

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN
CRISTÓBAL DE HUAMANGA**

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ESCUELA DE FORMACIÓN PROFESIONAL DE BIOLOGÍA

ESPECIALIDAD DE BIOTECNOLOGÍA



**Optimización de parámetros para la elaboración de
leche ácida con *Lactobacillus acidophilus***

**Tesis para optar el Título Profesional de Bióloga
Especialidad de Biotecnología**

PRESENTADA POR

Bach. TACO QUISPE KATHERIN RUTH

AYACUCHO – PERÚ

2010

"Por que la vida no sólo está en experimentar como es, si no ver más allá, bajo la lupa de un microscopio una gota de agua estancada y ver como es realmente la vida".

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga por ser la forjadora de mis estudios académicos desde el inicio de mi vida estudiantil en sus aulas.

A mi familia por su comprensión, cariño y sacrificio. A mi abuelito Teófilo por impulsar a sus nietos al estudio y ser alguien en la vida.

A la Mg. Paula García Gódos Alcázar, por el acertado asesoramiento, su amistad y el apoyo incondicional que siempre ha brindado en el transcurso de la carrera profesional; a los educadores por su paciencia y dedicación a lo largo de todos estos años.

A la Bfga. Edna Palomino León, por la ayuda que brindó durante el análisis bromatológico del producto final, al Bigo. Carlos Carrasco Badajoz por los análisis estadísticos.

A los amigos incondicionales Susy Báez, Nadia Palma, Edwin Rodríguez, Juan Palomino, Richard Santiago, Sara Gutiérrez, Diego Hidalgo y Marco Jaico, gracias por las palabras de aliento para seguir adelante.

A todos aquellos que confiaron y que participaron haciendo posible que este trabajo salga adelante.

ÍNDICE

	PÁGINA
RESUMEