 33: Nomenclatura de las fichas de cata	74

Tabla 34: Resultados obtenidos de la ficha de catación en relación al aspecto visual.
 74

Tabla 35: Resultados obtenidos de la ficha de catación en relación al sentido del olfato
 75

Tabla 36: Resultados obtenidos de la ficha de catación en relación al sabor 75

Tabla 37: Resultados obtenidos experimento 2 a 4°C. 77

Tabla 38: Resultados obtenidos experimento 5 a 4°C. 78

Tabla 39: Pruebas de Bondad-de-Ajuste para TIEMPO Prueba de Kolmogorov-Smirnov 79

Tabla 40: Áreas de Cola para TIEMPO 79

Tabla 41: Valores Críticos para TIEMPO 79

Tabla 42: Pruebas de Bondad-de-Ajuste para TIEMPO Prueba de Kolmogorov-Smirnov. 81

Tabla 43: Áreas de Cola para TIEMPO 82

Tabla 44: Valores Críticos para TIEMPO 82

INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Vías de fermentación de glucosa A).Fermentación Homoláctica, B).Fermentación Heteroláctica	11
Figura 2: Metabolismo de galactosa de bacterias ácido lácticas. A) Vía tagatosa-6- fosfato. B) Via Leloir	12
Figura 3: La membrana celular y la lucha por la vida de las bacterias ácido lácticas.	17
Figura 4: La membrana celular y la lucha por la vida de las bacterias ácido lácticas.	17
Figura 5: Diseños de Box-Behnken para K=3, 4 y 5 factores.....	26
Figura 6: Representación del diseño Box-Behnken para tres factores.....	26
Figura 7: Curvas de viscosidad 1) fluido newtoniano 2) fluido pseudoplástico 3) fluido dilatante 4) plástico de Bingham.....	28
Figura 8: Curvas de fluidez 1) fluido newtoniano 2) fluido pseudoplástico 3) fluido dilatante 4) plástico de Bingham.....	28
Figura 9: Velocidad de fallo en función del tiempo.....	31
Figura 10: Diagrama de Flujo elaboración de yogur.	39
Figura 11: Half- Normal Plot coeficientes de las variables.	44
Figura 12: Half- Normal Plot coeficientes de las variables.	47
Figura 13: Porcentaje de hidrólisis de lactosa a 30°C.	49
Figura 14: Porcentaje de hidrólisis de lactosa a 40°C.	50
Figura 15: Porcentaje de hidrólisis de lactosa a 50°C.	51

Figura 16: Contenido de lactosa, glucosa y galactosa en función de la temperatura.	52
Figura 17: Porcentaje de Hidrolisis de lactosa a 30°C.	54
Figura 18: Porcentaje de Hidrolisis de lactosa a 40°C.	55
Figura 19: Porcentaje de Hidrolisis de lactosa a 50°C.	56
Figura 20: Contenido de azúcares en el segundo sustrato.	57
Figura 21: Concentración de lactosa para el cálculo de Km en la primera muestra.	58
Figura 22: Concentración de lactosa para el cálculo de Km en la segunda muestra.	59
Figura 23: Representación gráfica de la tolerancia al ácido clorhídrico 6M.	65
Figura 24: Representación gráfica de la tolerancia a la bilis.	66
Figura 25: Halos de inhibición antipatógeno.	68
Figura 26: Curvas de crecimiento de las bacterias lácticas de los experimentos seleccionados.	70
Figura 27: células de <i>Lb. acidophilus</i> vistas al microscopio.	70
Figura 28: Células de <i>Bifidobacterium</i> vistas en el microscopio.	71
Figura 29: Células de <i>Lb. rhamnosus</i> vistas en el microscopio.	71
Figura 30: Curva de acidificación en función del tiempo de almacenamiento.	73
Figura 31: Cataciones. (a) Evaluación del catador. (b) Muestras de catación.	73
Figura 32 Estadísticas resultantes del aspecto visual obtenidos en la ficha de catación	74
Figura 33 Estadísticas resultantes obtenidos por catación por el sentido del olfato.	75
Figura 34: Estadísticas resultantes de la ficha de catación para el sabor.	76

Figura 35: Distribución de Weibull acumulada.	80
Figura 36: Función de densidad de la distribución de Weibull estimada.	80
Figura 37: Distribución de Weibull ajustada	80
Figura 38: Ajuste de datos a la función de distribución de Weibull.	81
Figura 39: Probabilidad de supervivencia.....	81
Figura 40: Distribución de Weibull ajustada.	83
Figura 41: Distribución de Weibull densidad vs tiempo.....	83
Figura 42: Distribución de Weibull tiempo vs probabilidad acumulada.	83
Figura 43: Grafica de Weibull porcentaje acumulado vs tiempo.....	84
Figura 44: Relación de la Viscosidad con el gradiente de velocidad de cizalla.	85
Figura 45: Relación de la Viscosidad con el gradiente de velocidad de cizalla.	85
Figura 46: Relación de la Viscosidad con el gradiente de velocidad de cizalla.	86

INDICE DE ANEXOS

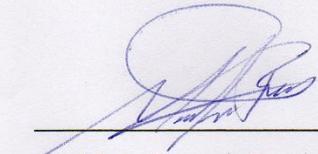
ANEXO 1: NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-155-SCFI-2003 DERMINACIÓN DE REDUCTORES DIRECTOS (LACTOSA).	102
ANEXO 2: FICHA TECNICA PARA LECHE CRUDA.....	104
ANEXO 3: FICHA TÉCNICA DE FERMENTO ABY-3.....	107
ANEXO 4: FICHA TÉCNICA DE NORMA ECUATORIANA PARA LECHE LARGA VIDA.	108
ANEXO 5: FICHA TÉCNICA DE NORMA ECUATORIANA PARA LECHE	110
ANEXO 6: FICHA TÉCNICA DE AGAR MRS	113
ANEXO 7: FICHA DE CATACIÓN.....	115
ANEXO 8: IMÁGENES	116
ANEXO 9: FICHAS TÉCNICAS COMPACT DRY ECOLI/COLIFORMES, MOHOS Y LEVADURAS	120
ANEXO 10: INFORMES MICROBIOLÓGICOS YOGURT	121
ANEXO 11: INFORMES FISICO-QUIMICOS DE LECHE CRUDA	122
ANEXO 12: TABLA DE ENZIMA HA LACTASA	124
ANEXO 13: MATERIAL Y EQUIPOS USADOS	125

APLICACIÓN DE DISEÑO EXPERIMENTAL DE RESPUESTA DE SUPERFICIE BOX BEHNKEN PARA EL DESARROLLO DE UNA LECHE PROBIÓTICA HIDROLIZADA.

RESUMEN

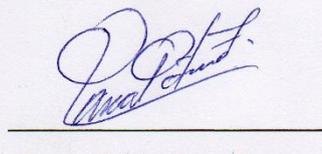
Se desarrolló una leche fermentada con acidez estandarizada y larga vida a partir de leche con hidrólisis controlada de lactosa por vía enzimática, empleando cultivos probióticos. Se partió del diseño experimental de respuesta de superficie box Behnken, se obtuvo la mejor hidrólisis de 99.5% con (38.09°C, 1.93ml lactasa y 0.5 horas), valor que se encuentra dentro de la norma para leches deslactosa 701:2009. Mediante un diseño de mezclas Simplex Lattice, se obtuvo la mejor mezcla de bacterias probióticas para fermentar la leche hidrolizada, de *Bifidumbacterium breve* (66.66%), *Lactobacillus acidophilus* (16.66%), *Lactobacillus rhamnosus* (16.66%). Una vez hidrolizada y fermentada la leche se obtuvo un yogurt que fue analizado su tiempo de vida útil, reología, pruebas microbiológicas y su costo de producción.

Palabras claves: hidrólisis, lactasa, box Behnken, probióticos, Reología.



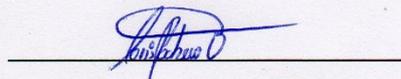
María Fernanda Rosales Medina

Directora de Tesis



Fausto Tobías Parra Parra

Director de Escuela



Doris Alexandra Pacheco Vanegas

Autor

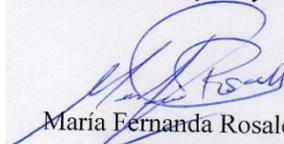


**APPLICATION OF BOX-BEHNKEN RESPONSE SURFACE EXPERIMENTAL
DESIGN FOR THE DEVELOPMENT OF HYDROLYZED PROBIOTIC MILK**

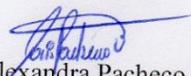
ABSTRACT

Fermented milk with standardized acidity and long life was developed from milk with controlled enzymatic lactose hydrolysis, using probiotic cultures. We started from the box-Behnken response surface experimental design, obtaining the best hydrolysis of 99.5% with (38.09 ° C, 1.93ml lactase and 0.5 hours); a value that is within the norm for Lactose-free 701: 2009 milk. Through a Simplex Lattice mixtures design, the best mixture of probiotic bacteria of *Bifidobacterium breve* (66.66%), *Lactobacillus acidophilus* (16.66%), *Lactobacillus rhamnosus* (16.66%) was obtained to ferment hydrolyzed milk. Once the milk was hydrolyzed and fermented, we obtained yogurt that was analyzed for its useful life, rheology, microbiological testing and production cost.

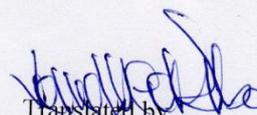
Keywords: Hydrolysis, Lactase, Box Behnken, Probiotics, Rheology


Maria Fernanda Rosales Medina
Thesis Director


Fausto Tobías Parra Parra
School Director


Doris Alexandra Pacheco Vanegas
Author


UNIVERSIDAD DEL
AZUAY
Dpto. Idiomas


Translated by,
Lic. Lourdes Crespo

Doris Alexandra Pacheco Vanegas

Trabajo de Graduación

Ingeniera María Fernanda Rosales Medina.

Marzo, 2016

“APLICACIÓN DE DISEÑO EXPERIMENTAL DE RESPUESTA DE SUPERFICIE BOX BEHNKEN PARA EL DESARROLLO DE UNA LECHE PROBIÓTICA HIDROLIZADA”

INTRODUCCIÓN

La leche es el alimento completo y cercano a lo ideal en cuanto a términos nutricionales puesto que posee todo tipo de nutrientes en diferentes proporciones. Es debido a esto que la leche es un producto muy susceptible a la contaminación y degradación por microorganismos así como por las enzimas que estos producen, obligando a la industria láctea a utilizar diferentes procesos para conservar sus cualidades nutritivas.

La lactosa es un disacárido que no puede asimilarse en su forma natural, es necesario hidrolizarla para poder asimilar los monómeros que se generan: glucosa y galactosa. La capacidad de producir la β -galactosidasa, enzima responsable de la hidrólisis en el intestino delgado, disminuye a medida que el individuo crece, y cuando llega a la edad adulta es probable que haya perdido parcial o totalmente la actividad de hidrólisis en su intestino. Esto provocará que cuando consuma lactosa, ya sea en leche o sus derivados, se presente un cuadro de flatulencia, dolor abdominal y/o diarrea, denominado “intolerancia a la lactosa” (López y col., 1996).

Debido a su importancia tecnológica, la hidrólisis enzimática de la lactosa para la

elaboración de productos deslactosados o bajos en lactosa ha sido extensamente estudiada desde diversos puntos de vista. Se han estudiado las características que presentan las diferentes enzimas (pH y temperatura óptimos, efecto de algunos componentes de la leche sobre su actividad, etc.), sus usos y las fuentes de donde pueden ser obtenidas (Fonseca y col; 2003; Fogler 2001). Desde entonces, se han llevado a cabo relativamente pocas investigaciones para explicar este fenómeno.

Los microorganismos aerobios ocasionan una serie de cambios químicos en la leche en donde los tres componentes más afectados son lactosa, proteínas y grasa. Los carbohidratos son el primer nutriente que metabolizan los microorganismos para obtener su energía, seguido de proteínas y finalmente lípidos. Los carbohidratos se oxidan con el fin de proporcionar energía, la glucosa es el monosacárido más frecuente en la naturaleza como azúcar libre, para obtener glucosa en la leche el disacárido lactosa es hidrolizado en dos monosacáridos glucosa y galactosa en presencia de la enzima β -galactosidasa.

Se han realizado diversas investigaciones con relación a la hidrólisis enzimática de la lactosa, incluyendo las características que presentan las diferentes enzimas (pH y temperatura óptimas, efecto de algunos parámetros, etc.), su utilización, y las diferentes fuentes de donde se pueden obtener, que son: hongos como *Aspergillus oryzae* (Park y col, 1987) o *Aspergillus niger* (Jakubowski y col., 1985).

Las características y propiedades de las lactasas varían dependiendo de la fuente, por ejemplo, las de origen fúngico presentan mayor termo-estabilidad que las de levadura y bacterias, y su pH óptimo de actividad cae dentro del rango ácido (4,5-6,5) y temperatura óptima entre 35 y 55°C (García Garibay y Gómez Ruíz, 1996; Jackson y Jelen, 1989; Park y col, 1979). Las lactasas de levadura y bacterias son en general más termolábiles, y su pH óptimo de actividad es cercano al neutro, por lo que se les denomina lactasas neutras. Estas lactasas tienen una temperatura óptima alrededor de 37°C, y muestran una pérdida considerable de actividad a pH 5,3, al elevar la

temperatura a 55°C, o bien la pierden completamente a pH 4,5 (Jackson y Jelen, 1989).

Desde hace varios años se reportó que al precalentar la leche (pasteurizarla) para el destino fermentación se podía aumentar la velocidad de hidrólisis de la lactosa con la β -galactosidasa. Sin embargo, con los experimentos realizados no era posible determinar si la variación se debía a las proteínas del suero, a la caseína, interacciones proteína-proteína, a la presencia de algún inhibidor termolábil o a alguna otra alteración del sistema.

En 1973, Kosikowski y Wiezbicki, hicieron pruebas para comparar actividad de lactasa en leche cruda y leche pasteurizada, demostrando que después de 24 horas de reacción a una temperatura de 4°C y utilizando una concentración de enzima de 25mg/L se obtenían entre el 75 y 80% de lactosa hidrolizada en leche cruda y pasteurizada respectivamente, y al utilizar 100 mg/L en las mismas condiciones de reacción, 95 y 90 % de lactosa hidrolizada en la leche pasteurizada y cruda respectivamente.

Más adelante, Greenberg y Mahoney (1984) obtuvieron aumentos de 6 y 8% al comparar la actividad que se obtiene en leche cruda con la obtenida en leches tratadas térmicamente a 85 °C durante 30 minutos (tratamiento térmico básico en leche destinada a yogurt). Este no es un aumento tan notable como el reportado por Wendorff y col. en 1970, pero sugiere que sí existe un cambio en la actividad enzimática.

En lo referente a las LAB las especies de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* son las más comúnmente reconocidas como probióticos. Las (LAB) bacterias de ácido láctico, dentro de esta clasificación se encuentran las especies de *Lactobacillus*, *Lactococcus* y *Streptococcus thermophilus* no se incluyen al género *Bifidobacterium* ya que no produce la fermentación de alimentos y es taxonómicamente diferente. Se trata de una

clase de bacterias unidas por una gran variedad de características morfológicas, metabólicas y fisiológicas: fermentadoras no patógenas, no toxigénicas.

En el presente trabajo se determinó la cinética de la fermentación, postfermentación y la vida de estante máxima de una leche fermentada con un cultivo probiótico, constituido de las mezclas de las cepas *L. acidophilus*, *L. rhamnosus* y *Bifidobacterium breve*, partiendo de una leche con hidrólisis controlada de lactosa.

Objetivo general:

- Desarrollar una leche fermentada con acidez estandarizada y larga vida a partir de leche con hidrólisis controlada de lactosa por vía enzimática, empleando cultivos probióticos *L. acidophilus*, *L. rhamnosus* y *Bifidobacterium breve*.

Objetivos específicos:

- a) Evaluar diferentes condiciones de hidrólisis de lactosa con lactasa marca comercial Ha-Lactasa 5200.
- b) Determinar la cinética de la fermentación bajo los diferentes grados de hidrólisis de lactosa empleando los cultivos probióticos *L. acidophilus*, *L. rhamnosus* y *Bifidobacterium breve*.
- c) Evaluar la influencia de los productos de hidrólisis de la lactosa en la formación de ácido láctico durante la fermentación y postfermentación.
- d) Determinar los indicadores físico-químicos, microbiológicos y los atributos sensoriales de las formulaciones desarrolladas.
- e) Seleccionar las mejores formulaciones para su evaluación en la producción a escala piloto.
- f) Evaluar la vida de estante para la variable seleccionada.

- g) Evaluar el costo beneficio del uso de leche deslactosada en la elaboración del producto.

CAPITULO 1

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.

1.1 Lactasa.

La lactasa o β -galactosidasa (EC3.2.1.23), es una enzima que ha despertado gran interés biotecnológico por razones básicamente nutricionales e industriales. La enzima causa la hidrólisis del enlace β -1,4 de la lactosa hasta sus monómeros glucosa y galactosa, originando un producto con mayor poder edulcorante. Los jarabes obtenidos de esta hidrólisis sirven como sustituto del jarabe de maíz o sacarosa en las industrias de heladerías, reposterías y panaderías; además su adición a productos lácteos como leche, yogurt, crema agria y mantequilla mejora el sabor sin que ocurra un incremento calórico, beneficiando el consumo en individuos con intolerancia a la lactosa (Badui, 2014). La hidrólisis enzimática de la lactosa del suero permite el aprovechamiento de este subproducto de la industria láctea, el cual se ha convertido en un grave problema de contaminación ambiental, debido a que generalmente se descarga en cuerpos de aguas (García, Quintero, López, 1998), esto ha conllevado a que actualmente existe una amplia información sobre la β -galactosidasa obtenida de diferentes fuentes y donde se han considerado aspectos como selección de géneros, condiciones de cultivo, procedimientos de extracción, purificación, estabilidad, obtención de plásmidos y mutantes, entre otras (Zhou, Chen, Li, 2003). Su aplicabilidad involucra mayoritariamente sistemas alimenticios, por lo que resulta idóneo trabajar con enzimas generalmente reconocidas como seguras (GRAS) y aceptadas por agencias de control de alimentos y drogas como la Food and Drug Administration (FDA). Actualmente el estatus GRAS es validado sólo para las lactasas de *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Kluyveromyces lactis* y *Kluyveromyces marxianus* (García, et al 1998). La lactasa más conveniente para utilizar en leche, productos lácteos y sueros dulces es la proveniente del género *Kluyveromyces*, donde representa un producto estrictamente intracelular (Bacci, Siquiera, Antoniazzi, Veta. 1996).

Varios métodos han sido usados para solubilizar este tipo de enzimas, dependiendo de su localización dentro de la célula, intenciones de uso y estabilidad; los métodos mecánicos son predilectos en aplicaciones a gran escala, pero requieren alta inversión, costos operacionales y además el extracto obtenido resulta cargado de fragmentos celulares, sumando así mayor grado de dificultad al momento de purificar la enzima. La autólisis no es un método apropiado, porque requiere de temperaturas que comprometen la estabilidad de la enzima y los detergentes son difíciles de remover de las preparaciones enzimáticas (Becerra, Rodríguez, Cerdán. 2001)

1.2 Fermentación ácido láctica:

La lactosa es el único disacárido en la leche de los mamíferos, que su contenido es de 4.5 a 5% en la leche de vaca (Fuquay, Fox, McSweeney, 2011). En el proceso de digestión, la lactosa es en gran parte descompuesta en sus monosacáridos, galactosa y glucosa, por la enzima lactasa (β -galactosidasa, EC 3.2.1.23.), que está enlazada a la membrana mucosa del intestino delgado. La falta de actividad de la lactasa observada en algunas poblaciones puede conducir a trastornos gastrointestinales conocidos como intolerancia a la lactosa. Los síntomas de este problema son distensión abdominal, diarrea, flatulencia, dolor abdominal y calambres, pérdida de apetito, náuseas, etc. (Fox, McSweeney, 2009), y también puede ocurrir una pérdida de calcio y otros minerales (Pochart, Dewit, Desjeux & Bourlioux P, 1989). El problema de la intolerancia a la lactosa es bastante generalizado en la mayor parte del mundo. Se ha estimado que más del 70% de la población mundial sufre de la incapacidad para utilizar lactosa (Yildiz, 2010).

El consumo de productos lácteos con lactosa modificada constituye una manera atractiva para obtener nutrición rica en leche con un menor nivel de lactosa de los productos lácteos regulares (Mlichová, Rosenberg, 2006). En los últimos años, ha surgido un creciente interés en el desarrollo de productos reducidos en lactosa o libres de lactosa emergido en las empresas lecheras, debido a los conocimientos adquiridos en relación con el problema de la intolerancia de lactosa (Fuquay, Fox, McSweeney, 2011). Varias tecnologías se emplean para su producción, como la hidrólisis enzimática de la lactosa con β -galactosidasa (soluble o inmovilizada) y procesos de

separación física (ultrafiltración y cromatografía) (Fox, McSweeney, 2009).

En Latinoamérica, se registra una incidencia muy elevada de individuos deficientes en la producción de lactasa, varios productos de lactosa reducida tales como leches fluidas y en polvo, y algunas leches fermentadas, están disponibles en el mercado. Sin embargo, este tipo de productos es muy limitada en Ecuador. Solamente las empresas lecheras ofrecen leches UHT y en polvo reducido en lactosa. Por lo tanto, en nuestro país donde el consumo de productos lácteos es alto hay todavía grandes posibilidades de desarrollar esta área.

El yogurt es hecho por la acción simbiótica de las bacterias *Streptococcus salivarius ssp thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii ssp bulgaricus*, que debe ser activa y a nivel significativo en el producto (superior a 10^7 UFC g^{-1}) (CAAa, 2010). Ha sido reconocido como una excelente fuente de vitaminas (B1, B2, B9 y B12), minerales (calcio, magnesio, fósforo y zinc) y proteínas de alta calidad (Adolfsson, Meydani, Russell, 2004) Además, han desarrollado diferentes tipos de yogures con la adición de probióticos y prebióticos para incrementar sus características funcionales.

Varios estudios han demostrado que mejora la digestión de la lactosa con la ingestión de yogur frente a la ingestión de leche (Akalın, Unal, Dinkci, Hayaloglu, 2012). Aunque los mecanismos implicados aún no están claros todavía, esto se cree que esta mayor absorción es en parte debida a la actividad de β -galactosidasa del cultivo iniciador (Fuquay, Fox, McSweeney, 2011) Sin embargo, algunos autores sugirieron que el yogur y leches fermentadas tienen un contenido de lactosa todavía demasiado alto (sólo alrededor del 20% de la lactosa es fermentado) para el consumo por individuos con un elevado grado de intolerancia (Shaukat, Levitt, Taylor, MacDonald, Shamliyan, et al. 2010).

El procedimiento de hidrólisis de lactosa en la leche con β -galactosidasa para preparar yogur podría llevarse a cabo antes (a diferentes condiciones de tiempo/temperatura) o

durante el proceso de fermentación (Tamime, Robinson. 2007). En este sentido, hay pocas publicaciones sobre distintos aspectos de lactosa hidrolizada en yogures. Se han obtenido resultados variables con respecto a la concentración de lactosa y las características físicas y organolépticas del producto final. Este hecho depende del tipo y nivel de la enzima empleada al momento de su incorporación (antes de la fermentación o junto con el cultivo iniciador) y la condición de almacenamiento de yogur (Martins, Monteiro, Fernandes de Medeiros Burket, Veiga Burket. 2012).

1.2.1 Fermentación de hexosas

Existen dos vías principales para hexosa (por ejemplo; glucosa) fermentación dentro LAB (Figura 1). El transporte y fosforilación de la glucosa puede ocurrir como se indica, es decir, el transporte de azúcar y la fosforilación por una glucoquinasa dependiente de ATP. Algunas especies utilizan el fosfoenolpiruvato: sistema fosfotransferasa de azúcar, en la que fosfoenolpiruvato es el donante de fosforilo. En cualquier caso, se requiere un enlace fosfato de alta energía para la activación del azúcar.

La glucólisis (ruta de Embden-Meyerhof-Parnas), utilizado por todas las LAB excepto *leuconostocs* grupo III *lactobacilos*, *oenococci* y *weissellas*, se caracteriza por la formación de la fructosa-1,6-difosfato (FDP), que se divide por una aldolasa FDP en dihidroxiacetona (DHAP) y gliceraldehído-3-fosfato (GAP). GAP (y DHAP a través de GAP) se convierte en piruvato en una secuencia metabólica incluyendo la fosforilación a nivel de sustrato en dos sitios. En condiciones normales, es decir, el exceso de azúcar y el acceso limitado al oxígeno, el piruvato se reduce a ácido láctico por una lactato deshidrogenasa dependiente de NAD + (nLDH), reoxidar así el NADH formado durante los pasos anteriores glucolíticas. Se obtiene así un equilibrio redox, ácido láctico que es virtualmente el único producto final, y el metabolismo se refiere como una fermentación homoláctica.

La otra vía principal de fermentación ha tenido varias denominaciones, tales como la vía pentosa fosfato, la vía pentosa fosfocetolasa, el monofosfato de hexosa derivado y

utilizado por Kandler y Weiss (Kandler, Weiss, 1986 Citado por Salminen. S, Wright. A, Ouwehand, A. 2004) en el Manual de Bergey, la vía 6-fosfogluconato. Se va a referir a ella como la vía 6 fosfogluconato / fosfocetolasa (6-PG / PK), reconociendo así un paso clave en la secuencia metabólica (la división fosfocetolasa) y, al mismo tiempo que la distingue de la vía bifidum, que también implica fosfocetolasa pero no tiene 6-fosfogluconato como un intermedio. (Gottschalk, 1986 Citado por Salminen. S, et al 2004) Esta se caracteriza por los pasos de deshidrogenación iniciales con la formación de 6-fosfogluconato, seguido por descarboxilación. La pentosa-5-fosfato restante se divide por fosfocetolasa en GAP y acetil fosfato GAP se metaboliza en el mismo modo que para la vía glucolítica, resultando en la formación de ácido láctico. Cuando no hay receptor de electrones adicional disponible, acetil fosfato es reducida a etanol a través de acetil CoA y acetaldehído. Desde este metabolismo conduce a cantidades significativas de otros productos finales (CO₂, etanol), con adición de ácido láctico, que se conoce como una fermentación heteroláctica.

La terminología con respecto a estas vías y las bacterias que los utilizan es bastante confuso, y tal vez es conveniente añadir una nota de cautela. En general, el término "LAB homofermentativas" se refiere a aquellas en el grupo que utilizan la vía glucolítica para la fermentación de la glucosa, mientras que "LAB heterofermentativo" son los que utilizan la vía 6-PG / PK. Sin embargo, se debe tener en cuenta que la glucólisis puede conducir a una fermentación heteroláctica (es decir, cantidades significativas de ácido láctico como producto final) bajo ciertas condiciones y que algunos LAB considerados como homofermentativa utilizan la vía 6-PG / PK cuando metabolizan ciertos sustratos.

En teoría, la fermentación homoláctica de los resultados de glucosa en 2 moles de ácido láctico y una ganancia neta de 2 ATP por moles de glucosa consumido. La Fermentación heteroláctica de glucosa a través de la vía 6-PG / PK da como resultado 1 mol de ácido láctico, etanol, CO₂ y 1 mol ATP / mol glucosa. En la práctica, estos valores teóricos rara vez se obtienen. Un factor de conversión de 0,9 a partir de azúcar de producto final de carbono es común y probablemente refleja una incorporación de azúcar de carbono en la biomasa, a pesar de que la mayoría de los factores de

crecimiento (por ejemplo, aminoácidos, nucleótidos, y vitaminas) son suministrados en exceso en los medios frecuentemente usados. Estos medios complejos también pueden contribuir a otros balances de fermentación y a la formación de otros productos finales, en particular ácido acético, ya que los compuestos como ácidos orgánicos, aminoácidos, y residuos de azúcar pueden alterar la fermentación. (Kandler, 1983 Citado por Salminen. S, et al 2004)

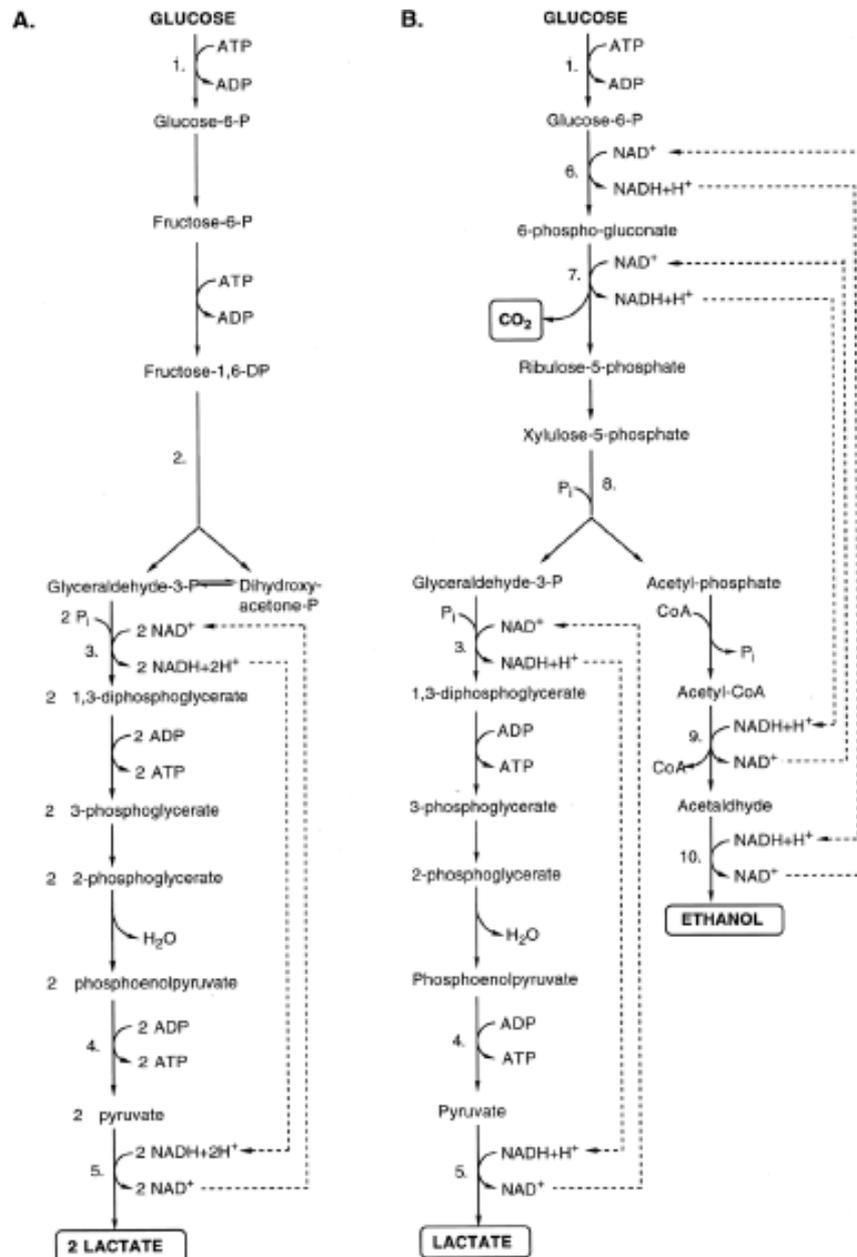


Figura 1: Vías de fermentación de glucosa A).Fermentación Homoláctica, B).Fermentación Heteroláctica

Fuente: Salminen. S, Wright. A, Ouwehand, A. (2004)

Las distintas hexosas de la glucosa, tales como manosa, galactosa y fructosa, son fermentadas por muchos LAB. Los azúcares entran en las vías principales en el nivel de la glucosa-6-fosfato o fructosa-6-fosfato después de isomerización y/o fosforilación. Una importante excepción es el metabolismo de la galactosa en LAB, que utiliza un PTS para la absorción de este azúcar, por ejemplo, *Lc. lactis*, *E. faecalis*, y *Lb. casei*. En estas especies, la galactosa-6-fosfato formada por el PTS es metabolizada a través de la vía de tagatosa-6-fosfato (Bissett, Anderson, 1974 Citado por Salminen. S, et al 2004) (Figura 2). Tagatosa es un estereoisómero de fructosa, pero se requieren enzimas de separación para el metabolismo de los derivados de tagatosa. La vía de tagatosa coincide con la glucólisis en el nivel de GAP.

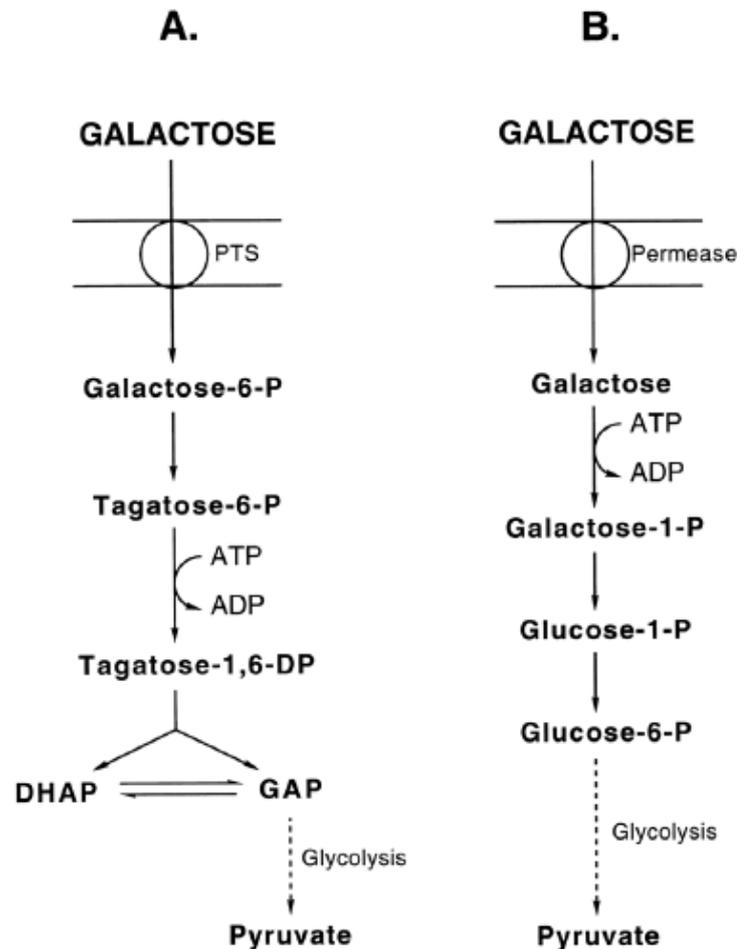


Figura 2: Metabolismo de galactosa de bacterias ácido lácticas. A) Vía tagatosa-6-fosfato. B) Via Leloir

Fuente: Salminen. S, Wright. A, Ouwehand, A. (2004)

Muchas cepas de esta categoría también tienen la capacidad de transporte de galactosa mediante una permeasa y posteriormente convertirlo esto a glucosa-6-fosfato por la vía Leloir (Figura 2). (Thomas, Turner, Crow, 1980 Citado por Salminen. S, et al 2004) Esta vía también es utilizada por galactosa-fermentando LAB el transporte de galactosa por medio de una permeasa y falta de un galactosa PTS. (Fox, Lucey, Cogan, 1990 Citado por Salminen. S, et al 2004).

1.2.2 Fermentación de disacáridos.

Dependiendo del modo de transporte, los disacáridos entran en la célula ya sea como azúcares libres o como fosfatos de azúcar. En el primer caso, los disacáridos libres se dividen por hidrolasas específicas a monosacáridos, que luego entran en las principales vías descritas anteriormente. En este último caso, es decir, cuando el azúcar PTS está implicado, fosfohidrolasas específicas separan el fosfato de disacárido en una parte de monosacáridos libres y una parte de los fosfatos de monosacáridos.

Por mucho el metabolismo de disacáridos más estudiado en el laboratorio es la fermentación de lactosa.

La mayoría de las cepas de *Lc. lactis*, al menos las que se utilizan como iniciadores lácteos, contienen una lactosa PTS (Thompson, 1979 Citado por Salminen. S, et al 2004) una lactosa PTS de *Lb. casei* se encuentra también bien caracterizado. (Chassy & Alpert, 1989 Citado por Salminen. S, et al 2004) En estas cepas, la lactosa entra en el citoplasma como fosfato de lactosa, que se parte por fosfo- β -D-galactosidasa (P- β -gal) para producir glucosa y galactosa-6-fosfato.

La glucosa es fosforilada por la glucoquinasa y se metaboliza a través de la vía glucolítica, mientras que la galactosa-6-fosfato es metaboliza a través de la vía de tagatosa-6-fosfato. El sistema enzimático de la lactosa PTS y P- β -gal es generalmente inducible y reprimida por la glucosa. (Kandler, 1983 Citado por Salminen. S, et al 2004).

El metabolismo de la lactosa de *Lc. lactis* es uno de los sistemas más estudiados de la fermentación del azúcar que se producen por medio de LAB. Este conocimiento es relevante para la comprensión del metabolismo del azúcar en general (Thompson, J. 1988 Citado por Salminen. S, et al 2004) y de los procesos de fermentación de la leche en particular.

Sin embargo, una manera igualmente común para metabolizar la lactosa en LAB es por medio de un portador de lactosa (permeasa) y la posterior ruptura por la β -galactosidasa (β -gal) para producir glucosa y galactosa, (Fox et al 1990), que puede entonces entrar en las principales vías. Algunos informes sobre este tema sugieren que muchos LAB contienen tanto una lactosa PTS y un sistema de lactosa permeasa para el metabolismo de la lactosa, ya que se encontraron tanto P- β -gal y la actividad β -gal en las mismas cepas. (Hickey, Hillier, Jago, 1986 Citado por Salminen. S, et al 2004). Sin embargo, la baja actividad P- β -gal en las cepas con alta actividad β -gal puede representar un artefacto, ya que el sustrato artificial utilizado para P- β -gal (fosfato de orto-nitrophenylgalactose) puede ser hidrolizado por β -gal o por una fosfatasa produciendo el sustrato para β -gal. (Fox et al 1990 Citado por Salminen. S, et al 2004)

Algunos de los LAB termófilos, por ejemplo, *S. thermophilus*, *Lb. delbrueckii subsp. bulgaricus*, *Lb. delbrueckii subsp. lactis*, y *Lb. acidophilus*, solamente se metabolizan el resto de glucosa después del transporte de lactosa y la ruptura por β -gal, mientras que la galactosa se excreta en el medio. (Hickey, Hillier, Jago, 1986) transporte lactosa y el metabolismo en la especie económicamente importante *S. thermophilus* también se ha estudiado a fondo. (Poolman, 1993) la excreción de galactosa se ha atribuido a una baja actividad galactoquinasa (Hickey, Hillier, Jago, 1986) pero también es energéticamente favorable y una característica de transportador de lactosa. (Poolman, 1993)

La fermentación de maltosa por medio de LAB se ha estudiado más ampliamente en lactococos. Un sistema de permeasa para el transporte parece ser operativa. (Sjöberg, Hahn-Hägerdahl, 1989 Citado por Salminen. S, et al 2004) Una característica

interesante del metabolismo de la maltosa en *Lc. lactis* es que la maltosa es dividida por una maltosa fosforilasa en glucosa y β -glucosa-1-fosfato. Sólo el resto de glucosa se utiliza en la glucólisis, mientras que β -glucosa-1-fosfato probablemente es un precursor para la síntesis de la pared celular. (Sjöberg, et al 1989)

La fermentación de sacarosa está influida por un sistema de permeasa en la cual se inicia por la ruptura del azúcar por hidrolasas de sacarosa para producir glucosa y fructosa. En algunos lactococos, la sacarosa es transportada por sacarosa PTS y una hidrolasa específica sacarosa-6-fosfato que rompe la sacarosa-6-fosfato dando como resultado glucosa-6 fosfato y fructosa. (Thompson, Chassy, 1981).

La sacarosa PTS y la hidrolasa sacarosa-6-fosfato son inducidas por la presencia de sacarosa en el medio. (Thompson, et al 1981) La sacarosa también puede actuar como un donante de monosacáridos para la formación de exopolisacáridos en ciertas LAB. En la producción de dextrano por *Ln. mesenteroides*, sacarosa es dividido por una enzima asociada a la pared celular, dextransucrase.

El resto de glucosa se utiliza para la síntesis de dextrano y fructosa es fermentada de la manera usual. (Cerning, 1990)

Fermentación de otros disacáridos, tales como celobiosa, melibiosa, y trehalosa, no se ha estudiado a gran medida. La capacidad de fermentar estos azúcares difiere entre las distintas especies de LAB. Presumiblemente, el metabolismo está influida por sistemas específicos de transporte e hidrolasas, resultando en los respectivos monosacáridos (o fosfatos de monosacáridos), que entran en las vías comunes.

1.3 Hidrólisis de lactosa por vía enzimática.

1.3.1 Transporte de la Lactosa para la hidrólisis por la ruta metabólica

EMBDEN-MEYERHOF-PARNAS.

En la figura 3, expuesta mediante las rutas metabólicas de Embden-Meyerhof-Parnas, y figura 4 de Leloir se puede observar el comportamiento de la galactosa durante el proceso de la hidrólisis, los sistemas de intercambio de productos precursores en las bacterias del ácido láctico. Se muestran tres ejemplos. En *Streptococcus thermophilus* (y algunas cepas de *Lactobacillus*), la lactosa es transportada por el sistema de la enzima permeasa vía sistema soporte-protón. Intracelular la hidrólisis con β -galactosidasa da como resultado galactosa libre que no se metaboliza, pero en cambio es secretada al exterior de las bacterias en forma de galactosa residual. La reacción, que parece ser favorecida en la mayoría de las LAB, entonces impulsa la absorción de la lactosa. Las bacterias del ácido láctico proceden a la fermentación del citrato esta fermentación transportan el citrato por medio de la vía permeasa de citrato CitP. El metabolismo de citrato o glucosa cuando está también disponible, genera ácido láctico, cuya emanación o liberación es a través CitP puede conducir la absorción citrato. Esta reacción es por medio de electrógenos, en que un protón se consume dentro del citoplasma, aumentando la fuerza motriz protónica a través de la membrana. Las bacterias del ácido láctico capaces de metabolizar el aminoácido arginina hacen que mediante la ruta metabólica de aminosasa arginina. Los productos de esta vía son NH_3 , CO_2 , O-nitina y ATP. Pueden ser secretados través del transportador de la arginina (ArcD), a cambio de arginina. La célula, por lo tanto, obtiene energía de la arginina (un mol de ATP por arginina metabolizada), sin tener que gastar energía de transporte. es importante de notar que la galactosa secretada sufre cambios pero que no influyen en el proceso de la fermentación que lo comprueban los datos resultantes, de los datos de los experimentos del diseño experimental para la hidrólisis de la lactosa se utilizará como diseño un plan factorial de Superficie Respuesta (Box-Behnken) con una réplica, las variables independientes serán: dosis de lactasa a dos niveles (1 a 3 mL/L de leche), tiempo de reacción (0,5 a 2 h) y temperatura de reacción (30 a 50 °C). Y como variables dependientes el grado de hidrólisis de la lactosa y la concentración de glucosa, y mediante la determinación de la lactosa residual de la lactosa, glucosa (mg), galactosa (mg) se podrá demostrar dicha hipótesis.

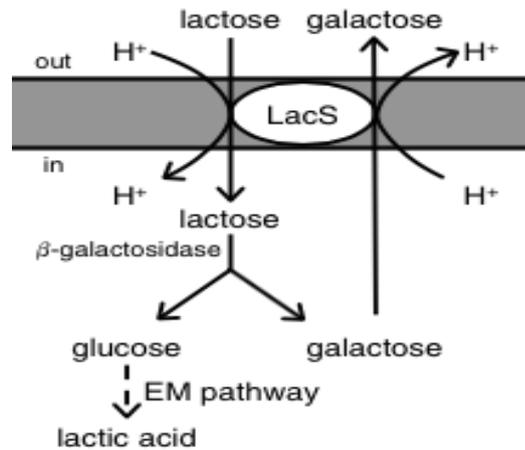


Figura 3: La membrana celular y la lucha por la vida de las bacterias ácido lácticas.

Fuente: Konings, W.N. 2002.

1.3.2 Ruta metabólica de Leloir de la galactosa luego de la hidrolisis enzimática.

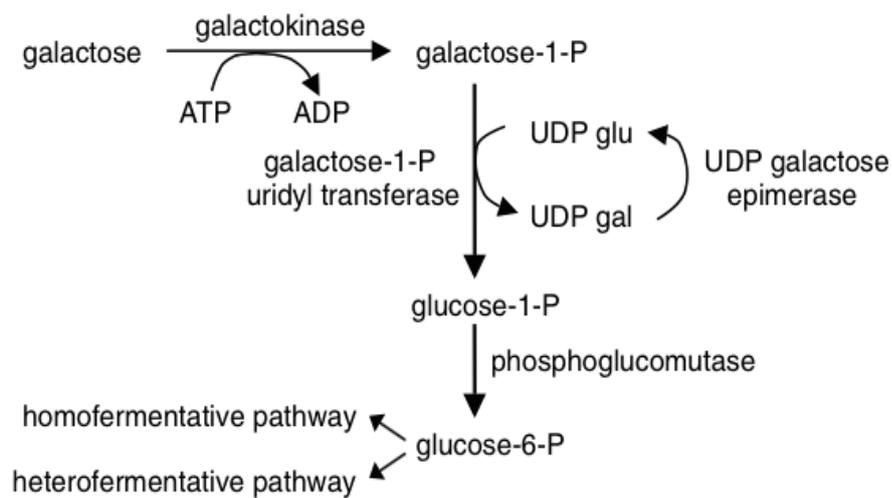


Figura 4: La membrana celular y la lucha por la vida de las bacterias ácido lácticas.

Fuente: Konings, W.N. 2002.

1.4 Intolerancia a la lactosa.

La lactosa es el azúcar predominante de la leche. La causa de la intolerancia a la lactosa es la incapacidad del intestino para digerirla y transformarla en sus constituyentes

(glucosa y galactosa). Esta incapacidad resulta de la escasez de un enzima (proteína) denominado lactasa, que se produce en el intestino delgado. Se estima que el 80% de la población mundial (95-100% de los indios americanos, 80-90% de negros, asiáticos, judíos y mediterráneos) sufren intolerancia a la lactosa en mayor o menor grado. Muchos de ellos presentan síntomas que recuerdan al síndrome de intestino irritable. Curiosamente la población del norte y centro de Europa, que convive con ganado vacuno desde el Neolítico, tiene mayor tolerancia a la lactosa que el resto de la población mundial. No existen diferencias en la prevalencia entre uno y otro sexo. En el 45% de las mujeres embarazadas que presentan el trastorno, este mejora durante la gestación. (Rodríguez & Pérez, 2006).

Los síntomas presentes que se deben sospechar para este cuadro tras la ingestión de leche pueden ser: dolor abdominal, distensión abdominal, gases y diarrea. Es un problema que afecta a una extensa población a nivel mundial, pero no es una amenaza seria para la salud. La gente que tiene problemas para digerir la lactosa aprende, probando, qué productos lácteos y en qué cantidad puede tomarlos sin presentar molestias y cuáles deben evitar. Muchos podrán disfrutar de los productos lácteos en pequeñas cantidades o junto con otros tipos de alimento.

La gravedad de síntomas varía dependiendo de la cantidad de lactosa ingerida y de la tolerancia individual, hay pacientes que con cantidades pequeñas de lactosa (de 5 a 12 gramos, contenidos en 100 a 250 cc de leche) pueden presentar síntomas.

El 70-80% de los pacientes responde a una dieta sin lactosa. El resto mantiene síntomas quizás porque además padece un síndrome de intestino irritable. Los síntomas intestinales de pacientes que consumen productos lácteos pueden reducirse con el uso de fermentos comerciales añadidos a la leche. (Rodríguez et al Pérez, 2006).

1.5 Microorganismos probióticos.

1.5.1 Definiciones.

Las bacterias probióticas son microorganismos vivos que pertenecen a la microbiota natural humana y se caracterizan por tener una mínima o nula capacidad patógena, así como desempeñar funciones favorables sobre la salud y el bienestar de los huéspedes

Las bacterias probióticas, tanto autóctonas como las aportadas al organismo mediante la alimentación pueden controlar la instauración y/o el desarrollo de diversos microorganismos patógenos entre los que destacan *Salmonella typhimurium*, *Shigella spp.*, *Clostridium difficile*, *Campylobacter jejuni* y *Escherichia coli*, y también proporcionan una protección importante frente a patógenos urogenitales como *Gardnerella vaginalis*, Bacterias *bivius*, *Candida albicans* y *Chlamydia trachomatis* (Hilton, Rindos & Isenberg, 1995 citados por Rodríguez, 2009)

Los probióticos los define Hoover, como un suplemento alimenticio con microflora viable que mejora el balance de la flora intestinal del hospedero (Hoover, 1993 citado por Corrales, Henderson & Morales, 2009)

Actualmente, la mayor parte de las bacterias usadas como probióticos en productos comerciales, pertenecen a las bacterias lácticas (bacterias que usan carbohidratos como fuente de carbono y producen ácido láctico como producto final) de manera específica *Lactobacilli* y *Bifidobacteria*. Dentro del género *Lactobacillus* podemos encontrar *L. bulgaris*, *L. acidophilus*, *L. johnsonii* (*La1*), *L. casei* y *L. caucasicus*, los cuales se han usado para la preparación de una gran variedad de productos lácteos fermentados.

Las bacterias deben cumplir con ciertos requisitos para poder ser consideradas probióticas. Por ejemplo, deben resistir la acidez del estómago y las sales biliares, fijarse en el epitelio intestinal y colonizar el intestino. (Barboza Corona, Vázquez Acosta & Salcedo Hernández, 2009).

1.5.2 Tipos (Lactobacilos, Bifidobacterias)

1.5.2.1 *Lactobacillus acidophilus*

La denominación "acidófilo" conduce a errores, pues esta bacteria no tolera más el ácido que otros lactobacilos. Los bacilo miden unas 2 – 6 μ de largo, y a veces están algo redondeados en los extremos. Se encuentran aislados o en cadenas cortas. La temperatura óptima es de unos 37°C, la máxima de unos 43 – 48°C. Por debajo de los 20°C no se registra crecimiento alguno.

L. acidophilus es una bacteria intestinal típica, que se encuentra en las heces fecales del hombre (casi siempre de los niños y muy escasamente en los adultos) y también de algunos mamíferos. A partir de las heces de niños se puede aislar mediante el método de enriquecimiento.

Lactobacillus acidophilus y *Lactobacillus casei* son usados también para producir lácteos fermentados. Estos organismos generalmente resisten la acidez gástrica y sales biliares. Su tasa de supervivencia en el tracto gastrointestinal se estima entre un 2 y 5% y logran concentraciones suficientes en el colon (10^6 - 10^8 UFC/mL). Dependiendo de la cepa varía su capacidad de adhesión intestinal, los efectos favorables en cuanto a la digestibilidad de lactosa y su habilidad para prevenir diarrea (Alais, 1970, citado por Molina, 2008).

1.5.2.2 *Bifidobacterium breve*

Es una de las bacterias más útiles y acogedoras de este entorno es la especie llamada "*Bifidobacterium breve*." También conocido como *B. breve*, esta bacteria es anaeróbico y no móvil. Sus ramas son en forma de barra, mirando casi como un cactus en la vista microscópico. Una vez establecida, *B. breve* es único en su capacidad de competir con otras bacterias, debido a la gran variedad de moléculas que puede digerir. Algunas personas tienen una gran cantidad de estas bacterias útiles, pero otros pueden necesitar un suplemento para fomentar su presencia.

La relación simbiótica que los humanos tienen con las bacterias es particularmente importante en el funcionamiento del colon. En estudios médicos, enfermedades tales como la diarrea asociada a antibióticos, alergias, gas, y síndrome del intestino irritable se han vinculado a la escasez de las bacterias *B. breve* de un paciente.

El trabajo de *B. breve* en el tracto digestivo es fermentar los azúcares y producir ácido láctico, así como ácido acético. *B. breve* es como el líder entre las bacterias probióticas, debido a su capacidad superior para romper muchos tipos de alimentos, incluso fibras vegetales que normalmente se consideran no digerible.

1.5.2.3 Lactobacillus rhamnosus

Lactobacillus rhamnosus, o *L. rhamnosus*, es un tipo de bacterias probióticas. Los probióticos, según lo definido por la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, son "microorganismos vivos que, cuando se administra en cantidades adecuadas, confieren un beneficio de salud al huésped."

L. rhamnosus fue aislado por primera vez en 1983 en los intestinos de un sujeto humano sano por científicos Barry Goldin y Sherwood Gorbach, cuando fue demostrado tener mucha tolerancia a los ácidos fuertes que se encuentran habitualmente en el estómago y el tracto digestivo. El "GG" en el título de la cepa *L. rhamnosus* GG es derivado de los apellidos de los dos científicos. Al igual que otros probióticos, *L. rhamnosus* tiene propiedades que son beneficiosas en el tracto intestinal. También se cree que es de considerable ayuda con el sistema inmune, particularmente en la lucha contra los patógenos del tracto intestinal y urinario. (FAO & WHO, 2002)

Lactobacillus rhamnosus es una bacteria probiótica que ayuda a eliminar y prevenir el crecimiento de bacterias perjudiciales en los intestinos. (Conway, Gorbach y Goldin. 1987).

1.5.3 Características e Importancia para la salud

El papel de una nutrición balanceada para mantener la salud, ha extraído la atención de la comunidad científica, que ha realizado numerosos estudios con el fin de demostrar el funcionamiento de ciertos alimentos para reducir el riesgo de algunas enfermedades. También ha habido un considerable interés creciente en promover la investigación de nuevos componentes naturales. (Mundo lácteo y Cárnico, 2013)

En un huésped sano, existe un equilibrio entre los miembros de la microbiota intestinal, de tal manera que es posible que los organismos patógenos y no patógenos se encuentren en aparente armonía. En el caso de infección bacteriana, este equilibrio puede ser perturbado, ocasionando a menudo cambios drásticos en la composición. Para la mayoría de las infecciones bacterianas, se usan antibióticos no específicos, matando a ambos miembros, patógenos y no patógenos de la microflora intestinal. Esto puede ocasionar un retraso considerable en la restauración de la flora intestinal saludable. La restauración del equilibrio de la microbiota intestinal se cree que es importante porque el mantenimiento de una flora intestinal sana y equilibrada a lo largo de la vida ayuda a preservar la salud y favorece la longevidad.

Probablemente, la naturaleza y cantidad de sustrato disponible que tiene mayor significado, haciendo la dieta más fácil y el principal mecanismo que influye en el perfil de la fermentación. Otros factores que afectan la colonización y el crecimiento de bacterias en el intestino son, el pH intestinal, que inhibe la producción de metabolitos (ácidos y peróxidos), sustancias inhibidoras específicas (bacteriocinas) sales biliares, moléculas y células que constituyen el sistema inmune.(Mundo lácteo y Cárnico,2013)

1.6 Leches fermentadas con acidez controlada.

1.6.1 Ventajas

Morales (2011), cita a Charm 2007, quien define que la vida útil se determina al someter a estrés el producto, siempre y cuando las condiciones de almacenamiento sean controladas. Se pueden realizar las predicciones de vida útil mediante utilización de modelos matemáticos (útiles para evaluación de crecimiento y muerte microbiana), pruebas en tiempo real (para alimentos frescos de corta vida útil) y pruebas aceleradas (para alimentos con mucha estabilidad) en donde el deterioro es acelerado y posteriormente estos valores son utilizados para realizar predicciones bajo condiciones menos severas.

Para determinar la vida útil es necesario identificar la variable que causa los principales cambios en el alimento y que son detectados por el consumidor. Para el caso del yogur se puede considerar como variable la acidez ya que si esta se incrementa el producto pierde sus características organolépticas y así su calidad.

Una vez identificada la variable se debe analizar la cinética de reacción que se encuentra asociada a la variable previamente determinada. Morales (2011), cita a Labuza, 1982 el cual indica que la vida útil no es función del tiempo en sí, sino de las condiciones de almacenamiento del producto y los límites de calidad establecidos tanto por el consumidor como por las normas que rigen propiamente los alimentos.

1.6.2 Productos existentes en el mercado internacional

Las bebidas fermentadas aportan una importante contribución a la dieta humana en muchos países, debido a que la fermentación es una tecnología de bajo costo que conserva los alimentos, incrementa su valor nutritivo y mejora sus propiedades sensoriales. Sin embargo, la creciente demanda de nuevos productos probióticos ha fomentado el desarrollo de otras matrices para suministrar probióticos, tales como helados, leche de alimentación infantil y zumos de frutas.

Se ha evaluado la viabilidad de las cepas probióticas en helado bajo en grasa. Se utilizaron cultivos que contienen *Streptococcus salivarius ssp. thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus*, *Bifidobacterium longum* y *Lactobacillus acidophilus* y se verificó que el cultivo de bacterias no disminuyó en el yogur durante el congelado del almacenamiento. Además, la presencia de bacterias probióticas no alteran las características sensoriales del helado. La matriz del helado puede ofrecer un buen vehículo para cultivos probióticos debido a su composición que incluye proteínas de leche, grasa y lactosa, así como otros compuestos. Además, su estado congelado contribuye a su eficacia. Sin embargo, un helado probiótico, debe tener valores de pH relativamente altos 5.5 a 6.5, con el fin de favorecer la supervivencia de cultivos lácticos durante el almacenamiento. (Andrade, Dos Santos, Soares, Fernandes, & Fernandes, 2006).

El crecimiento de una levadura probiótica, *Saccharomyces boulardii*, en asociación con la microflora del bio-yogur, que se realiza mediante la incorporación de la levadura en el bio-yogur comercial, ha sido sugerido como una manera de estimular el crecimiento de organismos probióticos y para asegurar su supervivencia durante el almacenamiento. Se ha estudiado la capacidad de la levadura probiótica para crecer y sobrevivir en los productos lácteos, es decir, bioyogur, yogur UHT y leche UHT. *S. boulardii* fue incorporado en estos productos lácteos y se almacenó a 4°C durante un período de 4 semanas. Se observó que las especies de levaduras probióticas, *Saccharomyces boulardii*, tenían la capacidad de crecer en bio-yogurt y alcanzar recuentos máximos superiores a 10^7 UFC/g. El número de poblaciones de levadura fue considerablemente mayor en el yogur a base de fruta, principalmente debido a la presencia de sacarosa y fructosa derivadas de la fruta. A pesar de la incapacidad de *S. boulardii* para utilizar lactosa, las especies de levadura utilizaron los ácidos orgánicos, galactosa y glucosa disponible, derivados del metabolismo bacteriano de la lactosa presente en los productos lácteos. (Andrade, et al, 2006)

La viabilidad de las cepas de *L. acidophilus* y *Bifidobacterium animalis ssp. lactis* en yogures bebibles con preparados de fruta de mango, bayas mixtas, granadilla y fresa, se evaluó durante la vida útil. Los autores observaron que, independientemente de las

concentraciones, la adición de cualquiera de las preparaciones de frutas no tuvo efecto sobre los recuentos de los dos probióticos probados. (Andrade, et al, 2006).

Las leches fermentadas, suplementadas con fibras de limón y naranja aumentó los recuentos de *L. acidophilus* y *L. casei* durante el almacenamiento en frío en comparación con el conjunto de control. Este no fue el caso para *B. bifidum*, posiblemente debido a la sensibilidad conocida de las especies bifidobacterianas a un ambiente ácido. (Andrade, et al, 2006).

1.7 Aspectos Tecnológicos.

En el siguiente ámbito se han generado una serie de recomendaciones para incrementar la supervivencia de estos microorganismos en dichos vehículos. Entre tales recomendaciones están las siguientes:

- a. Uso de inóculos elevados de microorganismos probióticos con la finalidad de asegurar que en el producto final se tenga la concentración final recomendada de 1 a 100 millones de microorganismos por gramo
- b. Adición de factores promotores de crecimiento para probióticos como fuentes de nitrógeno, como extractos de levadura, hidrolizados de caseína combinación de aminoácidos, ribonucleicos péptidos y otros.
- c. Adición de compuestos que disminuyen el potencial redox del medio como ácido ascórbico y cisteína. (Roy, 2005 citado por Hinestroza y Lopez, 2008)

1.8 Diseño de Box-Behnken

En ocasiones es deseable o incluso necesario que los factores se ensayen solo a tres niveles. Los diseños de Box-Behnken son diseños factoriales incompletos a tres niveles en los que los puntos experimentales están escogidos especialmente para permitir una estimación eficiente de los coeficientes de un modelo de segundo orden. La figura 5 contiene los diseños de Box-Behnken para $k= 3,4$ y 5 factores. Como ayuda para apreciar las simetrías de dichos diseños las figura 6 muestran dos representaciones diferentes del mismo diseño de Box-Behnken a tres niveles con 13 ensayos para $k=3$

factores. La notación ± 1 se utiliza para indicar los cuatros ensayos de un diseño 2^2 factorial, y la notación 0 se refiere a una columna paralela de ceros. Para cada uno de los k factores, la última fila de ceros se refiere a uno o más puntos centrales del diseño. (Box, et al, 2008).

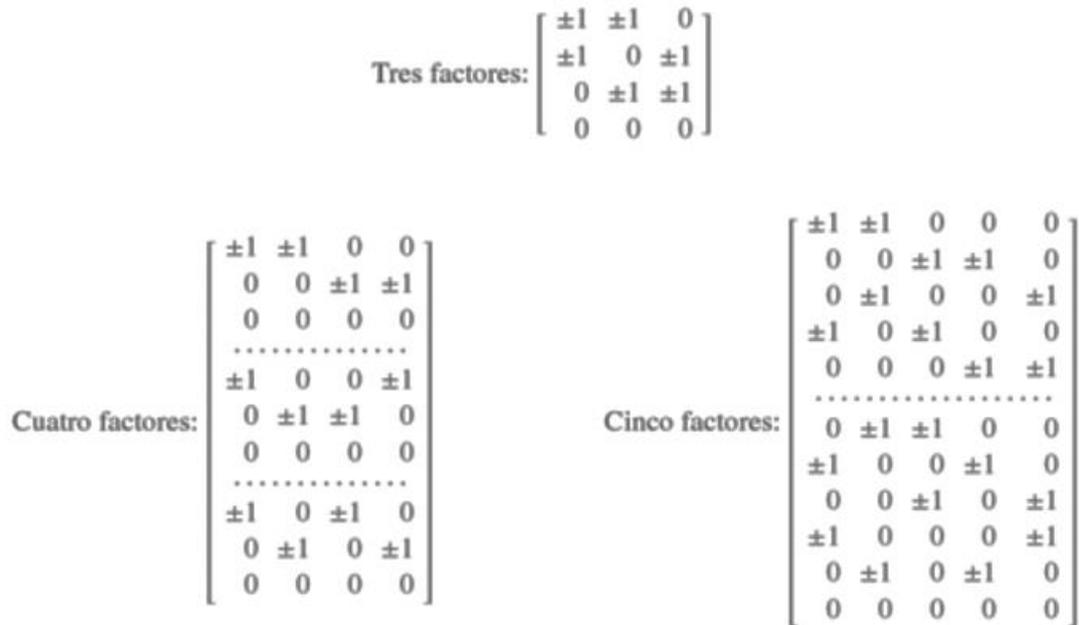


Figura 5: Diseños de Box-Behnken para K=3, 4 y 5 factores

Fuente: Box George, at al, 2008 pág. 475

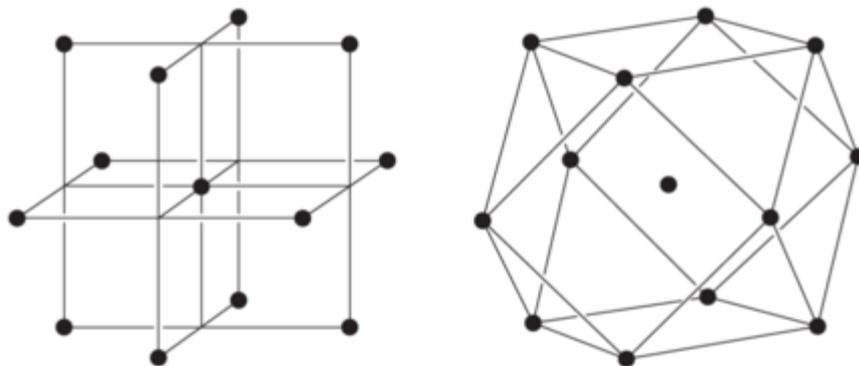


Figura 6: Representación del diseño Box-Behnken para tres factores.

Fuente: Box George, at al, 2008 pág. 475

1.9 Fluidos no Newtonianos

Son aquellos fluidos que no cumplen la ley de Newton de la viscosidad, por lo tanto, la relación entre el esfuerzo cortante y la velocidad de deformación deja de ser lineal. Estos fluidos se caracterizan porque su viscosidad no permanece constante cuando la temperatura y la composición permanecen invariables, sino que depende del esfuerzo cortante o gradiente de velocidad y, a veces, del tiempo de aplicación del esfuerzo y de la historia previa del producto o muestra. Ello es debido a que la constitución física varía al someter el producto a los efectos de rozamiento a lo largo del tiempo. Dado que en este tipo de fluidos la viscosidad no permanece constante, se define la viscosidad aparente, (Jiménez et al., 1987) como la relación entre el esfuerzo cortante y la velocidad de deformación correspondiente. (Gárate, 2014)

1.9.1 Fluidos Pseudoplásticos.

Los fluidos pseudoplásticos se caracterizan porque su viscosidad aparente decrece cuando aumenta el gradiente de velocidad de deformación. Este comportamiento indica una ruptura o reorganización continua de la estructura, dando como resultado una menor resistencia al flujo, y es debido a la presencia de sustancias de alto peso molecular así como a la dispersión de sólidos en la fase sólida. (Gárate, 2014)

1.9.2 Fluidos plásticos

Los fluidos plásticos son aquellos que no fluyen hasta que son sometidos a un esfuerzo cortante límite determinado, llamado esfuerzo de deformación plástica, umbral de fluencia o límite de fluencia. En el caso de los fluidos plásticos de Bingham, una vez que se supera el valor del umbral de fluencia, la velocidad de deformación es proporcional al esfuerzo, como en el caso de los fluidos newtonianos (Wazer van et al, 1963). Estos fluidos exhiben propiedades de líquido a esfuerzos superiores al umbral de fluencia por lo tanto pueden ser clasificados tanto como líquidos como sólidos. (Garate, 2014)

1.9.3 Fluidos dilatantes

Son aquellos fluidos en los que la viscosidad aumenta cuando la velocidad de corte aumenta. (Gómez, 2008)

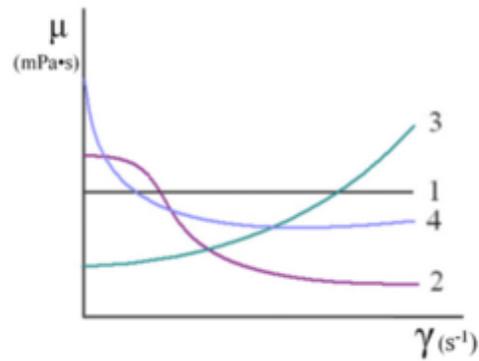


Figura 7: Curvas de viscosidad 1) fluido newtoniano 2) fluido pseudoplástico 3) fluido dilatante 4) plástico de Bingham.

Fuente: Gómez María, 2008, pág. 45-46

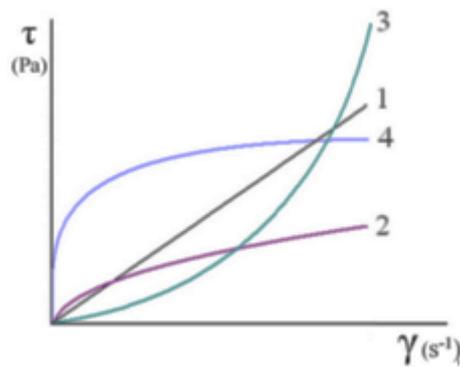


Figura 8: Curvas de fluidez 1) fluido newtoniano 2) fluido pseudoplástico 3) fluido dilatante 4) plástico de Bingham.

Fuente: Gómez María, 2008, pág. 45-46

1.10 Extensión de la vida de estante.

Este método es de gran ayuda para las empresas que se dedican a la producción de alimentos, ya que les permitirá saber rápidamente la vida útil de un alimento que está

próximo a lanzarse. Para realizar estas pruebas se deben conocer claramente las características de almacenamiento del producto. Estas pruebas trabajan conjuntamente con los resultados de productos almacenados a temperatura ambiente y con los resultados de una prueba acelerada. El objetivo de una prueba acelerada es que mediante el cambio de una condición en el almacenamiento, sea químico o físico y que conduce a un deterioro acelerado, la vida útil a temperatura ambiente pueda ser definida. (Kilcast, 2011).

1.11 La vida útil sensorial

La vida útil de un alimento representa aquel periodo de tiempo en el cual el alimento se conserva apto para el consumidor desde el punto de vista sanitario, manteniendo las características sensoriales, funcionales y nutricionales por encima de los límites de calidad previamente establecidos como aceptables. Entre las muchas variables que deben considerarse en la vida útil de un alimento están: naturaleza del alimento, su composición, las materias primas usadas, el proceso a que fue sometido, el envase elegido para protegerlo, las condiciones de almacenamiento y distribución y la manipulación que tendrá en manos de los usuarios. Es bien conocido que estas condiciones pueden influenciar negativamente los atributos de calidad de los alimentos (Man y Jones, 1994).

1.12 Análisis de Weibull

Su esencia consiste en seleccionar una distribución que describa adecuadamente el fenómeno estudiado, estimar los parámetros de dicha distribución y por último, determinar el valor esperado, la desviación típica y el percentil deseado del tiempo de vida útil o durabilidad a través de los parámetros estimados.

Pudiera pensarse, entonces, en comprobar la adecuación de los datos de fallo de la muestra con el modelo teórico asumido, a través de procedimientos analíticos o gráficos (papeles probabilísticos). Sin embargo, estos procedimientos sólo resultan válidos cuando se dispone del tiempo de vida o fallo de todas las unidades, o sea, lo que se conoce como datos completos de fallo.

Para la mejor comprensión de las técnicas de riesgo y el análisis de Weibull es necesario comprender su base matemática y sus principales características las que se exponen a continuación (Lawless, 1982), (Nelson, 1982), (Ross, 2006).

Si T es una variable aleatoria continua no negativa que representa los tiempos de vida de las unidades de un producto alimenticio, $f(t)$ su función de densidad de probabilidad, y $F(t)$, su correspondiente función de distribución acumulada entonces la probabilidad de que el tiempo de vida de una unidad de ese producto sea menor o igual a un tiempo t está dada por (Lawless, 1982), (Ross, 2006):

$$F(t) = P(T \leq t) = \int_0^t f(t) dt$$

La probabilidad de que una unidad sobreviva el tiempo t está dada por la función de supervivencia o función de fiabilidad $S(t)$:

$$S(t) = P(T \geq t) = \int_t^{\infty} f(t) dt$$

Por lo tanto:

$$S(t) = 1 - F(t)$$

Otro concepto muy importante cuando se trabaja con distribuciones de tiempo de vida es la función de riesgo $h(t)$ definida como:

$$h(t) = \lim_{\Delta t \rightarrow 0} \frac{P(t \leq T < t + \Delta t | T > t)}{\Delta t}$$

$$h(t) = \frac{f(t)}{S(t)} = \frac{f(t)}{1 - F(t)}$$

La función de riesgo expresa la velocidad instantánea de muerte o fallo en el tiempo t , dado que los individuos sobreviven hasta t . en particular, $h(t)$ es la probabilidad aproximada de muerte o fallo en el instante de tiempo), dado que sobrevive hasta t .

Esta función también es conocida como: velocidad de riesgo, velocidad de fallo y fuerza de mortalidad.

La función de riesgo acumulada, se define como:

$$H(t) = \int_0^t h(t) dt$$

Esta función está relacionada con la función de supervivencia y con la función de distribución de probabilidad acumulada de la siguiente forma:

$$S(t) = e^{-H(t)}$$

$$F(t) = 1 - e^{-H(t)}$$

Desde un punto de vista matemático riguroso, las expresiones de riesgo no son más que otras formas de expresar funcionalmente las distribuciones de probabilidad. El comportamiento típico de esta función durante el deterioro de muchos alimentos se representa en la Figura 5. (Núñez, 2011).

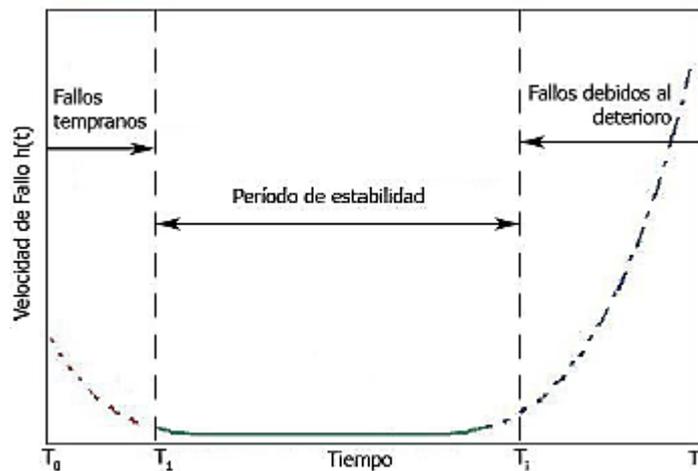


Figura 9: Velocidad de fallo en función del tiempo

Fuente: Núñez Margarita, 2011, pág. 42

CAPITULO 2

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Materiales y métodos

El trabajo de experimentación se llevo a cabo en los laboratorios certificados de química, microbiología, biotecnología y el laboratorio de procesamiento de lácteos de la Escuela de Ingeniería en Alimentos de la Facultad de Ciencia y Tecnología de la Universidad del Azuay.

La leche para realizar este trabajo fue recolectada en una hacienda ganadera ubicada en la parroquia Victoria del Portete del Cantón Cuenca, a la misma que se realizaron los análisis de control de calidad (sólidos totales, grasa, proteína, acidez, densidad, crioscopia, neutralizantes, antibióticos, microbiológico) de acuerdo a lo indicado en la norma técnica ecuatoriana INEN 09:2012 (Ver anexo 2).

2.2 Materias primas y suministros

- Leche cruda
- Cepas de bacterias lácticas ATCC (Microbiologics,EEUU)
- Enzima lactasa HL5200 (Hansen)
- Citrato de sodio grado alimentario
- Inulina (Granone)
- Carragenato (Danisco)

2.3 Métodos de control que se utilizarán en la investigación

2.3.1 Métodos físico químicos

- Análisis Físico Químicos de la leche cruda según NTE INEN 09:2012
- Determinación de la densidad
- Determinación de crioscopia.

- Determinación de pH
- Determinación de acidez.
- Determinación de grasa (método Gerber)
- Determinación de proteínas
- Determinación de neutralizantes
- Determinación de antibióticos.

2.3.2 Microbiológicos

Dentro de los análisis Microbiológico se realizaron análisis de leche cruda según NTE INEN 09:2012 (Ver anexo 2), análisis microbiológicos de leches fermentadas según INEN 2395: 2011(Ver anexo5).

Además se realizaron análisis que determinan las propiedades probióticas de los microorganismos utilizados en la fermentación.

- Viabilidad
- Tolerancia al ácido y la bilis
- Producción de sustancias antimicrobianas,
- Inhibición de patógenos

2.3.3 Evaluación sensorial

Se utilizó un método aceptación y rechazo según Wittin de Penna (2001) con 30 jueces semientrenados en este tipo de producto.

2.4 Diseño de los experimentos

2.4.1 Diseño del experimento 1. Hidrólisis de la lactosa

Para realizar el proceso de hidrólisis de lactosa se utilizó leche con 12 % de sólidos totales y 3 % de grasa, se elaboraron 2 muestras a las cuales se trató térmicamente a 85°C por 30 minutos (muestra 1) y a 90°C por 5 minutos (muestra 2).

Estas muestras tratadas fueron hidrolizadas de acuerdo a un plan factorial de Superficie de Respuesta (Box-Behnken) con una réplica, las variables independientes fueron: dosis de lactasa (1, 2 y 3 mL/L de leche), tiempo de reacción (0,5, 1.25 y 2 h) y temperatura de reacción (30, 40 y 50°C) y como variables dependientes el grado de

hidrólisis de la lactosa y la concentración de glucosa. El diseño del experimento se presenta en la (Tabla 1)

Tabla 1: Diseño de experimento para la hidrólisis de la lactosa

Bloque	Dosis de lactasa (mL/L de leche)	Tiempo (h)	Temperatura (°C)
1	1	0.5	30
1	1	1,25	30
1	1	2	30
1	2	0.5	30
1	2	1,25	30
1	2	2	30
1	3	0.5	30
1	3	1,25	30
1	3	2	30
1	1	0.5	40
1	1	1,25	40
1	1	2	40
1	2	0.5	40
1	2	1,25	40
1	2	2	40
1	3	0.5	40
1	3	1,25	40
1	3	2	40
1	1	0.5	50
1	1	1,25	50
1	1	2	50
1	2	0.5	50
1	2	1,25	50
1	2	2	50
1	3	0.5	50
1	3	1,25	50
1	3	2	50

2.4.2 Diseño del experimento 2. Mezclas de cepas BAL para elaboración del cultivo mixto

Una vez obtenidos los mejores porcentajes de hidrolisis en la leche, se realizó la preparación de las mezclas de microorganismos probióticos para obtener la leche fermentada.

Las cepas de cultivos puros para la preparación de las mezclas fueron los siguientes: *L. rhamnosus* y *L. acidophilus* de la empresa MICROBIOLOGICS, estas son cepas ATCC liofilizadas, y *B. breve* de CHR HANSEN el cual fue aislado de una mezcla de bacterias del género: *Bifidobacterium*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*.

Para incrementar el número de bacterias puras para la inoculación en la leche estandarizada, fue necesario inocular las cepas en agares específicos de crecimiento para cada bacteria (Tabla 2).

Tabla 2: Agares utilizados para las pruebas de aislamiento

Bacteria	Agar (medio de cultivo)
<i>Bifidobacterium breve</i>	Agar – MRS
	Anaerobier Agar BREWER
<i>L. acidophilus</i>	Agar – MRS
	Agar – Nutrient
	BD LBS Agar (Lactobacillus Selection Agar)
	Agar – Nutrient
<i>L. rhamnosus</i>	Agar – MRS
	Blood Agar Base
	Agar – Nutrient

Las cepas se incubaron durante 48 horas a una temperatura de 37 °C para el caso de *L. rhamnosus* y *L. acidophilus* y 40 °C para el *Bifidobacterium*.

Para el diseño se realizó un diseño de mezclas Simplex Lattice, las restricciones de las cepas para la mezcla se mantiene el intervalo de 0 a 100 %. El diseño se presenta en la (Tabla 3).

Tabla 3: Diseño de las mezclas de cepas para el cultivo mixto

Experimento	<i>Bifidum bacterium</i> <i>breve (%)</i>	<i>Lactobacillus</i> <i>acidophilus (%)</i>	<i>Lactobacillus</i> <i>rhamnosus (%)</i>
1	100	0	0
2	0	100	0
3	0	0	100
4	50	50	0
5	50	0	50
6	0	50	50
7	33,33	33,33	33,33
8	16,66	16,66	66,66
9	16,66	66,66	16,66
10	66,66	16,66	16,66

Para la inoculación de las cepas en leche se tomaron 100 mL de leche descremada con un 9% de sólidos totales y deslactosada, a la misma se le adiciono 1 mL de cultivo (Rodríguez de San Miguel y col., 2004), de acuerdo al diseño de temperatura de incubación constante $38,5 \pm 1$ °C hasta alcanzar un pH entre 4 y 5. Posteriormente se sometió a refrescamiento y se conservó a temperatura de 2 a 4 °C.

Como variables respuesta: se realizó el conteo total de microorganismos fermentadores, los cuales debían ser mayores o iguales a 10^6 , como indica la NTE INEN 2395:2011 (Ver anexo 5). Además se determinó sensorialmente a través de un panel de jueces entrenados la textura, sabor y acidez de la leche fermentada en los distintos experimentos. Con este análisis y la carga microbiana, se seleccionó las mejores mezclas de cultivo para ser utilizadas en la fermentación de leches deslactosadas.

2.4.3 Experimento 3. Fermentación de leches deslactosadas con las mejores variantes de cultivo

Para la fermentación se seleccionó las leches deslactosadas con porcentajes de hidrólisis superiores a 85%. Procedente de la determinación cuantitativa de la Norma Oficial Mexicana NOM-155-SCFI-2003 (ANEXO 1), se tomaron 300 mL de leche deslactosada y se le adicionó inulina (0,3%) y citrato de sodio (0,2%), se aumentó la temperatura a 40°C y se incorporó carragenina (0,15%) mezclada con sacarosa en la relación de 1 g de carragenina con 0,5 g de sacarosa. Las mismas fueron sometidas a tratamiento térmico en sistemas normalizados para la elaboración de leches fermentadas (85°C - 30 min y 90°C - 5 min). Se enfriaron a la temperatura de $38,5 \pm 1$ °C, se inoculó entre 1 y 3 % del cultivo seleccionado y se incubó a temperatura constante hasta alcanzar acidez de 60°D, o pH 5,1. Posteriormente se sometió a refrescamiento y se conservó a temperatura de 2 a 4 °C.

Para la selección de las mejores variantes de leches fermentadas se evaluaron los siguientes indicadores:

- a. Tiempo de fermentación para la acidez de 100°D
- b. Evaluación sensorial

A las formulaciones seleccionadas se les realizó análisis reológicos (firmeza y viscosidad).

2.4.4 Experimento 4. Estudio de almacenamiento de la leche fermentada

De las formulaciones seleccionadas se tomaron las mejores variantes para hacer el estudio de almacenamiento mediante pruebas aceleradas y bajo condiciones controladas.

2.4.4.1 Evaluación bajo condiciones controladas en la cámara climatizada

Binder.

- Se tomó un lote de producto en cantidad suficiente para hacer la evaluación por más de 30 días de almacenamiento a temperatura de 4°C, manteniendo la muestra control a 0°C.

- Los análisis se realizaron a 4°C pasando un día.
- Los indicadores a controlar fueron los siguientes: microbiológicos (mohos y levaduras, *E. coli*, coliformes totales), físico químicos (pH, °D) (INEN 2395: 2011) (Ver anexo 5).
- Evaluación sensorial (aroma, sabor, textura, paleatibilidad, aspecto).

2.4.5 Experimento 5. Producción en planta piloto

Para la producción en planta piloto se procesaron 100L de leche tomando una de las mejores variantes seleccionadas.

Para la elaboración de la leche fermentada se siguió el siguiente procedimiento tecnológico:

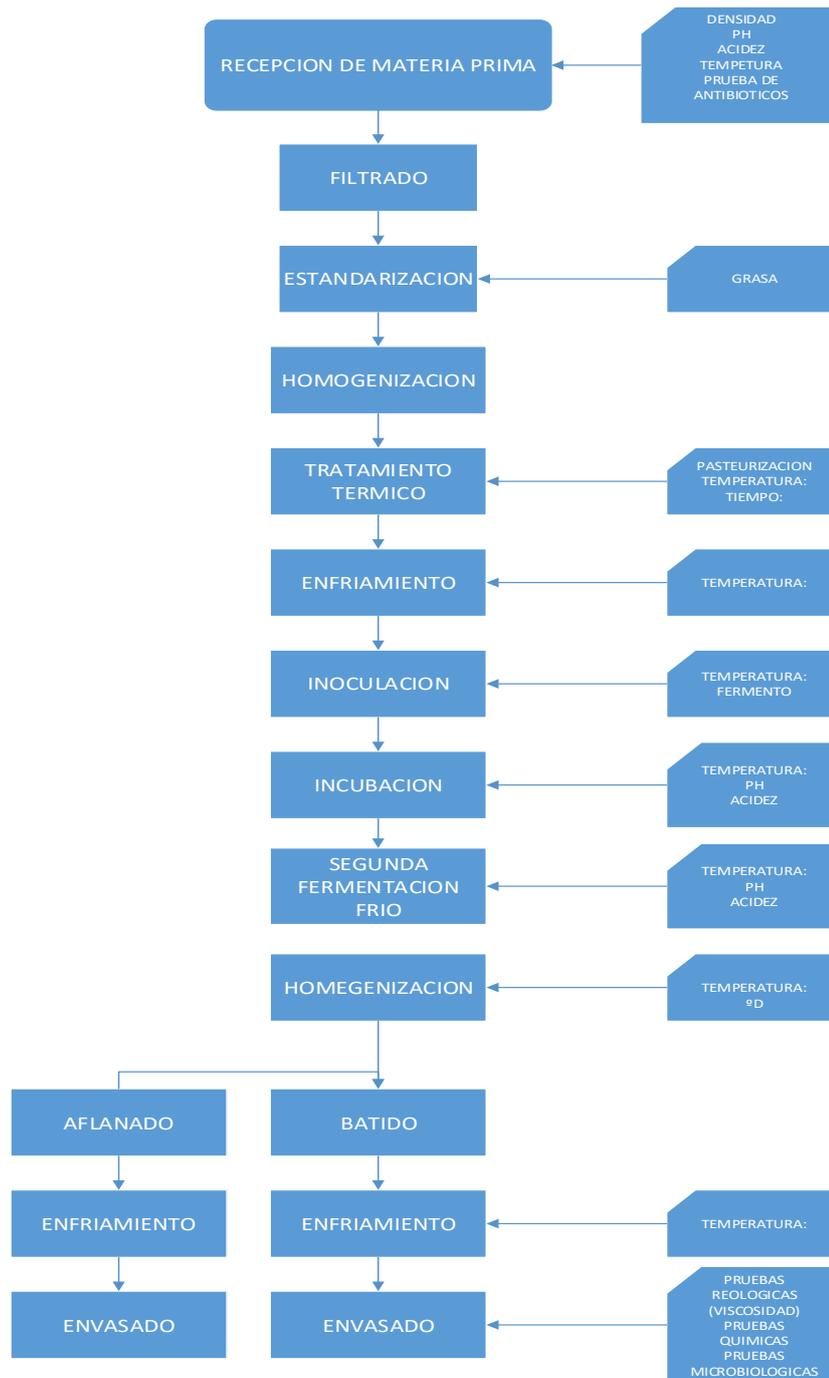


Figura 10: Diagrama de Flujo elaboración de yogur.

- 1. Control de calidad materia prima:** Según NTE INEN 09:2012 donde se midieron características físico-químicas y microbiológicas para determinar si la leche cumple los requisitos necesarios para el proceso fermentativo, térmico y la estabilidad proteica.

- 2. Pasteurización.** Se realizó 72°C por 15 segundos.
- 3. Hidrólisis de la lactosa.** Se aplicó el mejor diseño experimental escogido en este trabajo con las variables: temperatura, dosis de lactasa y tiempo de reacción.
- 4. Dosificación de aditivos:** Se procedió a preparar los insumos de acuerdo a la base prebiótica propuesta para este producto utilizando un FOS (Fructo oligosacárido), inulina (0,3 %) y citrato de sodio (0,2 %).
- 5. Incremento de temperatura a 40°C:** Se precalentó la leche a esta temperatura para facilitar la adición de: estabilizante (0,2 %), inulina (0.4%), azúcar (2%), leche en polvo 1% y TariK7 (fosfato) en un 00.7%.
- 6. Homogenización a 60°C - 823kPa:** Para estabilizar la materia grasa.
- 7. Tratamiento térmico a 85°C por 30 minutos o 90°C por 5 minutos.**
- 8. Enfriamiento a la temperatura de 40°C:** Para realizar la inoculación con el cultivo mezcla de las cepas LAB.
- 9. Dosificación del cultivo de mezcla de las cepas LAB seleccionadas.** se inoculó entre 1 y 3% de cultivo y se incubó a temperatura de $38 \pm 1^\circ\text{C}$.
- 10. Dividir la producción:** Para leche fermentada aflanada (se envaso en envases de 300mL) y realizo la fermentación en situ, el resto de la leche se fermento en tanque y se produjo un producto batido.
- 11. Fermentación hasta pH 5,1 o 60 °D.**
- 12. Bajar la temperatura hasta 4°C.** Para poder realizar la segunda fermentación o la post fermentación donde se consiguió la formación del coágulo y los aromas deseados por un tiempo mínimo de 12 horas.

13. Rompimiento del coágulo. La producción que se encontraba en tanque se la rompió el coágulo mediante una bomba positiva al tanque de envase semiautomático, el producto fue envasado en envases de 250ml.

14. Conservación del producto: El productos se almaceno en cámara de refrigeración de 2 a 4°C

15. Control de calidad de producto terminado: Se midieron las características físico-químicas y microbiológicas de acuerdo a la NTE INEN 2395:2011. (Ver anexo 5).

Los productos obtenidos en esta producción fueron sometidos a evaluación durante el almacenamiento tal como se describió en el experimento 4.

2.5 Evaluación del costo de producción por unidad

Se evaluará el costo por ABC (costos basados en actividades) teniendo en cuenta los insumos. La lista de los costos unitarios de las materias primas e insumos se presenta en la Tabla 4.

Tabla 4: Costos unitarios de materias primas e insumos

Materias primas e Insumos	Unidad	Costo(USD)
Leche	Kg	0,5
Carreagenato	Kg	2
Citrato de sodio	Kg	1,5
Inulina	Kg	4
Fermento Mix probiótico	Kg	2,5

CAPITULO 3

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Desarrollo del Diseño Experimental

3.1.1 Sustrato 1

En el sustrato 1 se realizó un tratamiento térmico a 85°C por 30 minutos, los experimentos se realizaron de acuerdo a la tabla1.

Tabla 6: Coeficientes de las variables en la etapa de hidrólisis.

Factores	Coeficientes	Probabilidades
b123	1,26875	0,05
b3	1,29166667	0,15
b13	1,87	0,25
b23	2,07	0,35
b33	2,56611111	0,45
b12	2,7825	0,55
b2	3,22277778	0,65
b22	4,54055556	0,75
b1	4,77111111	0,85
b11	18,3511111	0,95

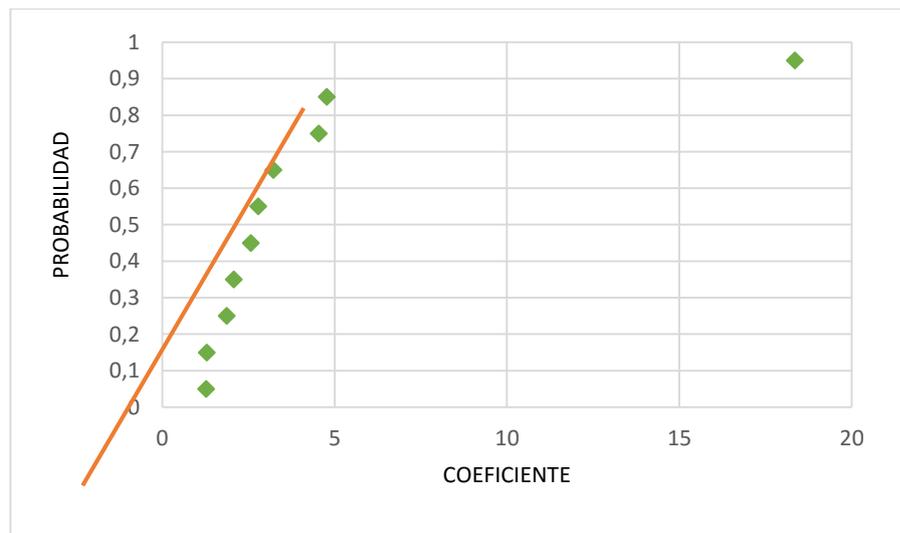


Figura 11: Half- Normal Plot coeficientes de las variables.

Tabla 7: Valores experimentales para el diseño de máxima pendiente

Variable	Escalado	Coeficiente	K	Nueva Var.	Nuevo Esc.	V. real
X1	0	4,77111111		X1'	2,3855556	38,0915556
X2	0	3,22277778	0,5	X2'	1,6113889	1,93554444
X3	-1	1,29166667		X3'	1,6458333	0,50645833

3.1.2 Sustrato 2

En el sustrato 2 se realizó un tratamiento térmico de 90°C por 5 minutos, los experimentos se realizaron de acuerdo a la tabla1.

Tabla 9: Coeficientes de las variables en la etapa de hidrólisis.

Factores	Coeficientes	Probabilidades
b12	-3,87582821	0,05
b123	-2,27729401	0,15
b13	-2,01410854	0,25
b3	-1,89940673	0,35
b23	-0,65503017	0,45
b2	0,15566231	0,55
b22	1,22210323	0,65
b33	1,38348039	0,75
b1	8,22123762	0,85
b11	12,030159	0,95

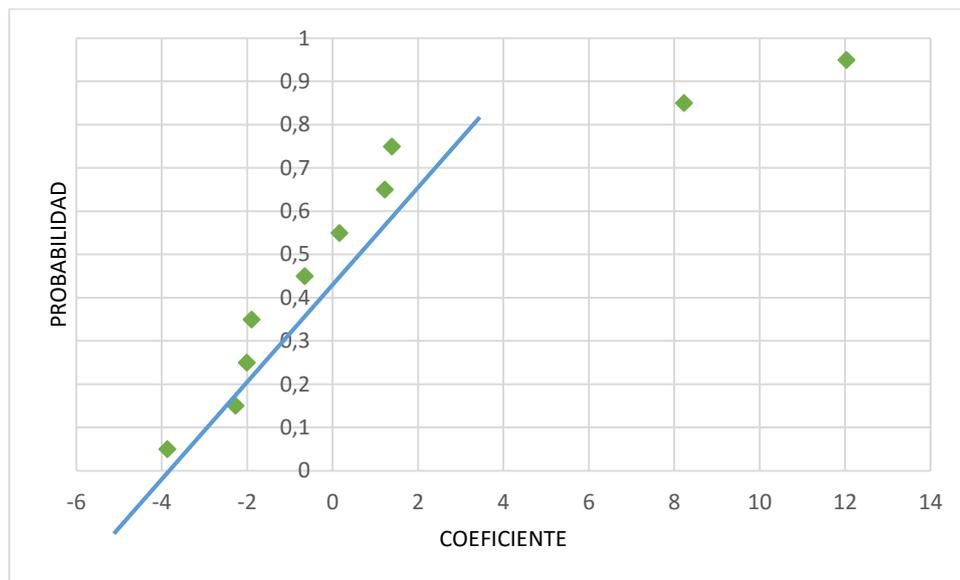


Figura 12: Half- Normal Plot coeficientes de las variables.

Tabla 10: Valores experimentales para el diseño de máxima pendiente

Variable	Escalado	Coeficiente	K	Nueva Var.	Nuevo Esc.	V. real
X1	1	8,22123762		X1'	3,1106188	50,2557314
X2	-1	0,15566231	0,5	X2'	1,0778312	1,00167778
X3	-1	1,89940673		X3'	1,9497034	0,49904466

3.2. Hidrólisis de lactosa

3.2.1 Sustrato 1: 85°C por 30 minutos.

El sustrato 1 fue tratado térmicamente a una temperatura de 85°C por 30 minutos. Para realizar las pruebas de hidrólisis a temperaturas de 30, 40 y 50°C, basados en el diseño experimental de respuesta de superficie por determinados tiempos, los resultados se encuentran en las tablas 11-12-13.

En los figura 13-14-15 se determinan la cantidad de hidrólisis con respecto al tiempo, para ello se trabajó a diferentes temperaturas.

Tabla 11: Hidrólisis de lactosa a temperatura de 30°C.

30 °C	Tiempo en horas	Dosis de lactasa (mL/L)	Punto Crioscópico °C	Punto Crioscópico °H	Y °H*1000	Hidrólisis %	
	0,5	1	-0,8047	0,8047	0,7847	784,700	71,43
	1,25	1	-0,8680	0,8680	0,8480	848,000	83,33
	2	1	-0,8467	0,8467	0,8267	826,700	75,76
	0,5	2	-0,8885	0,8885	0,8685	868,500	47,44
	1,25	2	-0,8887	0,8887	0,8687	868,700	70,42
	2	2	-0,8814	0,8814	0,8614	861,400	69,25
	0,5	3	-0,8882	0,8882	0,8682	868,200	66,49
	1,25	3	-0,9164	0,9164	0,8964	896,400	75,53
	2	3	-0,9310	0,9310	0,9110	911,000	69,64

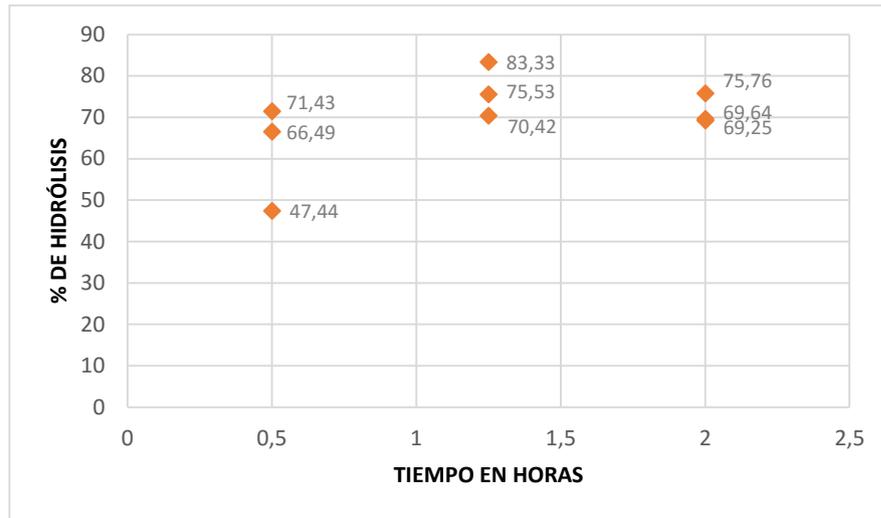


Figura 13: Porcentaje de hidrólisis de lactosa a 30°C.

Tabla 12: Hidrólisis de lactosa a temperatura a 40°C.

40 °C	Tiempo	Dosis de	Punto	Punto	Y	Hidrólisis	
	en horas	lactasa	Crioscópico	Crioscópico			
	H	(mL/L)	°C	°H	°H*1000	%	
	0,5	1	-1,0937	1,0937	1,0737	1073,7	83,33
	1,25	1	-1,0955	1,0955	1,0755	1075,5	95,06
	2	1	-1,0986	1,0986	1,0786	1078,6	96,53
	0,5	2	-1,2260	1,2260	1,2060	1206,0	99,21
	1,25	2	-1,2328	1,2328	1,2128	1212,8	83,89
	2	2	-1,2416	1,2416	1,2216	1221,6	72,25
	0,5	3	-1,3932	1,3932	1,3732	1373,2	73,31
	1,25	3	-1,3609	1,3609	1,3409	1340,9	73,75
	2	3	-1,3856	1,3856	1,3656	1365,6	74,18

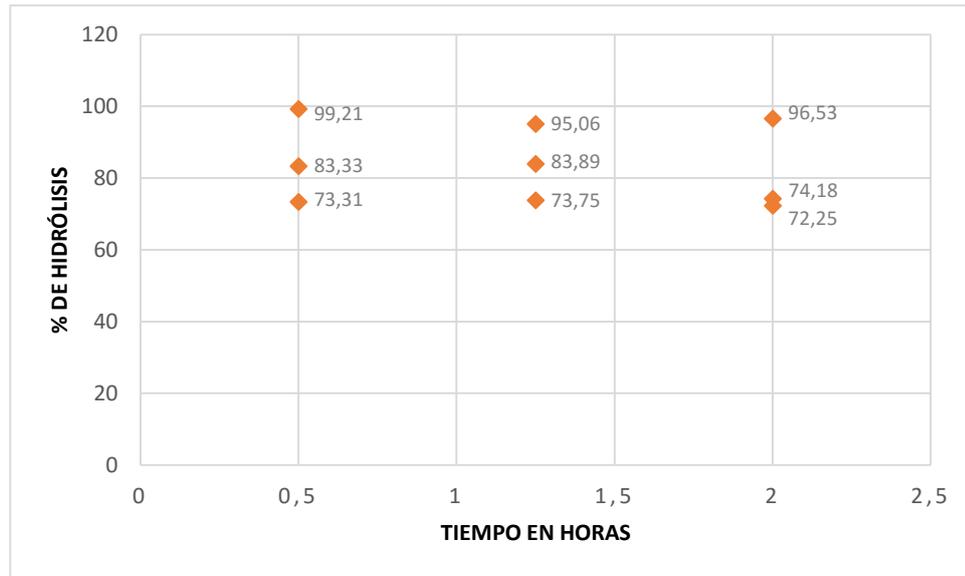


Figura 14: Porcentaje de hidrólisis de lactosa a 40°C.

Tabla 13: Hidrólisis de lactosa a temperatura a 50°C.

50°C	Tiempo	Dosis de	Punto	°H	Y	Hidrólisis	
	en horas	lactasa	Crioscópico				
	H	(mL/L)	°C		°H*1000	%	
	0,5	1	-1,0595	1,0595	1,0395	1039,5	55,56
	1,25	1	-1,0722	1,0722	1,0522	1052,2	60,53
	2	1	-1,0551	1,0551	1,0351	1035,1	62,50
	0,5	2	-1,2525	1,2525	1,2325	1232,5	56,82
	1,25	2	-1,2031	1,2031	1,1831	1183,1	53,76
	2	2	-1,2523	1,2523	1,2323	1232,3	61,12
	0,5	3	-1,3320	1,3320	1,3120	1312,0	68,49
	1,25	3	-1,3435	1,3435	1,3235	1323,5	60,53
	2	3	-1,3690	1,3690	1,3490	1349,0	64,10

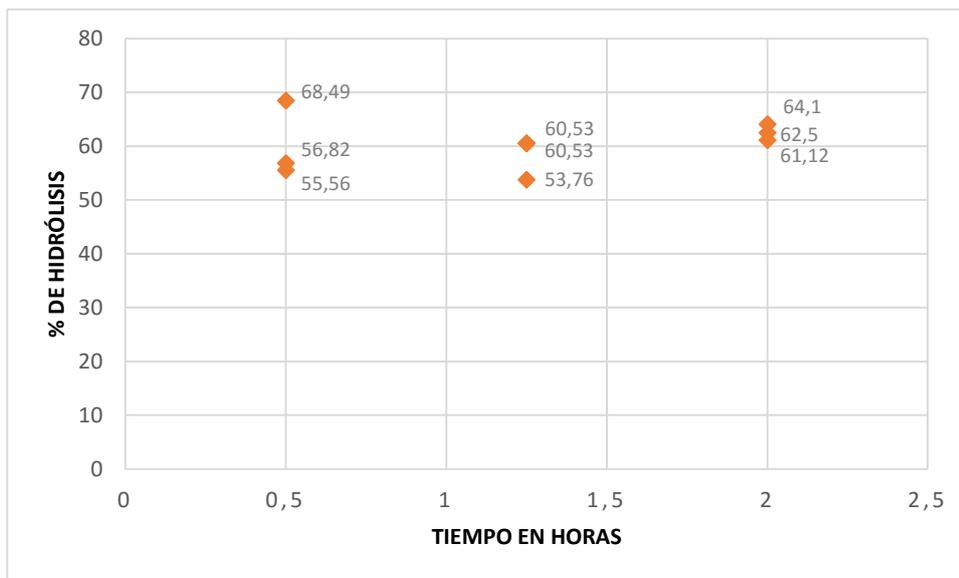


Figura 15: Porcentaje de hidrólisis de lactosa a 50°C.

3.2.1.1 Resumen de datos obtenidos del primer sustrato (85°C por 30 minutos)

El tiempo de reacción de la enzima Ha Lactase 5200 (β -Galactosidasa), es un factor constante, ya que no es una variable, los resultados de la reacción enzimática se dan en la tabla 14. Los valores de tiempo, dosis y temperatura fueron optimizados para el mayor porcentaje de hidrolisis en este caso 99.21%, y se obtuvieron los siguientes valores.

Tabla 14: Resumen de tiempo, temperatura, cantidad de enzima utilizada y resultados del % de hidrolisis en el primer sustrato.

Tiempo	Temperatura	β -Galactosidasa	Hidrolisis alcanzada
h	°C	(mL/L)	%
1,25	30	1	83,33
0,5	38.09	1.93	99,21
0,5	50	3	68,49

En la tabla 15, se indica los resultados de los contenidos de los azúcares presentes en la leche, así como también el porcentaje de ácido láctico luego de la hidrolisis enzimática. Los análisis se realizaron de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-155-SCFI-2003 (Ver Anexo 1).

Tabla 15: Contenido de lactosa, lactosa residual, glucosa y galactosas producida luego del proceso de hidrólisis a las diferentes temperaturas.

Tiempo	Temperatura	Lactosa	Lactosa Residual	Glucosa	Galactosa
H	°C	(mg)	(mg)	(mg)	(mg)
1,25	30	393,33	78,7	56,6	7,9
0,5	38.09	468,3	3,7	2,27	4
0,5	50	323,3	148,7	107	15

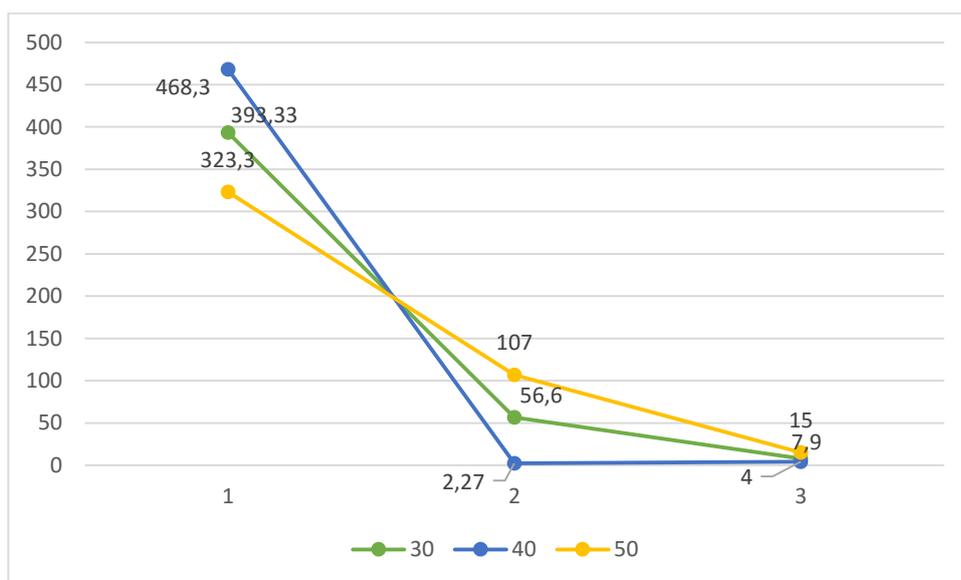


Figura 16: Contenido de lactosa, glucosa y galactosa en función de la temperatura

3.2.1.2. Interpretación:

Una vez obtenidos los resultados y analizados los mismos se determinó que la muestra que alcanzó un mayor porcentaje de hidrólisis (99,21%) fue en la que se realizó un tratamiento térmico de 38.09°C por un lapso de 0,5 horas y una dosis de lactasa de 1.93ml.

3.2.2 Sustrato 2: 90°C por 5 minutos

Para la elaboración de estas pruebas, el sustrato se sometió a una temperatura de 90°C por 5 minutos, a continuación se realizaron las diferentes pruebas de hidrólisis a las temperaturas determinadas. En las tablas 16-17-18 se indica los porcentajes de hidrólisis de acuerdo a la temperatura y tiempo de exposición de la enzima β -Galactosidasa. En las gráficas 17-18-19 se muestran el porcentaje de hidrólisis con respecto al tiempo de incubación.

Tabla 16: Hidrólisis de lactosa a temperatura de 30°C.

30°C	Tiempo	Dosis de Lactasa	Punto Crioscópico	Punto Crioscópico	Y	Hidrólisis	
	H	(ml/L)	°C	° H	°H*1000	%	
	0,5	1	-0,9635	0,9635	0,9435	943,50	64,77
	1,25	1	-0,9671	0,9671	0,9471	947,10	52,63
	2	1	-0,9474	0,9474	0,9274	927,40	57,87
	0,5	2	-1,1121	1,1121	1,0921	1092,1	56,43
	1,25	2	-1,1360	1,1360	1,1160	1116,0	55,80
	2	2	-1,1067	1,1067	1,0867	1086,7	61,73
	0,5	3	-1,2738	1,2738	1,2538	1253,8	63,29
	1,25	3	-1,2479	1,2479	1,2279	1227,9	65,10
	2	3	-1,2528	1,2528	1,2328	1232,8	60,98

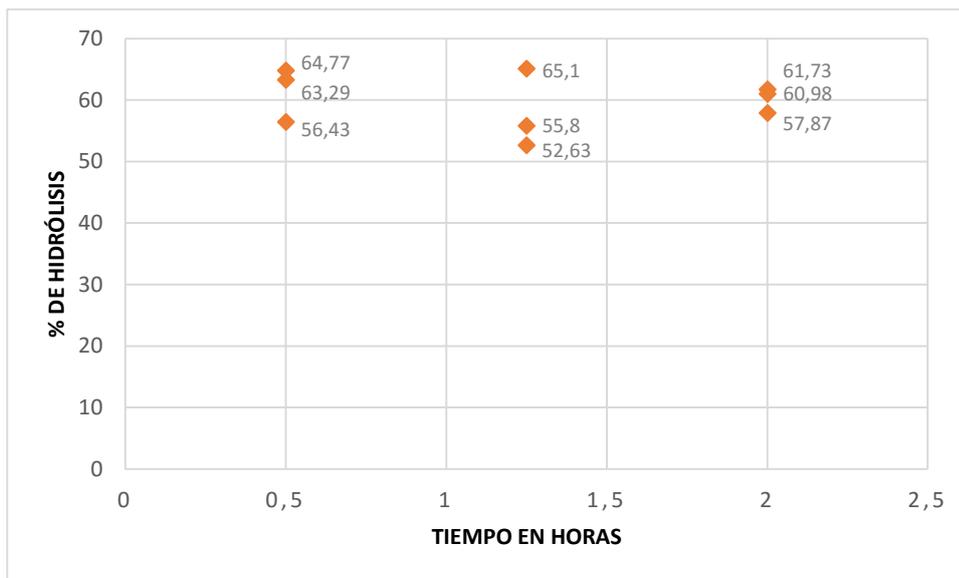


Figura 17: Porcentaje de Hidrolisis de lactosa a 30°C.

Tabla 17: Hidrolisis de Lactosa a temperatura a 40°C

40°C	Tiempo	Dosis de Lactasa	Punto Crioscópico	Punto Crioscópico	Y	Hidrólisis	
	H	(mL/L)		°H	°H*1000	%	
	0,5	1	-1,1067	1,1067	1,0867	1086,7	51,02
	1,25	2	-0,9838	0,9838	0,9638	0963,8	57,08
	2	3	-0,9679	0,9679	0,9479	0947,9	52,08
	0,5	1	-1,1003	1,1003	1,0803	1080,3	58,14
	1,25	2	-1,1186	1,1186	1,0986	1098,6	52,08
	2	3	-1,1096	1,1096	1,0896	1089,6	52,63
	0,5	1	-1,5679	1,5679	1,5479	1547,9	60,24
	1,25	2	-1,2605	1,2605	1,2405	1240,5	58,55
	2	3	-1,2392	1,2392	1,2192	1219,2	62,50

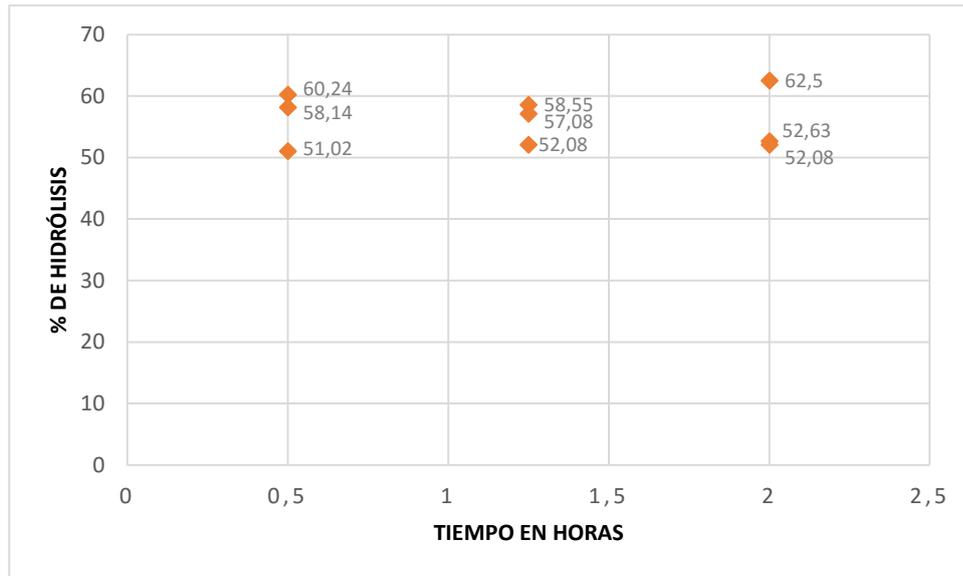


Figura 18: Porcentaje de Hidrolisis de lactosa a 40°C

Tabla 18: Hidrólisis de Lactosa a temperatura a 50°C

50°C	Tiempo	Dosis de Lactasa	Punto Crioscópico	Punto Crioscópico	Y	Hidrólisis	
	H	(mL/L)	°C	°H	(°H*1000)	%	
	0,5	1	-0,9868	0,9868	0,9668	966,80	85,62
	1,25	1	-0,9840	0,9840	0,9640	964,00	73,53
	2	1	-0,9651	0,9651	0,9451	945,10	84,18
	0,5	2	-1,1387	1,1387	1,1187	1118,7	79,87
	1,25	2	-1,118'	1,1180	1,0980	1098,0	84,18
	2	2	-1,1380	1,1380	1,1180	1118,0	68,31
	0,5	3	-1,2916	1,2916	1,2716	1271,6	78,37
	1,25	3	-1,2816	1,2816	1,2616	1261,6	69,25
	2	3	-1,2899	1,2899	1,2699	1269,9	63,29

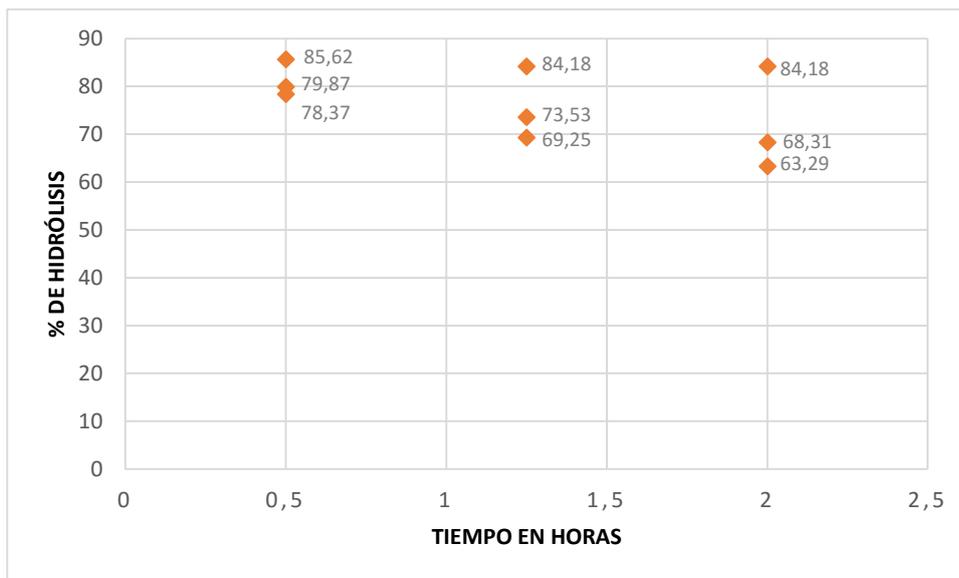


Figura 19: Porcentaje de Hidrolisis de lactosa a 50°C.

3.2.2.1 Resumen de los datos obtenidos en el segundo sustrato (90°C por 5 minutos)

Al igual que en el primer sustrato y de manera resumida se muestra en la tabla 19 los resultados obtenidos de porcentaje de hidrolisis en función del tiempo, temperatura y enzima adicionada. Los valores correspondientes a la hidrolisis de 85.62% fueron optimizados obteniendo los siguientes valores.

Tabla 19: Resumen de tiempo, temperatura; cantidad de enzima utilizada y resultados del % de hidrólisis en el segundo sustrato.

Tiempo	Temperatura	β-Galactosidasa	Hidrolisis
h	°C	(mL/L)	%
1,25	30°C	3	65,10
2	40°C	3	62,50
0,499	50.2°C	1	85,62

En la tabla 20 y figura 20 a continuación, se observan los resultados obtenidos de los análisis de azúcares luego de la hidrólisis enzimática.

Tabla 20: Contenido de lactosa, lactosa residual, glucosa y galactosas producida luego del proceso de hidrólisis a las diferentes temperaturas, en el segundo sustrato.

Tiempo	Temperatura	Lactosa	Lactosa Residual	Glucosa	Galactosa
H	° C	(mg)	(mg)	(mg)	(mg)
1,25	30	307,3	164,7	118,5	10,9
2	40	295,0	177,0	127,3	24,8
0,499	50.2	404,1	67,9	48,8	6,8

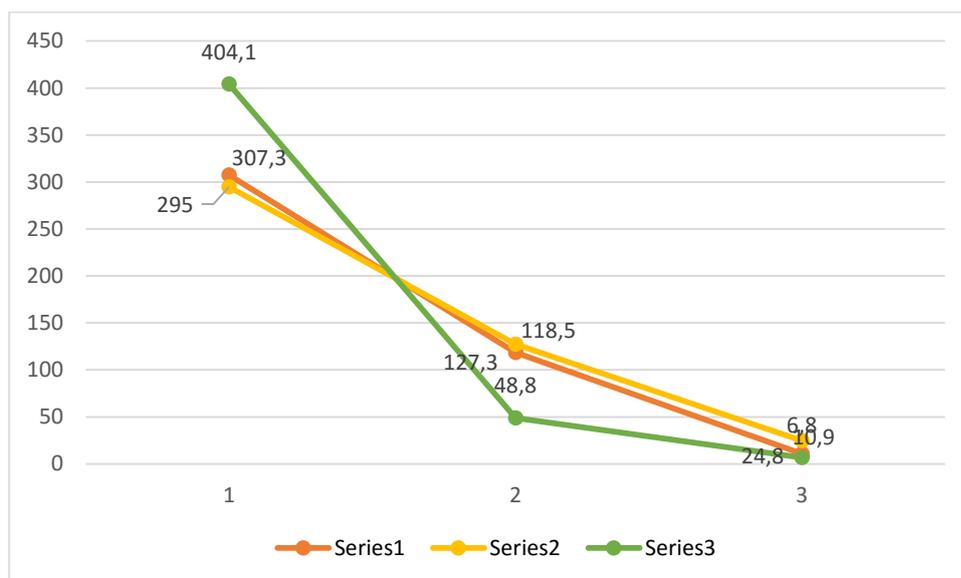


Figura 20: Contenido de azucares en el segundo sustrato

3.2.2.2 Interpretación

Como se puede observar la muestra que presenta mejor hidrólisis es la muestra que fue sometida a temperatura 50.2°C por el tiempo de 0.49 minutos 1 ml de lactasa.

3.3. Velocidad de Reacción.

La velocidad de reacción enzimática es completamente independiente al tratamiento térmico previo de pasteurización del sustrato, en las tablas 21 y 22 y en las figuras 21 y 22 se muestra la capacidad enzimática para hidrolizar el sustrato lácteo y se ve reflejada en la velocidad máxima (Vm) y la constante de Michaelis (Km).

3.3.1 Sustrato 1: 85°C por 30 minutos

Tabla 21: Concentración de lactosa durante el proceso de hidrolisis de primera muestra

40°C	Tiempo	Lactosa	Log
	minutos	(mg.)	
	0	944.87	6,85
	5	903,22	6,8
	10	856,23	6,75
	15	796,32	6,68
	20	659,78	6,49
	25	523,21	6,25
	30	468,3	6,14

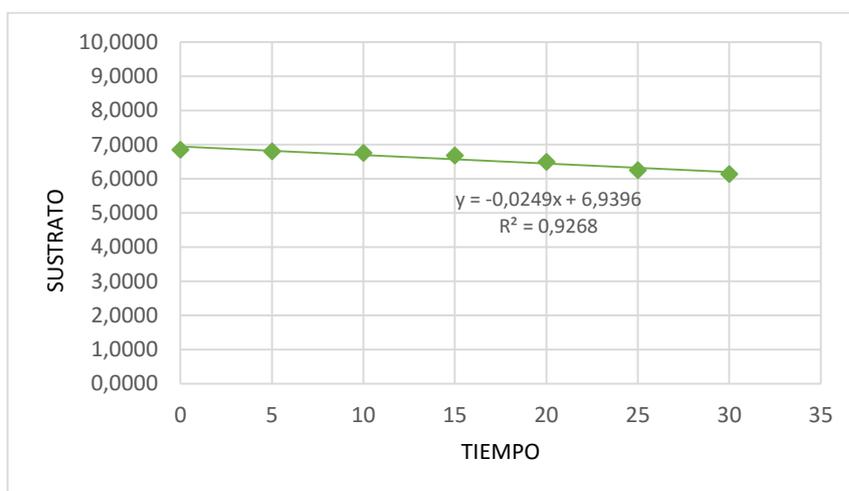


Figura 21: Concentración de lactosa para el cálculo de Km en la primera muestra

Km= 0,0249 Vmáx.= 28,7356

3.3.2 Sustrato2: 90°C por 5 minutos

Tabla 22: Concentración de lactosa durante en el proceso de hidrólisis de la segunda muestra

50°C	Tiempo	Lactosa	Log
	minutos	(mg.)	
	0	699,25	6,55
	5	610,36	6,41
	10	589,23	6,37
	15	532,22	6,27
	20	496,56	6,2
	25	425,62	6,05
	30	404,1	6

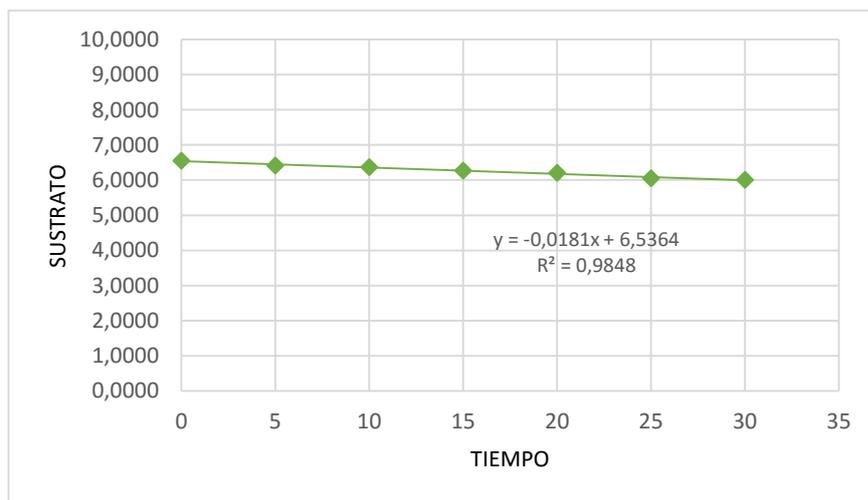


Figura 22: Concentración de lactosa para el cálculo de Km en la segunda muestra

Km= 0,0181 Vmáx.= 33,7837

K_m indica la afinidad que posee la enzima por el sustrato, siendo ésta mayor, cuanto menor es el K_m .

Cuanto menor sea la K_m menor será la cantidad de sustrato necesaria para alcanzar la mitad de la velocidad máxima, por lo que mayor será la afinidad del enzima hacia ese sustrato.

La constante de Michaelis-Menten (K_M) es un parámetro cinético importante por múltiples razones:

K_M es la concentración de sustrato para la cual la velocidad de reacción es la mitad de la velocidad máxima. En efecto, si $K_M = [S]$, la ecuación de Michaelis-Menten se reduce a: $v = V_{max}/2$. El valor de K_M da idea de la afinidad del enzima por el sustrato: A menor K_M , mayor afinidad del enzima por el sustrato, y a mayor K_M , menor afinidad. Este hecho tiene fácil explicación si tenemos en cuenta que K_M se define como (k_2+k_3/k_1) , donde las reacciones 2 y 3 destruyen el complejo ES, mientras que la reacción 1 lo forma. Así, si K_M es grande, el complejo ES es inestable pues predomina la tendencia a destruirlo (poca afinidad hacia el sustrato), y si K_M es pequeña, el complejo ES es estable, ya que predomina la tendencia a formarlo (gran afinidad hacia el sustrato). La K_M del sustrato natural es menor que la de los sustratos análogos. Si dos sustratos del mismo enzima tienen distinta K_M , el que presente mayor K_M tiene menor afinidad por el enzima, y la reacción transcurre siempre a menor velocidad que con el sustrato de menor K_M , salvo a concentraciones saturantes de sustrato, donde la $v = V_{max}$. Los valores de K_M de muchos enzimas son próximos a los de la concentración fisiológica de sus sustratos, de forma que pequeñas variaciones en la $[S]$ pueden suponer grandes cambios en la velocidad de toda una ruta metabólica.

3.4. Mezclas de cepas BAL para elaboración del cultivo mixto

Las cepas de cultivos puros para la preparación de las mezclas serán los siguientes: *L. rhamnosus* y *L. acidophilus* de la empresa MICROBIOLOGICS, estas son cepas ATCC liofilizadas, y *B. breve* de CHR HANSEN el cual fue aislado de una mezcla de bacterias del género: *Bifidobacterium*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*.

Para incrementar el número de bacterias puras para la inoculación en la leche estandarizada, será necesario inocular las cepas en agares específicos de crecimiento para cada bacteria (Tabla 23).

Tabla 23: Agares utilizados para las pruebas de aislamiento

Bacteria	Agar (medio de cultivo)
Bifidobacterium breve	Agar – MRS
	Anaerobier Agar BREWER
L. acidophilus	Agar – Nutrient
	BD LBS Agar (Lactobacillus Selection Agar)
	Blood Agar Base
L. rhamnosus	Agar – Nutrient

Las cepas se incubarán durante 48 horas a una temperatura de 37 °C para el caso de *L. rhamnosus* y *L. acidophilus* y 40 °C para el *Bifidobacterium*.

Para el diseño se realizará un diseño de mezclas Simplex Lattice, las restricciones de las cepas para la mezcla se mantiene el intervalo de 0 a 100 %. El diseño se presenta en la Tabla 24.

Tabla 24: Diseño de las mezclas de cepas para el cultivo mixto

Experimento	Bifidum bacterium breve (%)	Lactobacillus acidophilus (%)	Lactobacillus rhamnosus (%)
1	100	0	0
2	0	100	0
3	0	0	100
4	50	50	0
5	50	0	50
6	0	50	50
7	33,33	33,33	33,33
8	16,66	16,66	66,66
9	16,66	66,66	16,66
10	66,66	16,66	16,66

Para la inoculación de las cepas en leche se tomarán 100 mL de leche descremada con un 9 % de sólidos totales y deslactosada, a la misma se le adicionará 1mL de cultivo (Rodríguez de San Miguel y col., 2004), de acuerdo al diseño de temperatura de incubación constante $38,5 \pm 1$ °C hasta alcanzar un pH entre 4 y 5 (acidez de 90 °D). Posteriormente se someterán a refrescamiento y se conservarán a temperatura de 2 a 4°C.

Como variables respuestas se tomarán:

- Tiempo de fermentación para la acidez de 90 °D
- Viabilidad
- Tolerancia al ácido y la bilis
- Producción de sustancias antimicrobianas
- Inhibición de patógenos
- Evaluación sensorial (aroma, sabor, textura, paleatibilidad, regusto, aspecto)

Con este experimento se seleccionarán las mejores mezclas de cultivo para ser utilizadas en la fermentación de leches deslactosadas.

De los experimentos que se realizaron con el diseño de mezclas para adicionar las bacterias lácticas y elaborar yogurt, se realizaron determinaciones del REP por

duplicado de los experimentos seleccionados por el panel de catación, los cuales fueron los experimentos 5 y 10. Ver tabla 25.

Tabla 25: Recuento de cepas LAB en agar MRS

Muestra	REP
Experimento	UFC/g
5	6,6
10	6,84

Después de haber sembrado las muestras en el agar MRS, se realizó el conteo de microorganismos específicos (género: *Lactobacillos*), y se obtuvieron resultados favorables (tabla 26) que indican la viabilidad para que este producto sea considerado como probiótico, puesto que cumple con la normativa ecuatoriana para leches fermentadas (Ver Anexo 5).

3.5. Pruebas de determinación de capacidad probiótica

3.5.1. Tolerancia al ácido

Los análisis se realizaron también en los experimentos de mezclas puras ya que es necesario evaluar su acción probiótica de forma individual o si para su efecto necesitan asociación. De acuerdo a lo expuesto se realizaron pruebas con ácido clorhídrico a diferentes pHs con una exposición de 2 horas y con concentraciones logarítmicas de:

Tabla 26: Recuento en placa de los cultivos base

Cuantificación del STARTER / Cultivo	
Base	
Experimento	UFC/mL
1	7×10^9
2	2×10^8
3	3×10^8
5	1×10^7
10	2×10^7

Se realizaron 4 repeticiones: en las tres primeras pruebas se construyó estándares de McFarland 5, 9 y 10 con un equivalente en logaritmos de 10^8 - 10^9 pero no hubo supervivencia luego de realizar una siembra en agar PCA por 48 horas a 37°C , por lo cual se decidió agregar al estándar 10, *inulina* un agente prebiótico en un porcentaje de 0,5 %, con lo cual existió supervivencia:

- En HCl, pH 3 existe una supervivencia de bacterias en logaritmos de 10^7 ufc/ml de todos los experimentos.
- En HCl pH 2,5 los experimentos 1 y 2 sobreviven en logaritmos de 10^6 , en el experimento 3 no hubo supervivencia y en los experimentos 5 y 10 la supervivencia fue en logaritmos de 10^7 .
- En HCl, pH 2 no hubo supervivencia de bacterias en ninguno de los experimentos.

Tabla 27: Tolerancia a diferentes concentraciones de ácido clorhídrico

Tolerancia al ácido			
Experimentos	pH		
	3	2,5	2
Recuento en placa			
Mezclas puras			
1	3×10^7	1×10^6	0
2	2×10^7	3×10^6	0
3	2×10^7	0	0
Mezcla binaria			
5	4×10^7	2×10^7	0
Mezcla ternaria			
10	2×10^7	1×10^7	0

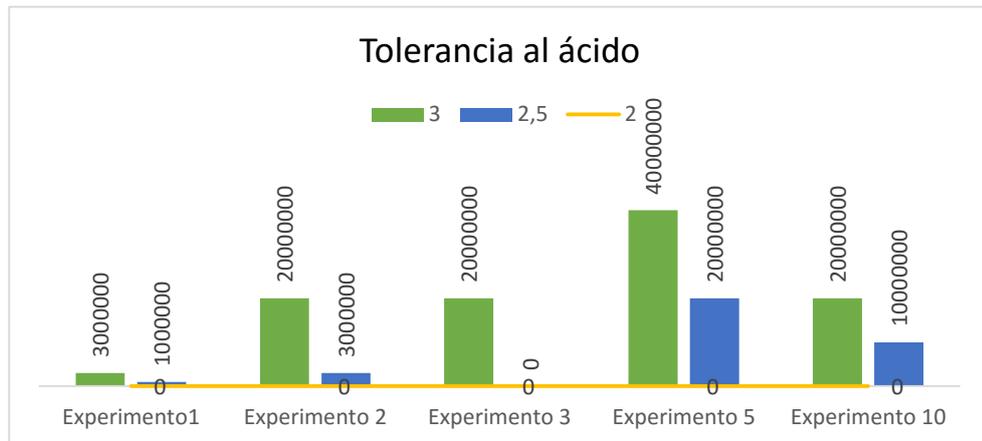


Figura 23: Representación gráfica de la tolerancia al ácido clorhídrico 6M

3.5.2 Tolerancia a la bilis

Para este análisis también se tomaron en cuenta los experimentos de mezclas puras con una exposición de 2 horas:

Las bacterias no fueron resistentes en concentraciones de bilis al 3 por ciento en los experimentos 1, 2 y 3, mientras que en el 5 y 10 resistieron en logaritmos de 10^7 ; en concentraciones de 2 por ciento de bilis las mezclas puras 1, 2 y 3 resistieron en logaritmos de 10^8 , 5 y 10 en log de 10^7 .

Tabla 28: Tolerancia a la bilis 2 porcentajes

Tolerancia a la bilis		
Experimentos	Bilis porcentaje	
	0,3%	0,2%
	Recuento en placa	
Mezclas puras		
1	0	8×10^8
2	0	2×10^8
3	0	1×10^8
Mezcla binaria		
5	2×10^7	7×10^7
Mezcla ternaria		
10	4×10^7	9×10^7

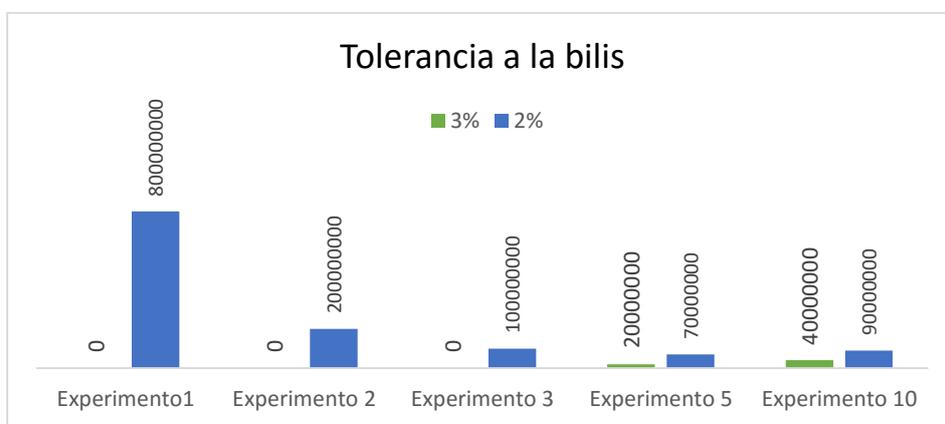


Figura 24: Representación gráfica de la tolerancia a la bilis

3.5.3. Determinación Antipatógena.

Se determinó que los halos de inhibición de las mezclas de bacterias estaban en el orden de los 17 mm en las mezclas de bacterias BAL sobre *Stapylococcus aureus* y *E. coli*, no siendo efectivos contra *Salmonella*, lo cual demuestra que debido a las bacteriocinas que producen las BAL, inhiben el crecimiento de patógenos in vitro.

Tabla 29: Halos de inhibición de la actividad antipatógena

Actividad antipatógena tamaño de halos de inhibición				
Bacterias beneficiosas	Experimentos	Bacterias patógenas		
		Mezclas puras		
		<i>E. coli</i>	<i>Salmonella</i>	<i>S. aureus</i>
	Experimento 1	12,6mm	12,3mm	11mm
	Experimento 2	11,3mm	11,3mm	10,3mm
	Experimento 3	11,3mm	12,7mm	10,7mm
		Mezcla binaria		
	Experimento 5	14,3mm	13,7mm	13,7mm
		Mezcla ternaria		
	Experimento 10	12,3mm	13,3mm	12mm

Se determinó la actividad bactericida de las mezclas frente a 3 bacterias patógenas: *E. coli*, *Salmonella spp* y *S. aureus*; además de evaluar las mezclas seleccionadas se tomaron en cuenta las mezclas puras con el afán de hacer una comparación entre su actividad individual y en conjunto (interacción).

Con respecto a la inhibición de las mezclas frente a *E. coli*, el experimento 5 presentó un halo superior al resto de experimentos 14,3mm de diámetro, los experimentos 1 y 10 presentaron un halo de 12,6mm y 12,3mm respectivamente.

La inhibición frente a *Salmonella spp* el experimento 5 presentó un halo superior al resto 13,7mm, seguido del experimento 10 con 13,3mm.

Y frente a *S. aureus* el experimento 5 igualmente dio un diámetro de 13,7mm siendo de igual forma superior a los demás experimentos.

En todos los casos las mezclas dan resultados superiores a las puras lo que da entender que su actividad en interacción es más eficiente que su acción individual.

Tabla 30: Tamaño de Halos

Difusión en agar	
Staphulococcus aureus ATCC 36862	
	Tamaño de halos
Bifidobacterium	10mm
L. acidophilus	15mm
L. rhamnosus	17mm
Mezcla de los tres microorganismos	25mm
Escherichia coli ATCC 10536	
	Tamaño de halos
Bifidobacterium	8mm
L. acidophilus	8mm
L. rhamnosus	15mm
Mezcla de los tres microorganismos	22mm
Salmonella enteritidis ATCC 13076	
	Tamaño de halos
Bifidobacterium	4mm
L. acidophilus	4mm
L. rhamnosus	4mm
Mezcla de los tres microorganismos	4mm

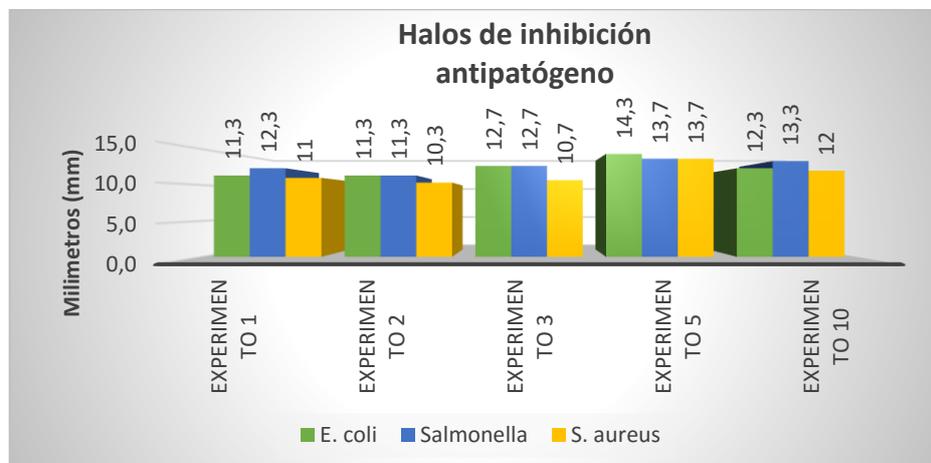


Figura 25: Halos de inhibición antipatógeno

Las leches fermentadas se colocaron en una incubadora (marca Memmert) a $38,5 \pm 1^\circ\text{C}$ el tiempo fue determinado por el alcance de la acidez de 60°D detectado en forma automática. Luego del proceso de fermentación se tomó una muestra de cada experimento y se realizó un conteo en placa (REP).

Para la evaluación sensorial se utilizó una prueba de satisfacción aplicando una escala hedónica de 4 a 1 (4 el mayor grado y 1 el más bajo), los atributos sensoriales evaluados fueron los siguientes: aspecto, olor, sabor y consistencia. El grupo evaluador estuvo formado por 30 jueces semi entrenados.

Tabla 31: Resultados de la prueba de evaluación sensorial

Número de experimento	Puntuación de los atributos sensoriales				
	Aspecto	Olor	Sabor	Consistencia	Aceptación
1	3	2	2	2	2
2	3	2	2	2	2
3	2	2	2	2	2
4	3	3	3	2	3
5	4	3	4	4	4
6	3	3	3	3	3
7	3	3	3	3	3
8	3	3	3	3	3
9	3	3	3	3	3
10	4	4	4	4	4

De los experimentos seleccionados, se obtuvo una curva de crecimiento bacteriano mediante el recuento de microorganismos presentes cada 0,5 h durante la fermentación y posfermentación.

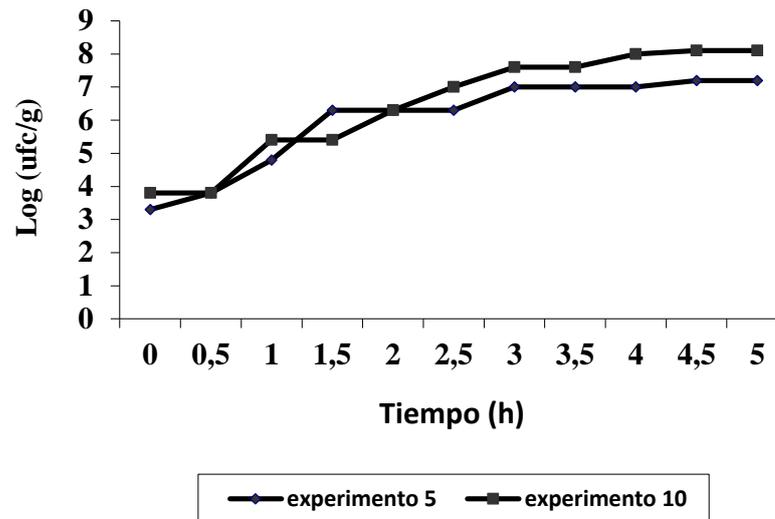


Figura 26: Curvas de crecimiento de las bacterias lácticas de los experimentos seleccionados.

Con estos resultados se concluye que de las mezclas diseñadas la que mejor comportamiento presentó para su utilización en la elaboración de leches fermentadas fue la compuesta por *Bifidobacterium breve* (66,66 %), *Lactobacillus acidophilus* (16,66 %) y *Lactobacillus rhamnosus* (16,66 %) (Experimento 10). Esta mezcla se probó en la leche con la hidrolisis óptima de acuerdo al diseño experimental Box Benkhen (38,09°C, 1.93ml lactasa y 0.5 horas).

3.6 Identificación de bacterias beneficiosas en el microscopio

Lb. Acidophilus y *Lb. rhamnosus*: células en forma de bastoncillos o varas a menudo agrupadas en cadenas

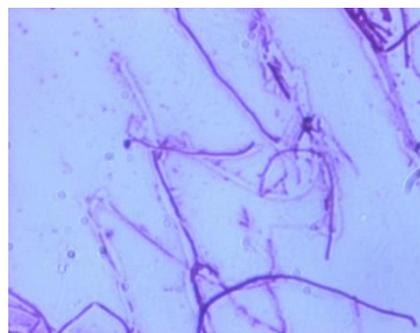


Figura 27: células de *Lb. acidophilus* vistas al microscopio

Bifidobacterium: células características por su gran variedad de formas (pleomórficos)

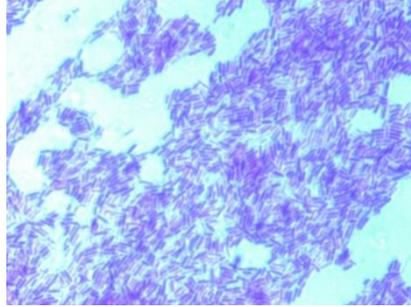


Figura 28: Células de *Bifidobacterium* vistas en el microscopio

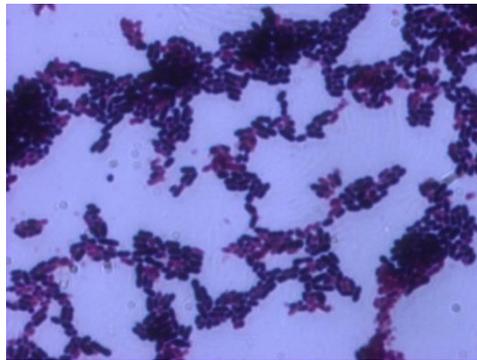


Figura 29: Células de *Lb. rhamnosus* vistas en el microscopio

3.6.1 Interpretación

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

3.7 Curva de Acidificación.

En los productos obtenidos de los experimentos optimizados 2 (50.2°C, 1ml, 0.499horas) y 5(38,09°C, 1.93ml lactasa y 0.5 horas), se realizaron análisis de acidez, para determinar el tiempo de vida útil. Comercialmente un yogurt tiene una vida de

estante de 30 días, tiempo en el cual se asume que existen cambios considerables como el aumento de acidez, en el caso de los experimentos 2 y 5, la acidez se mantuvo constante desde la día 8 hasta la semana 5, que se encontró en 104°D. De acuerdo a Serras, et al. (2008), la actividad de las bacterias ácido lácticas que están presentes en el yogurt es muy baja a temperaturas de refrigeración, pero aún siguen vivas y continúan transformando la lactosa en ácido láctico, lo que provoca una disminución del pH y un aumento de la acidez (se estima que tras unas 4-7 semanas, el aumento de la acidez es del orden del 0,2%). Sin embargo, en el producto elaborado en los experimentos, debido a que el sustrato contiene muy poca lactosa debido a la hidrólisis previa, no se da la producción de ácido láctico en este tiempo, debido a que se forma en mínimas cantidades que no afectan al producto en la vida de anaquel y que podría llegar a ser consumido por más tiempo. En la tabla 29 se muestran los promedios de grados de acidez para los dos experimentos en el tiempo y en la figura 32 se observa la curva de acidez que se mantiene constante a 104°D.

Tabla 32: Grados Dornic (Acidez titulable) de los experimentos 2 y 5

Tiempo	Acidez (°D)
0 horas	17
1,5 horas	60
48 horas	76
96 horas	80
Semana 1	100
Semana 2	104
Semana 3	104
Semana 4	104
Semana 5	104

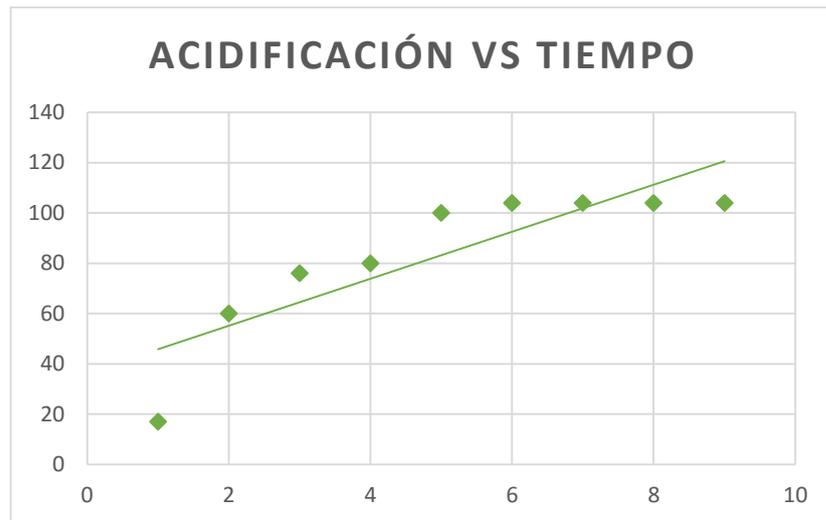


Figura 30: Curva de acidificación en función del tiempo de almacenamiento

3.7.1 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, basándose en NTE INEN 2395:2011 (Ver Anexo 5).

3.8 Análisis sensorial

Luego de haber escogido las mejores mezclas de las bacterias (experimento 10), y los experimentos de hidrolisis optimizados 2 (50.2°C, 1ml, 0.499horas) y 5(38,09°C, 1.93ml lactasa y 0.5 horas), se realizó una fermentación, obteniendo productos a los cuales se les realizo los respectivos pruebas sensoriales.



Figura 31: Cataciones. (a) Evaluación del catador. (b) Muestras de catación.

Se utilizó un panel semientrenado, y se evaluaron los productos 2 y 5 las 5 semanas que duró el estudio. En las tablas 34-35-36 y las figuras 32-33-34 se muestran los promedios de las cataciones para los dos experimentos.

Tabla 33: Nomenclatura de las fichas de cata

NOMENCLATURA	
1	MALO
2	REGULAR
3	BUENO
4	MUY BUENO

Tabla 34: Resultados obtenidos de la ficha de catación en relación al aspecto visual.

	Muy bueno	Bueno	Regular	Malo
Homogéneo	25	5	0	0
Fluido	25	5	0	0
Presenta Sinéresis	28	2	0	0

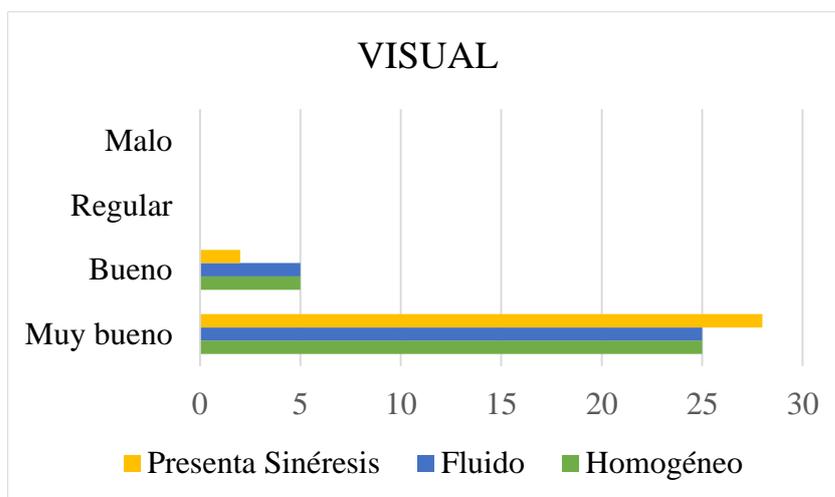


Figura 32 Estadísticas resultantes del aspecto visual obtenidos en la ficha de catación

Tabla 35: Resultados obtenidos de la ficha de catación en relación al sentido del olfato

	Muy bueno	Bueno	Regular	Malo
Agradable	27	3	0	0
Propio	30	0	0	0
Frutal	20	10	0	0
Acido	26	4	0	0

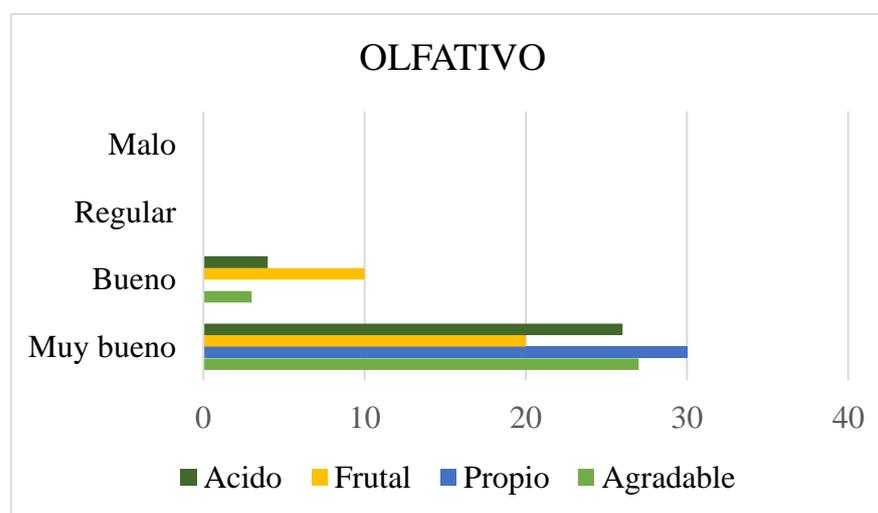


Figura 33 Estadísticas resultantes obtenidos por catación por el sentido del olfato.

Tabla 36: Resultados obtenidos de la ficha de catación en relación al sabor

	Muy bueno	Bueno	Regular	Malo
Dulce	26	4	0	0
Ácido	25	3	2	0
Amargo	30	0	0	0
Salado	22	7	1	0
Picante	30	0	0	0

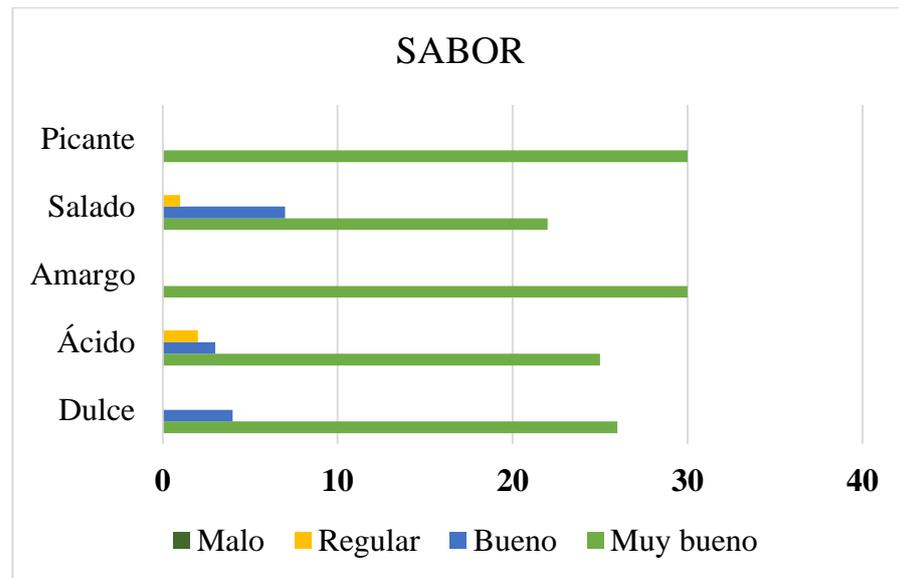


Figura 34: Estadísticas resultantes de la ficha de catación para el sabor.

3.8.1 Interpretación

Los resultados obtenidos en esta ficha de catación 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.

3.9 La vida útil sensorial

Para la determinación de la vida útil de nuestros productos (experimentos 2 y 5), se utilizó la cámara climatizada marca Binder (Alemania), la cual fue usada a diferentes tiempos y temperaturas, obteniendo los resultados que se presentan en la tabla 37 y 38.

Tabla 37: Resultados obtenidos experimento 2 a 4°C.

EXPERIMENTO 2				
Días	4°C			
	pH	Acidez	Mohos y levaduras	E. coli, Coliformes totales
1	5,1	60	0	0
3	4,9	76	0	0
5	4,79	80	0	0
8	4,52	98	0	0
10	4,44	100	0	0
12	4,48	102	0	0
15	4,47	102	0	0
17	4,46	104	0	0
19	4,43	104	0	0
22	4,41	104	0	0
24	4,38	104	0	0
26	4,35	104	0	0
29	4,34	104	0	0
31	4,33	104	0	0
33	4,33	104	0	0
36	4,33	104	600	0

Tabla 38: Resultados obtenidos experimento 5 a 4°C.

EXPERIMENTO 5				
Días4	4°C			
	pH	Acidez	Mohos y levaduras	E. coli, Coliformes totales
1	5,1	60	0	0
3	4,77	88	0	0
5	4,74	87	0	0
8	4,69	86	0	0
10	4,63	86	0	0
12	4,58	89	0	0
15	4,56	100	0	0
17	4,55	104	0	0
19	4,54	104	0	0
22	4,53	96	0	0
24	4,52	96	0	0
26	4,35	104	0	0
29	4,35	104	0	0
31	4,35	104	0	0
33	4,35	104	0	0
36	4,35	104	600	0

Para la determinación de la vida útil se utilizó el programa STATGRAPHICS centurión XV, en el cual se utilizó el análisis de Weibull que se utiliza comúnmente para analizar datos que representan tiempos de vida o tiempos de fallo.

Para realizar este análisis solo es necesario definir 2 variables el tiempo en el que se midió cada muestra, es decir n tiempos observados (datos) y otra los censurados de ceros y unos. El valor 0 indica el tiempo de fallo de la unidad muestreada y 1 si la muestra esta censurada es decir que no existe ningún fallo.

3.9.1 Análisis Weibull en el experimento 2.

En la tabla 39 se muestra los resultados de las pruebas de bondad de ajuste realizadas para determinar si el tiempo de fallos puede modelar adecuadamente con una distribución de Weibull. Se observa que el valor de P es mayor o igual a 0.05 por lo tanto se ajusta a la distribución de Weibull.

Tabla 39: Pruebas de Bondad-de-Ajuste para TIEMPO Prueba de Kolmogorov-Smirnov

Weibull	
DMAS	0,101099
DMENOS	0,187922
DN	0,187922
Valor-P	0,368294

En la tabla 40 se calcularon las áreas de cola para la distribución de Weibull ajustada. Se calculó áreas de colas hasta para 5 valores críticos, la salida indica que la probabilidad de obtener un valor menor o igual a 31,0 es 0,00288315.

Tabla 40: Áreas de Cola para TIEMPO

X	Área Cola Inferior (<)	Área Cola Superior (>)
31,0	0,00288315	0,997117
40,0	0,651547	0,348453

En la tabla 41 se calculó los valores críticos para las distribuciones. La salida indica que el valor de la distribución Weibull ajustada abajo del cual se podría encontrar un área igual a 0,01 es 32,7162, es decir que nuestro producto tendría 32.71 días de vida útil.

Tabla 41: Valores Críticos para TIEMPO

X	Área Cola Inferior (<)	Área Cola Superior (>)
32,7162	0,01	0,99
36,2116	0,1	0,9
39,2819	0,5	0,5
41,373	0,9	0,1
42,6306	0,99	0,01

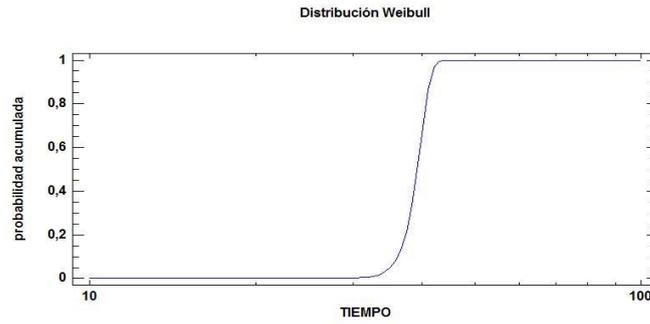


Figura 35: Distribución de Weibull acumulada.

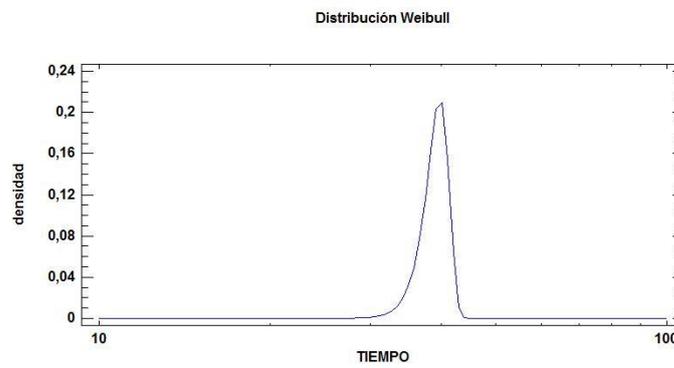


Figura 36: Función de densidad de la distribución de Weibull estimada.

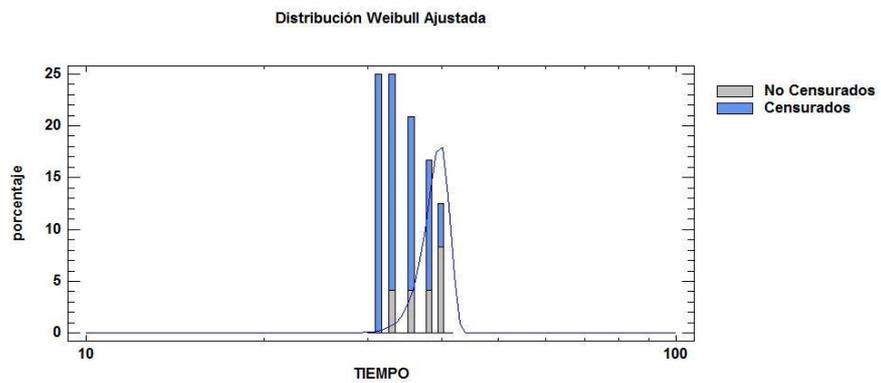


Figura 37: Distribución de Weibull ajustada

En la figura 38 se muestra el ajuste de los datos de tiempo de fallo a la función de densidad de probabilidad de Weibull, como puede apreciarse los datos muestran un buen ajuste a la distribución de probabilidad asumida.

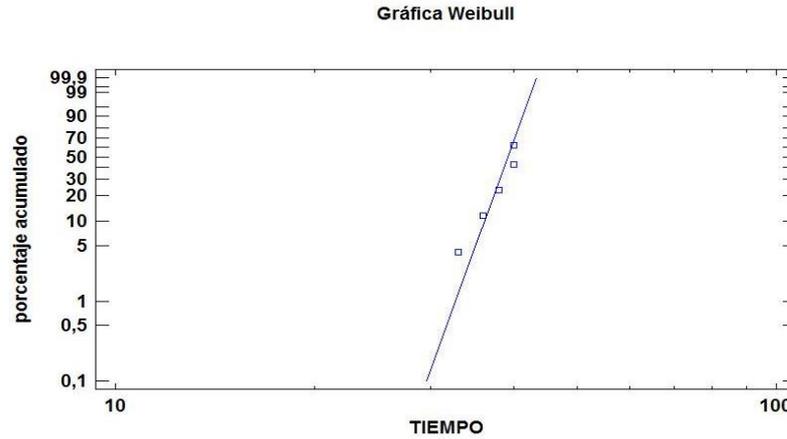


Figura 38: Ajuste de datos a la función de distribución de Weibull.

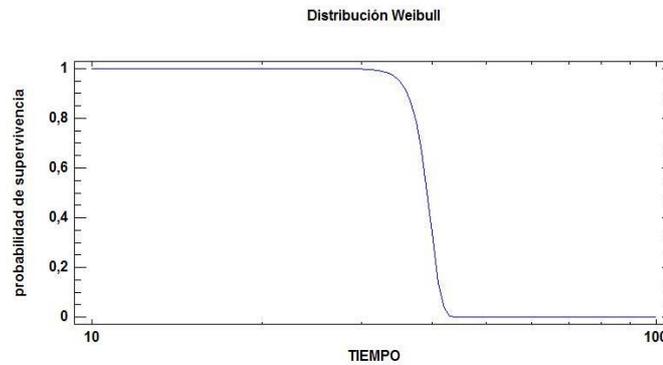


Figura 39: Probabilidad de supervivencia.

3.9.2 Análisis Weibull en el experimento 5.

En la tabla 42 se muestran los resultados de las pruebas de bondad de ajuste realizadas para determinar si el tiempo de fallos puede modelarse adecuadamente con una distribución de Weibull. Se observa que el valor de P es mayor o igual a 0.05 por lo tanto se ajusta a la distribución de Weibull.

Tabla 42: Pruebas de Bondad-de-Ajuste para TIEMPO Prueba de Kolmogorov-Smirnov.

	Weibull
DMAS	0,14
DMENOS	0,188683
DN	0,188683
Valor-P	0,390299

En la tabla 43 se calcularon las áreas de cola para la distribución de Weibull ajustada. Se calculó áreas de colas hasta para 5 valores críticos, la salida indica que la probabilidad de obtener un valor menor o igual a 33,0 es 0,00336944.

Tabla 43: Áreas de Cola para TIEMPO

X	Área Cola Inferior (<)	Área Cola Superior (>)
33,0	0,00336944	0,996631
43,0	0,86	0,14

En la tabla 44 se calculó los valores críticos para las distribuciones. La salida indica que el valor de la distribución Weibull ajustada abajo del cual se podría encontrar un área igual a 0,01 es 34,5314, es decir que nuestro producto tendría 34.51 días de vida útil.

Tabla 44: Valores Críticos para TIEMPO

X	Área Cola Inferior (<)	Área Cola Superior (>)
34,5314	0,01	0,99
38,0746	0,1	0,9
41,1762	0,5	0,5
43,2833	0,9	0,1
44,5486	0,99	0,01

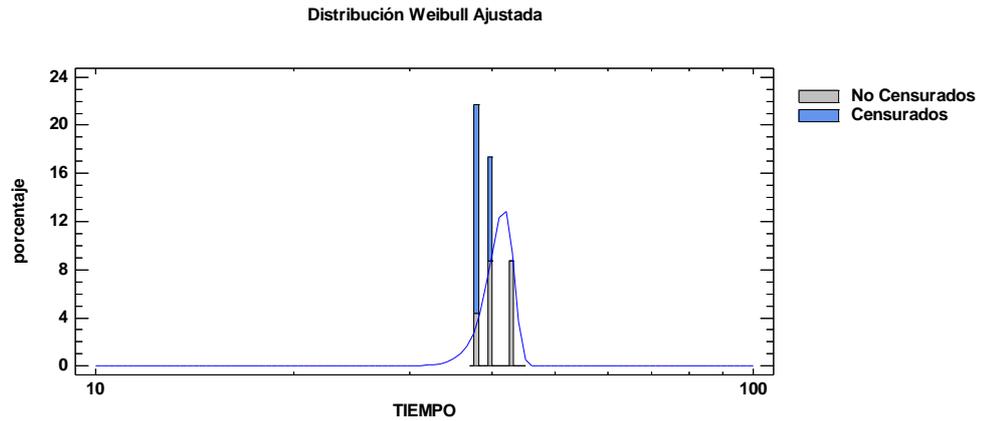


Figura 40: Distribución de Weibull ajustada.

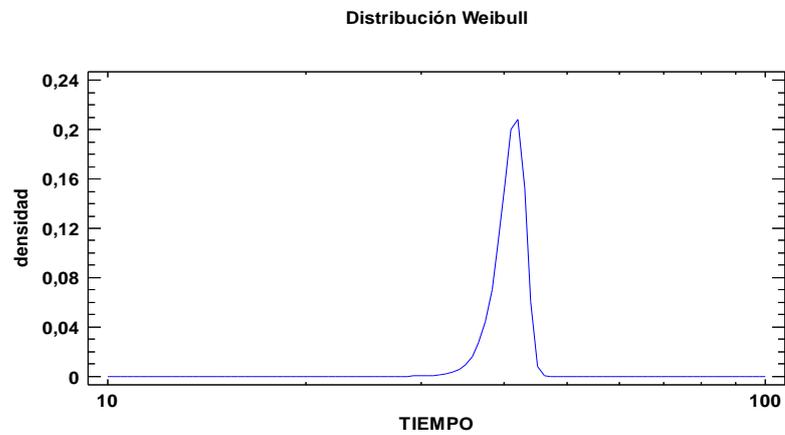


Figura 41: Distribución de Weibull densidad vs tiempo.

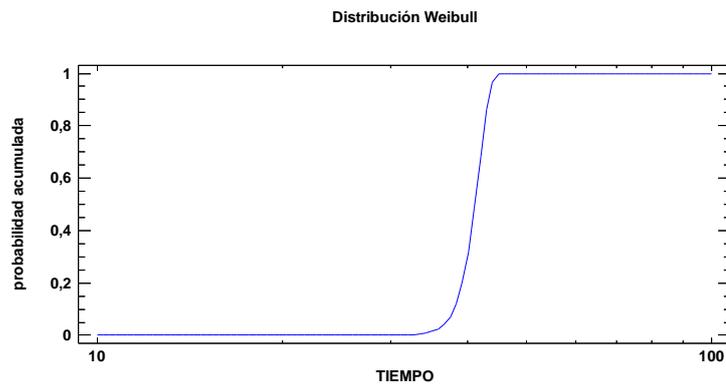


Figura 42: Distribución de Weibull tiempo vs probabilidad acumulada.

En la figura 43 se muestra el ajuste de los datos de tiempo de fallo a la función de densidad de probabilidad de Weibull, como puede apreciarse los datos muestran un buen ajuste a la distribución de probabilidad asumida.

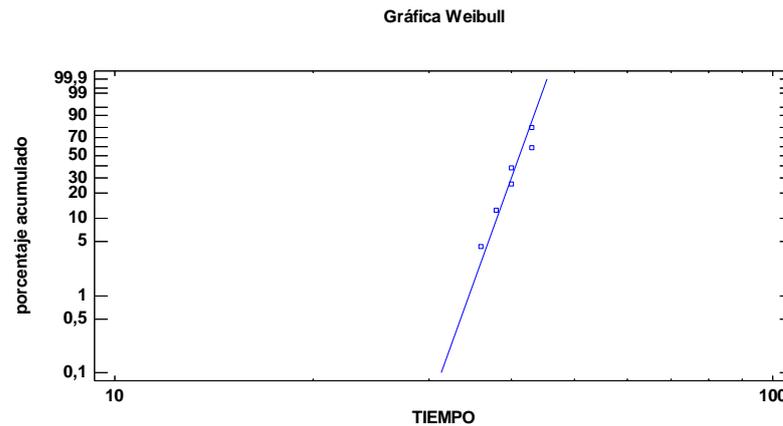


Figura 43: Grafica de Weibull porcentaje acumulado vs tiempo.

3.9.3 Interpretación:

Luego de realizar el estudio de vida útil de los yogures podemos observar que se calculó los valores críticos para las distribuciones. La salida indica de la muestra 2 posee el valor de la distribución Weibull ajustada abajo del cual se podría encontrar un área igual a 0,01 es de 32,7162 días, mientras que la muestra 5 actúa de una forma parecida, sin embargo el valor es de 34,5314 días, siendo este la mejor muestra.

3.10 Análisis Reológicos

Para realizar los análisis reológicos de las muestras de yogures, se utilizó un viscosímetro Evo Expert de la marca Fungilab, al cual se le adaptó un **APM** (Small Sample Adapter) para realizar el trabajo, los datos obtenidos los encontramos en el software Fungilab Data Boss, los mismos que fueron exportados a Excel y finalmente se obtuvieron los datos de las figuras 44-45-46.

3.10.1 Experimento 2

De acuerdo a la figura 7 se puede observar que el producto descrito en la figura 43 tiene un comportamiento plástico ya que se caracteriza por producir una cierta cantidad de energía, cuando estos materiales son sometidos a esfuerzos menores que cierto valor umbral; mientras que con un esfuerzo superior al umbral se deforman continuamente

como un fluido, siendo el esfuerzo una función, lineal o no, de la velocidad de deformación.

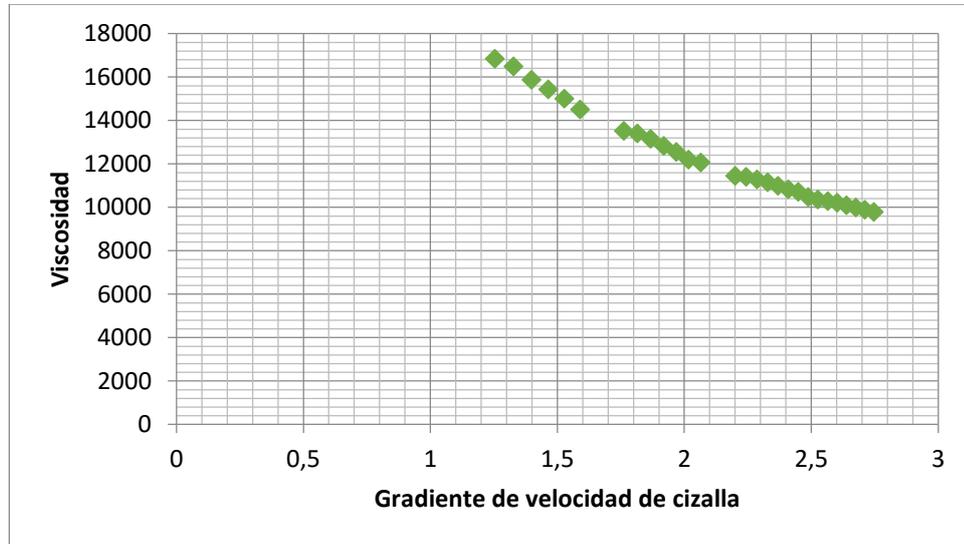


Figura 44: Relación de la Viscosidad con el gradiente de velocidad de cizalla.

3.10.2 Experimento 5

La figura 45 de la misma forma se la puede observar que tiene un comportamiento plástico, para esto se realizó la comparación de las curvas de la figura 7, en la que se observa las curvas de la viscosidad.

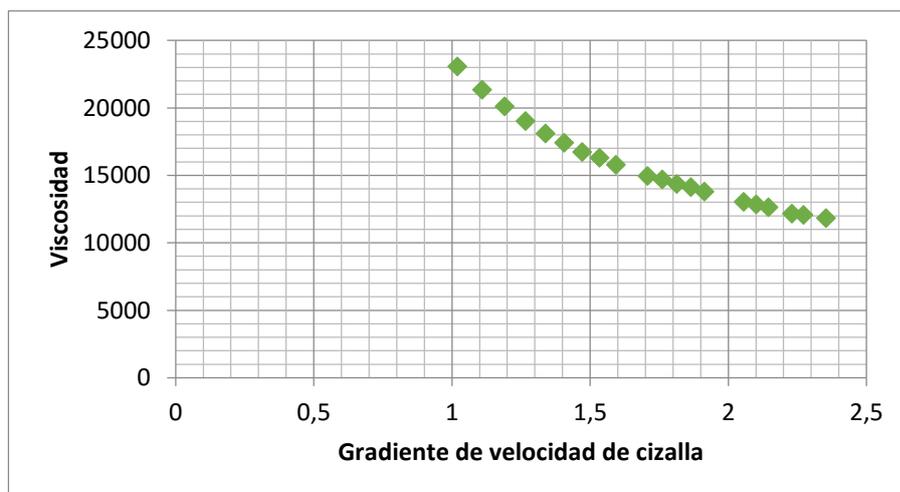


Figura 45: Relación de la Viscosidad con el gradiente de velocidad de cizalla.

3.10.3 Experimento Yogurt batido

En la figura 46 se puede observar que este tipo de producto corresponde a un producto pseudoplastico, el cual se caracteriza por que se ve reducida su viscosidad al aumentar la velocidad de deformación. Para la determinación de este producto se hizo el estudio de comparación con las curvas de la figura 7.

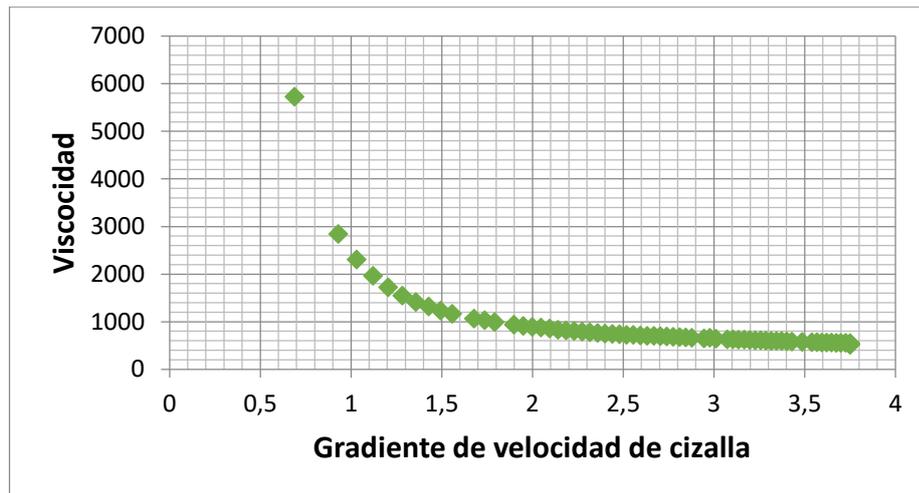


Figura 46: Relación de la Viscosidad con el gradiente de velocidad de cizalla.

3.11 Punto de Equilibrio de Producción Piloto.

Para la elaboración de la formulación estándar por unidad, se hizo el cálculo para 100lts.

FORMULACION ESTANDAR POR UNIDAD

INSUMO	PORCENTAJE	PESO Kg
LECHE	99,32	100
CARRAGENATO	0,15	0,15
CITRATO DE SODIO	0,2	0,2
INULINA	0,3	0,3
FERMENTO MIXO PROBIOTICO	0,03	0,03

VOLUMEN A PREPARAR **100**

COSTO DE PRODUCCION POR UNIDAD POR 1.000g

INSUMO	UNIDAD	CANTIDAD	COSTO MATERIAL PRIMA/Kg	COSTO TOTAL USD
LECHE	Kg	100	0,5	50
CARRAGENATO	Kg	0,15	2	0,3
CITRATO DE SODIO	Kg	0,2	1,5	0,3
INULINA	Kg	0,3	4	1,2
FERMENTO MIXTO PROBIOTICO	Kg	0,03	25	0,75
ENVASE Y TAPA	U	100	0,4	40,00

COSTO TOTAL PRIMO **92,55**

UNIDADES PRODUCIDAS **110**

COSTO PRIMO POR UNIDAD **0,84**

3.12 Punto de Equilibrio de Producción Piloto.

PUNTO EQUILIBRIO

DATOS CONTABLES

Gastos Fijos	\$5.000,00
GASTOS TOTALES DE FABRICACION	\$0,84
PRECIO FACTURACION P.V.D	\$2,00

PUNTO DE EQUILIBRIO

PE EN UNIDADES

4.311

◀ Punto de Equilibrio en número de unidades vendidas (o de ventas efectuadas).

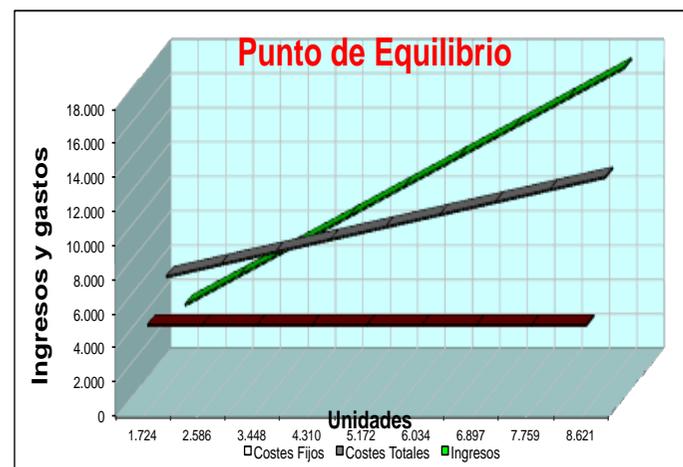
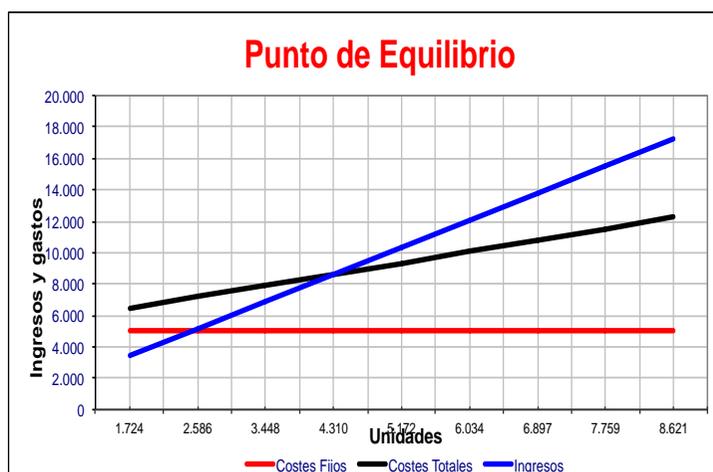
PE TOTAL DE FACTURACION

\$8.622,00

◀ Punto de Equilibrio en unidades monetarias (facturación).

Promedio dia de envase

332



3.13 Discusión.

De acuerdo a las investigaciones previas, se sabe que la lactasa es una enzima que rompe los enlaces disacáridos de la lactosa produciendo glucosa y galactosa, los cuales infieren un sabor más dulce a los productos hidrolizados. En los análisis sensoriales realizados al producto final, en los dos experimentos optimizados elegidos (2 y 5), se determinó que el 93.3% del panel de degustación considera al yogurt como dulce, e igual porcentaje indica que es ácido, por lo que fue catalogado como muy bueno. Al ser un producto hidrolizado, la cantidad de lactosa presente es mínima en relación con un yogurt en el que no hubo este tratamiento previo, por lo tanto este tipo de alimentos tienden a tener un tiempo de almacenamiento más largo, debido a que las rutas metabólicas (la glucosa vía glucólisis y la galactosa por la ruta de Leloir o la ruta de la tagatosa – 6 fosfato) utilizada por las bacterias lácticas no provocan una acidez rápidamente, que es la que produce el deterioro sensorial que no gusta al consumidor. Otro punto interesante, en este estudio fue determinar microbiológicamente el producto se mantiene inocuo hasta más allá del tiempo de vida útil en almacenamiento a 4°C determinada por la normas técnica ecuatoriana que indica que debe ser no más de 30 días, al no encontrarse microorganismos patógenos, así como tampoco hongos y levaduras. Esto se debe en parte al tratamiento térmico previo.

La enzima utilizada para ese estudio, fue una lactasa producida por fermentación sumergida sobre un sustrato vegetal con una cepa seleccionada de la levadura *Kluyveromyces lactis*, que se mantiene condiciones controladas y no está presente en el producto final (CHR Hansen, 2009). Se pudo determinar que el mejor tratamiento de la leche para realizar la hidrólisis de la lactosa es a una temperatura de 85°C por 30 minutos y luego la adición de una dosis de 1.93ml de la enzima lactasa a 38.09°C por 0.5 horas de exposición en el cual se logró una hidrólisis del 99,21%. La temperatura óptima de lactasa, está entre 35 a 45°C, a temperaturas superiores a 50°C la enzima es desnaturalizada (CHR Hansen, 2009). La enzima Ha-Lactase, la temperatura óptima para llegar a obtener un porcentaje de actividad relativa cercana al 100% es de 50°C. Así, en el estudio realizado, se observa que a dicha temperatura se presenta una mejor actividad, considerando que está en función de la cantidad de lactasa aplicada. Pero según el diseño experimental (Tabla 1) y su desarrollo demostró que se podría trabajar a una temperatura hasta de 50°C si se mantiene la temperatura controlada.

A las diferentes temperaturas y tiempo de tratamiento se obtuvieron substratos hidrolizados en buen porcentaje. Además el tiempo de hidrolisis es muy extenso y podría provocar un incremento de la flora de los psicótrofos, llegando a desnaturalizar la proteína o desestabilizarla para los futuros procesos fermentativos. Aunque la enzima a temperaturas de 40°C por 2 horas y 1.25 horas utilizando diferentes dosis se obtienen una buena cantidad de producto hidrolizado, es muy utilizado a nivel industrial para procesos no constantes y fluctúan por determinados factores y este trabajo ha logrado demostrar que es factible de realizarlo en procesos industriales tan complejos como lo es el del control de las curvas de fermentación en leches hidrolizadas fermentadas probióticas.

A un temperatura de 50.2°C por 0.49 horas se obtuvo un hidrolizado de 85.61%, muy buena opción pero con el inconveniente de la temperatura, debido a que se producía un ligero cambio de color por la reacción no enzimática de Maillard y también este tratamiento puede producir también una desnaturalización de proteínas. El resto de tratamientos térmicos previos dieron excelentes resultados en los procesos de hidrolisis, pero la temperatura excesiva, provocaba la reacción de oscurecimiento que se mencionó anteriormente, por lo cual fueron descartados luego.

La norma INEN 701:2009 nos indica que para considerar una leche deslactosada esta debe estar por debajo del 0.7% de lactosa, lo que nos demuestra que el experimento 5 (38,09°C, 1.93ml lactasa y 0.5 horas) es el óptimo y que además cumple con la norma.

Conclusiones.

- Luego de realizar el diseño experimental de respuesta de superficie box Behnken, se logró obtener la mejor hidrólisis de más del 99% con las siguientes características: 38,09°C, 1.93ml lactasa y 0.5 horas, valor que se encuentra dentro de la norma para leches deslactosadas 701:2009, para la determinación de la lactosa se tomó como referencia la norma mexicana (ver anexo1).
- En el diseño de mezclas Simplex Lattice, la mejor mezcla fue la del experimento 10 al tener un mejor crecimiento bacteriano de las cepas probióticas, dando los mejores atributos en el análisis sensorial para esta experimentación, quedando una mezcla de bacterias lácticas: *Bifidum bacterium breve* (66.66%), *Lactobacillus acidophilu*(16.66), *Lactobacillus rhamnosus*(16.66).
- Para la elaboración del yogur se trabajó con el experimento de máxima respuesta de hidrólisis a 38,09°C, 1.93ml lactasa y 0.5 horas, y el diseño de mezclas número 10, y se obtuvo un yogur con características sensoriales aceptadas por el panel de degustación. Se pudo determinar el tiempo de vida útil para el yogur, mediante el análisis de Weibull obteniendo un periodo de 35 días aproximadamente, este valor se encuentra por encima de los valores de un yogur normal que tiene un tiempo de duración de 30 días, cabe recalcar que este tiempo se obtuvo sin haber utilizado ningún preservante.
- Se realizó el análisis de las características reológicas (viscosidad) obteniendo productos con un comportamiento plástico en el caso de los yogures afluados, y para el yogur batido se obtuvo un comportamiento pseudoplástico, ya que pierde fuerza y se vuelve más fluido.

Recomendaciones.

- De acuerdo a las características y los beneficios que brinda este producto a la salud, se recomienda hacer un estudio profundo para confirmar que es apto para personas intolerantes a la lactosa, se recomienda continuar con el estudio a profundidad en cuanto a la reología del producto, con el fin de mejorar sus características organolépticas.
- Se recomienda encontrar un sistema para facilitar la determinación de la lactosa, ya que se presentaron complicaciones en la parte experimental, por no contar con los materiales necesarios.

BIBLIOGRAFIA

ADAMS M R. & Robert Nout M. J., (2001). Fermentation and Food Safety. Aspen Publishers, Inc. Gaithersburg, Maryland

AKALIN A, UNAL G, DINKCI N, HAYALOGLU A (2012) Microstructural, textural, and sensory characteristics of probiotic yogurts fortified with sodium calcium caseinate or whey protein concentrate. J Dairy Sci 95: 3617-3628..

ALAIS CH., (1970). Ciencia de la Leche; Principios de técnicas lecheras. Editorial Continental. 1ª edición en español de la 2ª edición francesa. España

ANZALDÚA – Morales, A. (2005). La evaluación sensorial de los alimentos en al teoría y la práctica. España. Editorial Acribia.

AOAC INTERNATIONAL, Official Methods of Analysis, 16th Ed., 4th Revision, 1998, , Gaithersburg, MD, methods 896.01, 984.15, 930.28 and 972.16.

BACCI, M.; SIQUIERA, C.; ANTONIAZI, S.; VETA, J. (1996) Location of the galactosidase of the yeast *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* ATCC 10022. Antoine Van Leewenhock. 69: 375-361.

BADUI DERGAL, S. (2014). Química de los alimentos (Quinta Edición ed.). México: Pearson.

BADUI, S. (2014) Química de los Alimentos. Addison Wesley Longman de México (Eds.) 648 pp.

BAO, Y; Zhang, Y; Liu, Y; Wang, S; Dong, X; Wang, Y; Zhang, H. (2010). Screening of potential probiotic properties of *Lactobacillus fermentum* isolated from traditional dairy products. Food Control 21(5): 695-701.

BARBOZA, J. VÁZQUEZ, H Y SALCEDO, R. (2009). Probióticos y conservadores naturales en alimentos. Guadalajara: D - Universidad de Guanajuato [Version de ebrary]. Recuperado de <http://site.ebrary.com/lib/uasuaysp/reader.action?docID=10286585&ppg=7>

Fecha de revisión: 15 de abril de 2015

BECERRA, M.; RODRÍGUEZ, E.; CERDÁN, M. (2001). Extraction of intracellular proteins from *Kluyveromyces lactis* Food Technol. Biotechnol 39(2): 135-139.

BISSETT, D, ANDERSON, R. (1974) Lactose and D-galactose metabolism in group N streptococci: presence of enzymes for both the d-galactose 1-phosphate and D-tagatose 6-phosphate pathways. J. Bacteriol. 1974, 117, 318–320. GARCÍA, G.; BOX George, Hunter William, Hunter J. Stuar (2008), Estadística para investigadores: diseño, innovación y descubrimiento, Barcelona: Reverté (1): 1–12.

BURKET C (2012) Simultaneous enzymatic hydrolysis and lactic fermentation to obtain a yogurt with low lactose content. Ciênc Agrotec 36: 551-559.

CABEZÓN P. (2010). Adición De Cepas Lácticas Probióticas En Leche En Polvo 26% MG (Tesis inédita de maestría). Universidad Austral de Chile.

CERNING, J. (1990) Exocellular polysaccharides produced by lactic acid bacteria.

CHR- HANSEN. (2009). Ha – Lactase. Información del producto lactasa líquida. CHR- HANSEN S. A.

CH HANSEN. (2014). Ha-Lactase 5200 product information. Pag 1 recuperado de http://www.hjemmeriet.dk/uploads/dokumenter/PI_GLOB_Ha-Lactase5200_450804_EN.pdf revisado el 20 de abril de 2015

CHASSY, B.; ALPERT, C. (1989) Molecular characterization of the plasmid encoded lactose-PTS of *Lactobacillus casei*. FEMS Microbiol. Rev., 63, 157–166.

COLLADO Amores, M C. (2004). Caracterización De Cepas Del Género *Bifidobacterium* Con Carácter Probiótico (Tesis doctoral). Universidad Politécnica De Valencia.

CORRALES, A. HENDERSON, M. Y MORALES, I. (2009). Sobrevivencia de microorganismos probióticos *Lactobacillus acidophilus* y *Bifidobacterium lactis* en helado batido. Chile: Red Revista Chilena de Nutrición. Recuperado de <http://site.ebrary.com/lib/uasuaysp/reader.action?docID=10294125>

Fecha de revisión: 15 de abril de 2015

CUETO C. y Aragón S. (2012). Evaluación del potencial probiótico de bacterias ácido lácticas para reducir el colesterol in vitro. *Scientia Agropecuaria* 1(2012) 45 – 50

EHRENPREIS E. (1999). Lactose Intolerance: Definition, Clinical Features and Treatment. *Practical Gastroenterology*. Vol.XXIII No.4.

ESCOBAR L. F., Rojas C. A., Giraldo G A. & Padilla L. (2010). Evaluación Del Crecimiento De *Lactobacillus Casei* Y Producción De Ácido Láctico Usando Como Sustrato El Suero De Leche De Vacuno. *Rev. Invest. Univ. Quindío* (20): 42 - 49. Armenia - Colombia

FAO/WHO: Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria. Report of the Joint Food and Agriculture Organization (FAO) of the United Nations/World Health Organization (WHO).2002 Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria. CONWAY. L, GORBACH. S, GOLDIN. B. (1987). "Survival of lactic acid bacteria in the human stomach and adhesion to intestinal cells". *Journal of Dairy Science*. 70

FOX, P; LUCEY, J; COGAN, T. (1990). Glycolysis and related reactions during cheese manufacture and ripening. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr*, 29, 237–253.

FOX. P, MCSWEENEY. P, (2009) Reduced lactose and lactose-free dairy products in *Advances Dairy Chemistry: Lactose, water, salts and minor constituents*. (3rd edn), Springer, United States.

FOX. P, MCSWEENEY. P, (2011) *Bovine milk: Encyclopedia of Dairy Science*. (2nd edn), Academic Press, London.

FOX. P, MCSWEENEY. P, (2009) Lactose malabsorption: *Advances dairy chemistry, Lactose, water, salts and minor constituents*. (3rd edn), Springer, USA.

FUQUAY F, FOX P, MCSWEENEY P (2011) Health effects of fermented milks: *Encyclopedia of Dairy Science*. (2nd edn), Academic Press, London FUQUAY. J,

FUQUAY. J, FOX. P, MCSWEENEY. P, (2011) Enzymes exogenous to milk in dairy technology, b-D-Galactosidase: *Encyclopedia of Dairy Science*. (2nd edn), Academic Press, London.

GARCÍA C A., Arrázola G. S, Durango Alba M. (2010). Producción De Ácido Láctico Por Vía Biotecnológica. Temas Agrarios - Vol. 15:(2) Julio - Diciembre (9 - 26)

GARATE Rodolfo, (2014), Cambios en las propiedades reológicas y en el rendimiento de extracción de materia grasa de la palta durante su maduración en condiciones refrigeradas y de ambiente, Chile, pág. 8-9-10.

GOMEZ María, (2008), Obtencion de piezas de Sic por inmersión de proformas de Si en lechos carbonosos, España, pág. 45-46.

GONCALVES J Y CASTILLO F. 1982 Partial Purification and Characterization of β -D-galactosidase from *Kluyveromyces marxianus*. J. Dairy Sci.; 65(9):2088-2094.

GOTTSCHALK, G. (1986). Bacterial Metabolism; Springer-Verlag: New York.

GUO, X. H.; Kim, J. M.; Nam, H. M.; Park, S.Y. (2010). Screening lactic acid bacteria from swine origins for multistrain probiotics based on in vitro functional properties. Anaerobe 16(4): 321-326.

HICKEY, M; HILLIER, A; JAGO, G. (1986) Transport and metabolism of lactose, glucose and galactose in homofermentative lactobacilli. Appl. Environ. Microbiol. 51, 825–831.

HILTON E., RINDOS P. Y ISENBERG H, D. 1995. Lactobacillus GG vaginal suppositories and vaginitis. Journal of Clinical Microbiology. 33: 1433.

HOOVER, D. (1993). Bifidobacteria: activity and potential benefits. Food Technology.

INESTROZA CÓRDOBA, L. I., & LÓPEZ MALO, A. (2008). Productos lácteos fermentados como vehículo para microorganismos probióticos. Temas selectos de Ingeniería de Alimentos 2, 50-57.

JAY, J. M., LOESSNER, M. J., & GOLDEN, D. A. (2009). Microbiología moderna de los alimentos. Málaga, España: Acribia S.A.

KANDLER, O. (1983). Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. Antonie van Leeuwenhoek, 49, 209–224.

KANDLER, O.; WEISS, N. (1986) Regular, non-sporing gram-positive rods. In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Sneath, P.H.A., Mair, N.S., Sharpe, M.E., Holt, J.G., Eds.; Williams and Wilkins Co.: Baltimore, Vol. 2, 1208–1234.

KILCAST. D. Subramaniam. P. 2000. The stability and Shelf life of food. América del Norte y del Sur. CRC, Press.

KONINGS, W.N. 2002. The cell membrane and the struggle for life of lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 82:3–27.

KAUR N, Gupta Ak. (2002). Applications of inulin and oligofructose in health and nutrition. *Journal of Biosciences* 27(7):703-714

KOLIDA S, Gibson Gr. (2007). Prebiotic capacity of inulin-type fructans. *Journal of Nutrition* 137(11 Suppl):2503S-2506S

KOUAOUCI, R. (2007). Analytical Methods for Lactose Quantification in Milk and Milk Products. Canada. IDF International Symposium Lactose and its Derivatives.

LABUZA.T.P. 1982. Envases y Embalajes de Materiales Plásticos.España. IATA-CSIC.

LANGLANDS Sj, Hopkins Mj, Coleman N Y Cummings Jh. (2004). Prebiotic carbohydrates modify the mucosa associated microflora of the human large bowel. *Gut* 53 (11): 1610-1616.

LLAMOSAS J. (2011). Principios bioactivos de la leche. División Alimentos Corporación Gloria

MARTINS A, MONTEIRO R, FERNANDES DE MEDEIROS BURKET J, VEIGA MATHEWS, C.K., Van Holden, K.E., Ahern, K. G. (2002). Bioquímica. España, Pearson Educación.

MIZRAHI. S. 2000. Accelerated shelf life tests. En Kilcast. D. Subramaniam. P. The stability and Shelf life of food. América del Norte y del Sur. CRC, Press.

MLICHOVÁ. Z, ROSENBERG. M (2006) Current trends of beta-galactosidase application in food technology. *J Food Nutr Res* 45: 47-54.

MOGROVEJO K., Urgiles G. (2009). Optimización de las condiciones de hidrólisis utilizando b-galactosidasa inmovilizada por atrapamiento y determinación de lactosa residual (Tesis de pregrado). Universidad del Azuay.

MOLINA M. (2008). Efecto probiótico de *Lactobacillus acidophilus* y *Bacillus subtilis* en cuyes (*Cavia porcellus*) de engorde. (Tesis) Escuela Politecnica del ejército. Sangolqui MORALES, (nd). Vida útil de alimentos. Consultado el 18 de Noviembre de 2013.
<http://www.cita.ucr.ac.cr/Alimentica/EdicionesAnteriores/Volumen%206,2009/Articulo/Vida%20Util.pdf>.

MOZZI Fernanda, Raya Raúl R., Vignolo Graciela M. (2010). *Biotechnology of Lactic Acid Bacteria Novel Applications*. Blackwell Publishing.

MUNDO LÁCTEO Y CÁRNICO. (2013). Probióticos en productos lácteos fermentados. 4-11. Recuperado el 17 de abril de 2015

NEOGEN (2011) *Lactobacilli – MRS Broth*. Acumedia.

NINESS Kr. (1999) Inulin and Oligofructose: What Are They? *Journal of Nutrition* 129 (7): 1402S-1406S.

NORMA NMX-F-219-1972 Determinación de Lactosa en Leche

NORMA INEN 09:2012 Características de leche cruda Físico-Químicas y Microbiológicas.

NORMA INEN 2395:2011 Leche Acidófilas Características Físico- Químicas y Microbiológicas.

NUÑEZ Margarita, 2011, *La vida útil de los alimentos, métodos de estimación*, Cuba.

PANIAGUA H. (2008). *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.

POCHART P, DEWIT O, DESJEUX J, BOURLIOUX P (1989) Viable starter culture, beta-galactosidase activity, and lactose in duodenum after yogurt ingestion in lactase-deficient humans. *Am J Clin Nutr* 49: 828-831.

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

POOLMAN, B. (1993) Biochemistry and molecular biology of galactoside transport and metabolism in lactic acid bacteria. *Lait*, 73, 87–96.

QUINTERO, R.; LÓPEZ, M. (1998) *Biotecnología Alimentaria*. 1ª Ed. Limusa, México 636 pp

RAMÍREZ MATHEUS, A. O., & RIVAS, N. (Junio de 2003). Producción y caracterización parcial de β -galactosidasa de *Kluyveromyces lactis* propagada en suero de leche desproteínizado. Scielo. Recuperado el 21 de Abril de 2015, de http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-06222003000200012

ROBERFROID M. (2005). Introducing inulin-type fructans. *British Journal of Nutrition* 93 (Suppl 1): S13-25.

RODRÍGUEZ M. 2009. Aislamiento y selección de cepas de genero *Lactobacillus* con capacidad probiótica e inmunomoduladora. (Tesis doctoral) Departament de genética y microbiologia Universitat Autònoma de Barcelona. Recuperado de:

Fecha de revisión: 1 de abril de 2015

RODRÍGUEZ, D. Y PÉREZ, L. (2006). Información al paciente. España: Revista Española de enfermedades digestivas. Recuperado de <http://scielo.isciii.es/pdf/diges/v98n2/paciente.pdf>

Fecha de revisión: 15 de abril de 2015

ROY, D. (2005). Technological aspects related to the use of bifidobacteria in dairy products. *Lait* (85) 39-56

SALMINEN. S, WRIGHT. A, OUWEHAND, A. (2004) *Lactic Acid Bacteria Microbiological and Functional Aspects*, Third Edition Marcel Dekker Inc.

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

SERRA, M.; Trujillo, A.J.; Pereda, J.; Guamis, B. Y Ferragut, V. (2008). Quantification of lipolysis and lipid oxidation during cold storage of yogurts produced from milk treated by ultra-high pressure homogenization. *Journal of Food Engineering*, 89(1), 99–104

SHAUKAT A, LEVITT M, TAYLOR B, MACDONALD R, SHAMLIYAN T, et al. (2010) Systematic review: effective management strategies for lactose intolerance. *Ann Intern Med* 152: 797-803.

SJOBERG, A.; HAHN-HÄGERDAHL, B. (1989) b-Glucose-1-phosphate, a possible mediator for polysaccharide formation in maltose-assimilating *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* , 55, 1549–1554.

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

TAMIME A, ROBINSON R (2007) *Tamime and Robinson's Yoghurt, Science and Technology*. (3rd edn), CRC Press, USA.

THOMAS, T; TURNER, K; CROW, V. (1980) Galactose fermentation by *Streptococcus lactis* and *Streptococcus cremoris*: pathways, products and regulation. *J. Bacteriol.*, 144, 672–682.

THOMPSON, J. (1979). Lactose metabolism in *Streptococcus lactis*: phosphorylation of galactose and glucose moieties in vivo. *J. Bacteriol.*, 140, 774-785.

THOMPSON, J.; CHASSY, B.M. (1981) Uptake and metabolism of sucrose by *Streptococcus lactis*. *J. Bacteriol.*, 147, 543–551.

THOMPSON, J. (1988) Lactic acid bacteria: model systems for in vivo studies of sugar transport and metabolism in gram-positive organisms. *Biochimie*, 70, 325–336.

WALSTRA, 2001. *Ciencia de la leche y tecnología de los productos lácteos*. Acribia. S.A

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

YILDIZ (2010) Probiotic dairy beverages: microbiology and technology: Development and manufacture of yogurt and other functional dairy products. CRC Press, USA.

ZAMBRANO, P. 1997 Producción de proteína unicelular a partir de suero desproteinizado. Trabajo de Grado. Facultad de Agronomía – UCV.

ZHOU, Q.; CHEN, X.; LI, X. (2003) Kinetics of lactose hydrolysis by β galactosidase of *Kluyveromyces lactis* immobilized on cotton fabric. *Biotechnol. and Bioenginn.* 81 (2): 127-133.

ANEXOS

ANEXO 1: NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-155-SCFI-2003

DERMINACIÓN DE REDUCTORES DIRECTOS (LACTOSA).

8.11 Determinación de reductores directos (Lactosa)

8.11.1 Fundamento

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

8.11.2 Reactivos y materiales

8.11.2.1 Reactivos

- Acetato de zinc
- Acido acético glacial
- Ferrocianuro de potasio
- Sulfato de cobre pentahidratado
- Tiosulfato de sodio
- Yoduro de potasio
- Tartrato de sodio y potasio
- Hidróxido de sodio
- Azul de metileno
- Lactosa anhidra pura
- Acido benzoico

8.11.2.1.1 Preparación de soluciones

Solución de acetato de zinc. Disolver 21,9 g de acetato de zinc (Cristalino) y 3 mL de ácido acético glacial en agua y diluir a 100 mL.

Solución de ferrocianuro de potasio. Disolver 10,6 g de ferrocianuro de potasio en 100 mL de agua destilada.

Solución (A) de sulfato de cobre. Disolver 34,639 g de sulfato de cobre pentahidratado en agua destilada y diluir a 500 mL, utilizando un matraz volumétrico de 500 mL; filtrar a través de papel filtro whatman número 4 o equivalente. Ajustar la solución determinando el contenido de cobre en una alícuota con tiosulfato de sodio 0,1 N y yoduro de potasio al 20% hasta obtener 440,0 mg de cobre por cada 25 mL.

Solución (B) de tartrato de sodio y potasio. Disolver 173 g de tartrato de sodio y potasio y 50 g de hidróxido de sodio en agua y diluir a 500 mL; dejar reposar 2 días y filtrar a través de papel filtro whatman número 4 o equivalente.

Solución acuosa de azul de metileno al 0,2%. Disolver 0.2 g de azul de metileno en 100 mL de agua.

Solución patrón de lactosa. Disolver 10 g de lactosa anhidra pura y diluir a 1 litro con solución acuosa al 0,2% de ácido benzoico.

Titulación de la solución A+B. Medir con una pipeta volumétrica 5 mL de la solución A y 5 mL de la solución B en un matraz Erlenmeyer de 500 mL. Agregar 100 mL de agua, unos cuerpos de ebullición y calentar en parrilla cerrada a ebullición; agregar poco a poco con una bureta, solución patrón de lactosa hasta la casi reducción total del cobre. Añadir 1 mL de azul de metileno y continuar la titulación hasta la desaparición del color azul. Calcular los miligramos de lactosa que se necesitan para titular la solución A+B. Este valor corresponde al factor (F) del reactivo.

8.11.2.2 Materiales

- Matraz volumétrico de 250 mL.
- Matraz Erlenmeyer de 250 mL.
- Matraz Erlenmeyer de 500 mL.
- Pipetas volumétricas de 5 mL.
- Pipetas graduadas de 5 mL.
- Bureta de 50 mL graduada en décimas.
- Placa caliente.
- Balanza analítica con sensibilidad de 0,1 mg.

8.11.3 Procedimiento

Pesar 10 g a 12 g de muestra homogénea en un vaso de precipitados de 50 mL, transferir cuantitativamente con 200 mL de agua destilada caliente (40°C a 50°C) a un matraz volumétrico de 250 mL, mezclar y dejar reposar 30 min. Agregar 4 mL de la solución de ferrocianuro de potasio y 4 mL de acetato de zinc, mezclar. Aforar y filtrar.

Medir con una pipeta volumétrica 5 mL de la solución A y 5 mL de la solución B en un matraz Erlenmeyer de 500 mL. Agregar 100 mL de agua, unos cuerpos de ebullición y calentar en parrilla cerrada a ebullición; agregar poco a poco con una bureta, el filtrado obtenido de la muestra, hasta la casi reducción total del cobre. Añadir 1 mL de azul de metileno y continuar la titulación hasta la desaparición del color azul.

8.11.4 Cálculos y expresión de resultados

La concentración de lactosa contenida en la muestra, expresada en porcentaje, se calcula con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de Reductores directos en lactosa} = \frac{250/V(100)(F)}{M}$$

donde:

V son los mililitros gastados de la muestra para titular la solución A + B.

M es el peso de la muestra.

F es el factor del reactivo de Fehling, en gramos de lactosa.

ANEXO 2: FICHA TÉCNICA PARA LECHE CRUDA



INSTITUTO ECUATORIANO DE NORMALIZACIÓN

Quito - Ecuador

NORMA TÉCNICA ECUATORIANA

NTE INEN 9:2012
Quinta revisión

LECHE CRUDA. REQUISITOS.

Primera Edición

RAW MILK. REQUIREMENTS.

First Edition

DESCRIPTORES: Tecnología de los alimentos, leche y productos lácteos, leche cruda, requisitos
AL: 63.01-401
CCLC: 637.133.4
CNU: 3112
ICS: 67.100.01

4.5 Los límites máximos de residuos de medicamentos veterinarios para la leche serán los que determine el Codex Alimentario CACMRL 2.

5. REQUISITOS

5.1 Requisitos específicos

5.1.1 Requisitos organolépticos (ver nota 1)

5.1.1.1 **Color.** Debe ser blanco opalescente o ligeramente amarillento.

5.1.1.2 **Olor.** Debe ser suave, lácteo característico, libre de olores extraños.

5.1.1.3 **Aspecto.** Debe ser homogéneo, libre de materias extrañas.

5.1.2 Requisitos físicos y químicos

5.1.2.1 La leche cruda, debe cumplir con los requisitos fisico-químicos que se indican en la tabla 1.

TABLA 1. Requisitos fisicoquímicos de la leche cruda.

REQUISITOS	UNIDAD	MIN.	MAX.	METODO DE ENSAYO
Densidad relativa: a 15 °C A 20 °C	-	1,029 1,028	1,033 1,032	NTE INEN 11
Materia grasa	% (fracción de masa) ⁴	3,0	-	NTE INEN 12
Acidez titulable como ácido láctico	% (fracción de masa)	0,13	0,17	NTE INEN 13
Sólidos totales	% (fracción de masa)	11,2	-	NTE INEN 14
Sólidos no grasos	% (fracción de masa)	8,2	-	-
Cenizas	% (fracción de masa)	0,85	-	NTE INEN 14
Punto de congelación (punto crioscópico) **	°C °F	-0,538 -0,555	-0,512 -0,530	NTE INEN 15
Proteínas	% (fracción de masa)	2,9	-	NTE INEN 18
Ensayo de reductasa (azul de metileno) ^{***}	h	3	-	NTE INEN 018
Reacción de estabilidad proteica (prueba de alcohol)	Para leche destinada a pasteurización: No se coagulará por la adición de un volumen igual de alcohol neutro de 68 % en peso o 75 % en volumen; y para la leche destinada a ultrapasteurización: No se coagulará por la adición de un volumen igual de alcohol neutro de 71 % en peso o 78 % en volumen			NTE INEN 1500
Presencia de conservantes ¹⁾	-	Negativo		NTE INEN 1500
Presencia de neutralizantes ²⁾	-	Negativo		NTE INEN 1500
Presencia de adulterantes ³⁾	-	Negativo		NTE INEN 1500
Grasas vegetales	-	Negativo		NTE INEN 1500
Suero de Leche	-	Negativo		NTE INEN 2401
Prueba de Brucelosis	-	Negativo		Prueba de anillo PAL (Ring Test)
RESIDUOS DE MEDICAMENTOS VETERINARIOS ⁴⁾	ug/l	---	MRL, establecidos en el CODEX Alimentarius CACMRL 2	Los establecidos en el compendio de métodos de análisis identificados como ómnibus para respaldar los LMR del codex ⁵⁾

¹⁾ Diferencia entre el contenido de sólidos totales y el contenido de grasa.

²⁾ °C: °F - 32, donde la 0,9556

³⁾ Aplicable a la leche cruda antes de ser sometida a tratamiento

⁴⁾ Conservantes: formaldehído, peróxido de hidrógeno, cloro, hipocloritos, cloraminas, lactoperoxidas adicionada y dióxido de cloro.

⁵⁾ Neutralizantes: orina, carbonatos, hidróxido de sodio, jabones.

⁶⁾ Adulterantes: Harina y almidones, soluciones azucaradas o soluciones salinas, colorantes, leche en polvo, suero de leche, grasas vegetales.

⁷⁾ Fracción de masa de S, W₂: Esta cantidad se expresa frecuentemente en por ciento, %. La notación "% (m/m)" no deberá usarse.

⁸⁾ Se refiere a aquellos medicamentos veterinarios aprobados para uso en ganado de producción lechera.

⁹⁾ Establecidos por el comité del Codex sobre residuos de medicamentos veterinarios en los alimentos

NOTA 1. Se podrán presentar variaciones en estas características, en función de la raza, estación climática o alimentación, pero estas no deben afectar significativamente las características sensoriales indicadas.

5.1.3 **Contaminantes.** El límite máximo para contaminantes es el que se indica en la tabla 2.

TABLA 2. Límites máximo para contaminantes

Requisito	Límite máximo (LM)	Método de ensayo
Plomo, mg/kg	0,02	ISO/TS 6733
Aflatoxina M1, µg/kg	0,5	ISO 14674

5.1.4 **Requisitos microbiológicos.** La leche cruda debe cumplir con los requisitos especificados en la tabla 3.

TABLA 3. Requisitos microbiológicos de la leche cruda tomada en hato

Requisito	Límite máximo	Método de ensayo
Recuento de microorganismos aeróbicos mesófilos REP, UFC/cm ³	$1,5 \times 10^6$	NTE INEN 1529:5
Recuento de células somáticas/cm ³	$7,0 \times 10^6$	AOAC – 978.28

5.2 **Requisitos complementarios.** El almacenamiento, envasado y transporte de la leche cruda debe realizarse de acuerdo a lo que señala el Reglamento de leche y productos lácteos del Ministerio de Salud Pública.

6. INSPECCIÓN

6.1 **Muestreo.** El muestreo debe realizarse de acuerdo con la NTE INEN 4.

6.2 **Aceptación o rechazo.** Se acepta el producto si cumple con los requisitos indicados en esta norma, caso contrario se rechaza.

ANEXO 3: FICHA TÉCNICA DE FERMENTO ABY-3

		FD-DVS ABY-3			
		Product Information			
Description	Thermophilic Lactic Culture. Defined mixed strain culture containing LA-5™ <i>Lactobacillus acidophilus</i> , BB-12™ <i>Bifidobacterium</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i> and <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> . 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: <ul style="list-style-type: none"> • 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.				

ANEXO 4: FICHA TÉCNICA DE NORMA ECUATORIANA PARA LECHE
LARGA VIDA.

INSTITUTO ECUATORIANO DE NORMALIZACIÓN

Quito • Ecuador

NORMA TÉCNICA ECUATORIANA

NTE INEN 701:2009
Segunda revisión

LECHE LARGA VIDA. REQUISITOS.

Primera Edición

LONG LIFE MILK. REQUIREMENTS.

First Edition

DESCRIPCIÓN: Tecnología de los alimentos, leche y productos lácteos procesados, leche larga vida, requisitos.
AL 03.01-424
CDD: 637.133.4
CIIU: 3112
ICS: 67.100.10

NTE INEN 701

2009-03

TABLA 1. Requisitos físicos y químicos de la leche esterilizada de larga vida

REQUISITOS	UNIDAD	ENTERA		SEMIDESCREMADA		DESCREMADA		MÉTODO DE ENSAYO
		Min.	Máx.	Min.	Máx.	Min.	Máx.	
Densidad Relativa								
a 20°C	-	1,028	1,031	1,029	1,032	1,030	1,033	NTE INEN 11
a 15 °C	-	1,029	1,032	1,030	1,033	1,033	1,034	
Ácido titulable (NaOH 0,1N) Expresado como ácido láctico	%(m/v)	0,13**	0,16	0,14	0,17	0,14	0,17	NTE INEN 13
Contenido de grasa	%(m/m)	3,0	-	≥ 1,0	< 3,0	-	< 1,0	NTE INEN 12
Sólidos totales	%(m/m)	11,30	-	8,20	-	8,30	-	NTE INEN 14
Sólidos no grasos	%(m/m)	8,30	-	8,20	-	8,20	-	*
Cenizas	%(m/m)	0,65	0,80	0,70	0,80	0,70	0,80	NTE INEN 14
Proteína	%(m/m)	2,9	-	2,9	-	2,9	-	NTE INEN 16
Punto de congelación (coloscópico)***	°C	-0,540	-0,512	-0,540	-0,512	-0,540	-0,512	NTE INEN 15
	°H	-0,560	-0,530	-0,560	-0,530	-0,560	-0,530	
PH a 20 °C	-	6,4	6,8	6,4	6,8	6,4	6,8	--
Presencia de conservantes ¹⁾	-	Negativo		Negativo		Negativo		NTE INEN 1 500
Presencia de Neutralizantes ²⁾	-	Negativo		Negativo		Negativo		NTE INEN 1 500
Presencia de adulterantes ³⁾	-	Negativo		Negativo		Negativo		NTE INEN 1 500
Grasa Vegetal	-	Negativo		Negativo		Negativo		NTE INEN 1 500
Suero de Leche	-	Negativo		Negativo		Negativo		NTE INEN 2 401
Cuando el producto haya sido reducido en su contenido de lactosa								
Lactosa en el producto parcialmente deslactosado	%(m/m)	-	1,4	-	1,4	-	1,4	AOAC 984.15 15 Edic. Vol. 2
Lactosa en el producto bajo en lactosa	%(m/m)	-	0,7	-	0,7	-	0,7	AOAC 984.15 15 Edic. Vol. 2
¹⁾ Conservantes: Formaldehído, peróxido de hidrógeno, cloro, hipocloritos, cloraminas y dióxido de cloro. ²⁾ Neutralizantes: Orina bovina, carbonatos, hidróxido de sodio, jabones ³⁾ Adulterantes: Harina y almidones, soluciones azucaradas o soluciones salinas, colorantes * Por diferencia entre sólidos totales y sólidos grasos. ** Prueba de identificación de neutralizantes, NTE INEN 1 500. *** °C = °H x f, donde f= 0,965.								

ANEXO 5: FICHA TÉCNICA DE NORMA ECUATORIANA PARA LECHES
FERMENTADAS



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: 687.146
CIU: 3112
ICS: 67.100.01

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 18
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⁾	Negativo		Negativo		Negativo		NTE INEN 1500
Grasa Vegetal	Negativo		Negativo		Negativo		NTE INEN 1500
Suero de Leche	Negativo		Negativo		Negativo		NTE INEN 2401

¹⁾ 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 específico (*Lactobacillus delbruekii* 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 <i>E. coli</i> , 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 tomarán 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)

ANEXO 6: 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
<i>Lactobacillus casei</i> ATCC® 393	10 - 300	Growth
<i>Lactobacillus fermentum</i> ATCC® 9338	10 - 300	Growth
<i>Lactobacillus plantarum</i> 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. Spittstoesser (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. Tenover, and R. H. Tenover (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 7: FICHA DE CATACIÓN

FICHA DE CATA

YOGUR					
NOMBRE:		Fecha:	Nº de muestra		
Señale con una X la calificación de acuerdo a los valores a considerar					
NOMENCLATURA					
1	MALO				
2	REGULAR				
3	BUENO				
4	MUY BUENO				
Análisis y calificación organoléptica.					
FACTOR VISUAL					
Características		Calificación			
		1	2	3	4
Homogéneo					
Fluido					
Presenta Sinéresis					
Observaciones:					
FACTOR OLFATIVO					
Características		Calificación			
		1	2	3	4
Agradable					
Propio					
Frutal					
Acido					
Observaciones:					
FACTOR GUSTATIVO					
Características		Calificación			
		1	2	3	4
Dulce					
Acido					
Amargo					
Salado					
Picante					
Observaciones:					

ANEXO 8: IMÁGENES

ENZIMA LACTASA



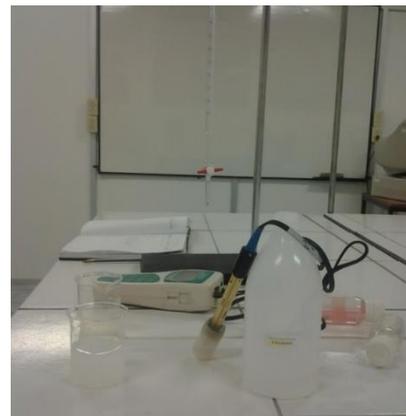
CRIOSCOPIO



INCUBADORA



POTENCIÓMETRO



CÁMARA CLIMATIZADA BINDER



MUESTRAS EN LA CAMARA



PROCESO PARA CUANTIFICACIÓN DE LA LACTOSA

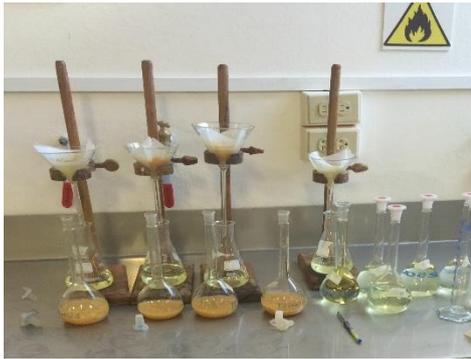
LECHE HIDROLIZADA



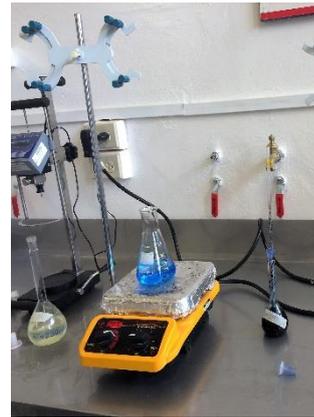
ADICIÓN DE REACTIVOS



FILTRADO



SOLUCIÓN A Y B



REDUCCIÓN DE COBRE



REDUCCIÓN FINAL DEL COBRE



MUESTRAS DE YOGUR



YOGURT AFLANADO



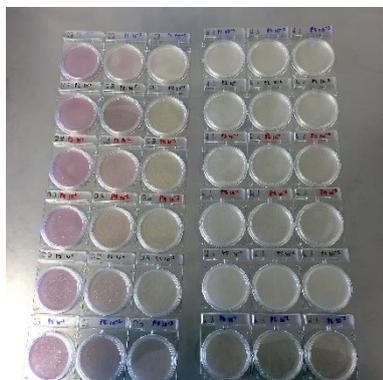
VISCOSÍMETRO



SIEMBRA DE MUESTRAS



RESULTADO DE LAS SIEMBRAS SEMANALES

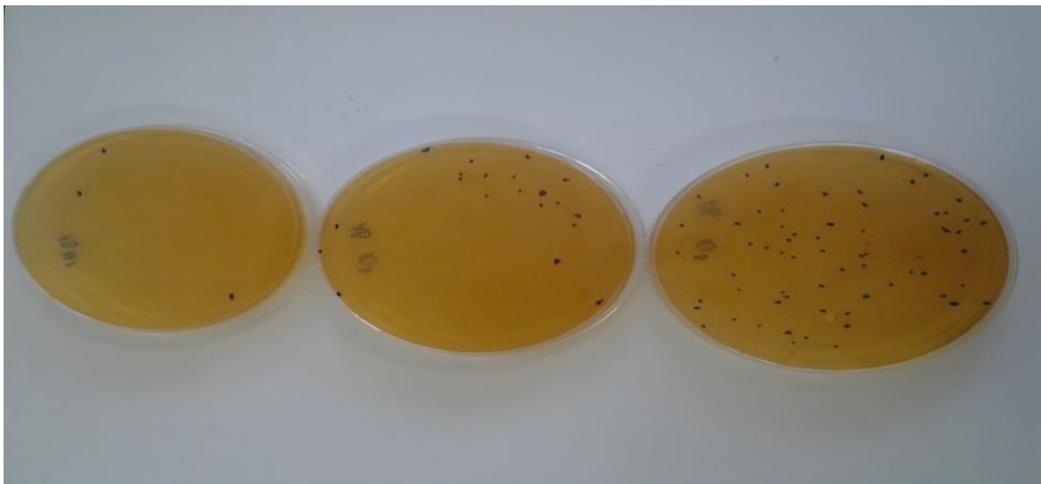


FALLOS PRESENTADOS





COLONIAS DE *LACTOBACILLOS ACIDOPHILUS* EN AGAR MRS



ANEXO 9: FICHAS TÉCNICAS COMPACT DRY ECOLI/COLIFORMES, MOHOS Y LEVADURAS

Compact Dry EC



Es una placa cromogenica lista para usar para la detección de coliformes y e. coli El medio contiene dos sustratos enzimáticos cromógenos: Magenta-GAL y X-Gluc. De esta manera los coliformes desarrollan una coloración roja, mientras que la de los *E.coli* es azul.

Preparación de las muestras
Cantidad de gérmenes vivos en el agua o en alimentos líquidos
 Aplique 1 ml de la muestra (dilúyala en caso necesario) en el centro de la placa Compact Dry.

Cantidad de gérmenes vivos en alimentos sólidos
 Agregue una solución búfer a la prueba y homogenice en el Stomacher®. Aplique 1 ml de la muestra (dilúyala en caso necesario) en el centro de la lámina seca de la placa Compact Dry.

Cantidad de gérmenes vivos en la muestra de la prueba de hisopo
 Frota la superficie con el hisopo estéril y húmedo y colóquelo de nuevo en el dispositivo con la solución de absorción. Después de agitarla, aplique toda la solución (1 ml) en el centro de la placa.

Instrucciones para la realización del ensayo
 1. Abra la cubierta y deje caer una gota de la muestra sobre la parte central de la placa Compact Dry.
 2. La muestra se dispersa automáticamente y homogéneamente sobre la lámina, y transforma la lámina seca en un gel en pocos segundos.
 3. Vuelva a colocar la cubierta sobre la placa y anote la información necesaria en la sección de memorando.
 4. Gire la placa cerrada y colóquela en la incubadora.
 5. Después de la incubación, cuente el número de colonias coloreadas en la parte posterior de la placa. El papel blanco colocado debajo de la placa le ayudará a contar las colonias.

Tiempo de incubación 24 ± 2 horas
Temperatura de incubación 35 ± 2 ° C

Interpretación de los resultados
 Las colonias que crecen denotan una coloración roja para coliformes, mientras que la de los *e.coli* es azul. Sumando las colonias rojas y azules resulta la cifra total del grupo

Coliformes.

Conservación y vida en almacenaje
 Consérvese a temperatura ambiente (+1 a +30 ° C).
 Vida en almacenaje total después de la fabricación: 24 meses.

Notas

- *E.coli* 0157 forma colonias rosa/rojo púrpura.
- Las altas concentraciones en las placas hacen que toda el área de crecimiento se vuelva blanca/rosa. En este caso, diluya la muestra.
- Después del uso, tenga en cuenta las regulaciones vigentes sobre la eliminación de residuos.
- El área de crecimiento es de 20 cm². En la parte posterior de la placa hay una cuadrícula de 1 cm. x 1 cm. gravada para facilitar el recuento de las colonias. Si tiene dificultades en contar las colonias debido a que existe un gran número de ellas, el recuento total de gérmenes vivos se puede obtener multiplicando por 20 el número promedio de colonias por cuadrícula de varias cuadrículas.
- Las placas Compact Dry se producen en una ubicación certificada según ISO 9001/ISO 13485: 2003.

• AOAC approved; certificate No. 110402
 • MicroVal approval No.0806-005LR/ISO 4832 (2006)
 • ISO EN 16140:2003
 • Nordval approval No. 036

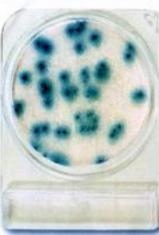
ITEM	ESPECIFICACION	OBSERVACIONES
Apariencia	Hoja de amarillo claro. No presenta partículas	Control visual
pH	6.8 – 7.2	Medida con pHmetro
Pérdida por desecación	Menor al 10%	Control visual
Prueba de esterilidad	No hay crecimiento de colonias si se incuban a 30C por 5 días	Control visual
Rendimiento	Las siguientes cepas de prueba se inocularon y se incubaron a 35 ° C durante 20-24horas. debe observarse buen crecimiento de: <i>Escherichia coli</i> ATCC 8739 (blue/green colony) <i>Alteobacteria oxytoca</i> ATCC 13182 (blue/green colony) <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027 (white colony)	Control Visual
a) Prueba de crecimiento		
b) Prueba de inhibición	Las siguientes cepas de prueba se inocularon y se incubaron a 35 C durante 20-24horas. no debe observarse crecimiento de: <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633 <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	



ventas@apracom-ec.com



Compact Dry YM



Es una placa cromogenica lista para usar para la detección de hongos y mohos Sobre los sustratos cromógenos de las placas Compact Dry YM, las levaduras y los mohos manifiestan diferentes reacciones cromáticas y son por tanto sumamente fáciles de distinguir. el sustrato cromógeno X-Phos provoca una coloración azul en prácticamente todas las levaduras. El crecimiento bacteriano se inhibe mediante antibióticos. Gracias a la cavidad de las placas Compact Dry los mohos desarrollan su forma tridimensional característica en distintos colores

Tratamiento previo de las muestras
Cantidad de gérmenes vivos en el agua o en alimentos líquidos
 Aplique 1 ml de la muestra (dilúyala en caso necesario) en el centro de la placa Compact Dry.

Cantidad de gérmenes vivos en alimentos sólidos
 Agregue una solución búfer a la prueba y homogenice en el Stomacher®. Aplique 1 ml de la muestra (dilúyala en caso necesario) en el centro de la lámina seca de la placa Compact Dry.

Cantidad de gérmenes vivos en la muestra de la prueba de hisopo
 Frota la superficie con el hisopo y colóquelo en el dispositivo con la solución de absorción. Aplique 1 ml de la solución de absorción (dilúyala en caso necesario) en el centro de la placa Compact Dry.

Instrucciones para la prueba
 1. Abra la cubierta y deje caer una gota de la muestra sobre la parte central de la placa Compact Dry.
 2. La muestra se dispersa automáticamente y homogéneamente sobre la lámina, y transforma la lámina seca en un gel en pocos segundos.
 3. Vuelva a colocar la cubierta sobre la placa y anote la información necesaria en la sección de memorando.
 4. Gire la placa cerrada y colóquela en la incubadora.
 5. Después de la incubación, cuente el número de colonias coloreadas en la parte posterior de la placa. El papel blanco colocado debajo de la placa le ayudará a contar las colonias.

Tiempo de incubación 3 a 7 días
Temperatura de incubación 25 a 30 ° C

También puede utilizar el tiempo/temperatura de incubación recomendados en las reglamentaciones nacionales para el recuento de gérmenes vivos de hongos y mohos.

Conservación y vida en almacenaje
 Consérvese a temperatura ambiente (+1 a +30 ° C).
 Vida en almacenaje total después de la fabricación: 18 meses.

Notas

- Algunos hongos no forman colonias azules.
- Los antibióticos que se encuentren en los medios inhiben el crecimiento de las bacterias.
- Las altas concentraciones en las placas hacen que toda el área de crecimiento se vuelva azul/verde. En este caso, diluya la muestra.
- Después del uso, tenga en cuenta las regulaciones vigentes sobre la eliminación de residuos.
- El área de crecimiento es de 20 cm². En la parte posterior de la placa hay una cuadrícula de 1 cm. x 1 cm. gravada para facilitar el recuento de las colonias. Si tiene dificultades en contar las colonias debido a que existe un gran número de ellas, el recuento total de gérmenes vivos se puede obtener multiplicando por 20 el número promedio de colonias por cuadrícula de varias cuadrículas.
- Las placas Compact Dry se producen en una ubicación certificada según ISO 9001.

• AOAC approval No. 100401
 • MicroVal approval No. RQA2008LR10 ISO EN 16140:2003, ISO 21527-1:2008

ITEM	ESPECIFICACION	OBSERVACIONES
Apariencia	Hoja de amarillo claro. No presenta partículas	Control visual
pH	5.2 – 5.8	Medida con pHmetro
Pérdida por desecación	Menor al 10%	Control visual
Prueba de esterilidad	No hay crecimiento de colonias si se incuban a 30C por 5 días	Control visual
Rendimiento	Las siguientes cepas de prueba se inocularon y se incubaron a 30 C durante 48horas. debe observarse buen crecimiento de: <i>Candida albicans</i> ATCC 2091 <i>Candida albicans</i> ATCC 10231 <i>Aspergillus niger</i> ATCC 16404	Control Visual
a) Prueba de crecimiento		
b) Prueba de inhibición	Las siguientes cepas de prueba se inocularon y se incubaron a 30 C durante 48horas. no debe observarse crecimiento de: <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633 <i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	



ventas@apracom-ec.com



ANEXO 10: INFORMES MICROBIOLÓGICOS YOGURT



REPORTE DE RESULTADOS
MICROBIOLÓGICOS

Código: SGCUDAL-F-019
Versión: 2
Fecha: 2014/06/10

ORDEN No.: DP2	FECHA RECEPCIÓN: 25/10/2015	FECHA DE ENTREGA: 05/11/2015
CODIGO LAB: DPM	CLIENTE: Doris Pacheco	DIRECCIÓN: Av. Ordoñez Lazo
RUC/CEDULA: 01042292305	MUESTRA: yogurt	CANTIDAD: 2
CONDICION DE LA MUESTRA: refrigerado	MUESTREADO POR: el cliente	ANALISIS SOLICITADO: Coliformes, E. coli, mohos y levaduras, bacterias probióticas.

IDENTIFICACION DE LA (S) MUESTRA(S):

IDENTIFICACION UDA LABORATORIOS	IDENTIFICACION CLIENTE
DPM1	Yogurt hidrolizado Experimento 2
DPM2	Yogurt hidrolizado Experimento 5

RESULTADOS:

ANALISIS	UNIDADES	Método	Requisito NTE INEN 2398:2011	DPM1	DPM2
Coliformes Totales	UFC/gr	CompactDry ADAC	10	<10	<10
E. Coli	UFC/gr	CompactDry ADAC	<1	<1	<1
Mohos y Levaduras	UFC/gr	CompactDry ADAC	200	<10	<10
Bacterias probióticas	10 ⁸ UFC/g			192x10 ⁷	532x10 ⁷

Observaciones: NTE INEN 2395:2011 LECHEs FERMENTADAS Requisitos. Tabla No. 1 y 3.

Técnico Responsable

Director de Calidad

Director Técnico

Los resultados son válidos para la muestra analizada. No se pueden reproducir sin la previa autorización de UDA LABORATORIOS. El laboratorio mantendrá la confidencialidad de los resultados.



ANEXO 11: INFORMES FISICO-QUIMICOS DE LECHE CRUDA


**REPORTE DE RESULTADOS
FISICO - QUIMICOS**

 Código: SGCUDAL-F-019
 Versión: 2
 Fecha: 2014/06/10

ORDEN No.: DP1	FECHA RECEPCIÓN: 22/09/2015	FECHA DE ENTREGA: 28/09/2015
CÓDIGO LAB: DPM	CLIENTE: Doris Pacheco	DIRECCIÓN: Av. Ordoñez Lazo
RUC/CEDULA: 01042292305	MUESTRA: leche	CANTIDAD: 1
CONDICION DE LA MUESTRA: refrigerado	MUESTREADO POR: el cliente	ANALISIS SOLICITADO: Densidad relativa, materia grasa, acidez titulable, solidos totales, no grasos, cenizas, punto de congelación, proteínas, antibióticos.

IDENTIFICACION DE LA (S) MUESTRA(S):

IDENTIFICACION UDA LABORATORIOS	IDENTIFICACION CLIENTE
DPM1	Leche Cruda1

RESULTADOS:

ANALISIS	UNIDADES	Requisito NTE INEN 2388:2011	DPM1
Densidad relativa	-	1.029	1.030
Materia grasa	%	3.0	3.1
Acidez titulable como ácido láctico	%	0.13	0.14
Solidos totales	%	11.2	11.4
Solidos no grasos	%	8.2	8.3
Cenizas	%	0.65	0.68
Punto de congelación	°C	-0.535	-531
Proteínas	%	2.9	3
Antibióticos	Presencia/ausencia	Ausencia	Ausencia

Observaciones: NTE INEN 9:2012 LECHES cruda Requisitos. Tabla No. 1

 Los resultados son válidos para la muestra analizada. No se pueden reproducir sin la previa autorización de UDA LABORATORIOS.
 El laboratorio mantendrá la confidencialidad de los resultados.




REPORTE DE RESULTADOS
FISICO - QUIMICOS

Código: SGCUDAL-F-019
Versión: 2
Fecha: 2014/06/10

A handwritten signature in black ink, appearing to be "J. Pacheco", written over a horizontal line.

Técnico Responsable

A handwritten signature in black ink, appearing to be "A. Torres", written over a horizontal line.

Director de Calidad

A handwritten signature in black ink, appearing to be "G. Torres", written over a horizontal line.

Director Técnico

Los resultados son válidos para la muestra analizada. No se pueden repetir en la misma muestra de UDA LABORATORIOS.
Elaborado mediante la confiabilidad de los resultados.



ANEXO 12: TABLA DE ENZIMA HA LACTASA

DOSIS ESTIMADAS DE HA-LACTASE

DOSIS DE HA-LACTASE (ml/l)	TIEMPO DE REACCION (horas)	TEMPERATURA DE REACCION (g.Centígrados)	GRADO DE HIDROLISIS (%)
0,3 - 0,5	10	5	20
0,1 - 0,2	24	5	20
0,5 - 0,9	1	30	20
0,1 - 0,2	4	30	20
0,2 - 0,4	1	40	20
0,05 - 0,1	4	40	20
1,0 - 1,6	10	5	50
0,5 - 0,7	24	5	50
2,1 - 3,1	1	30	50
0,5 - 0,8	4	30	50
0,9 - 1,4	1	40	50
0,2 - 0,4	4	40	50
3,5 - 5,4	10	5	80
1,5 - 2,2	24	5	80
6,9 - 10,4	1	30	80
1,7 - 2,6	4	30	80
2,9 - 4,4	1	40	80
0,7 - 1,1	4	40	80

ANEXO 13: MATERIAL Y EQUIPOS USADOS

1. Crioscopio Funke Gerber Criosstar 1
2. Cámara de flujo laminar vertical ESCO
3. Incubadoras automáticas marca ESCO Tiempo Temperatura
4. Logo Data traspas datos a la computadora.
5. Medidor digital de producción de CO₂.
6. *Bifidumbacterium breve* ATCC 15700
7. *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356
8. *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469
9. Cajas Compac Dry
10. Agar Lactobacilli MRS
11. Agar PCA (Plate Count Agar)
12. Caldo Brilla (Caldo Bilis de buey)
13. Agar Muller Hinton
14. Agar Nutrient BD LBS Agar
15. Blood Agar Base
16. Estandar de McFarland
17. Halactasa L 200 Chr. Hansen.
18. Viscosímetro (Evo Expert)
19. Cámara climatizada (Binder)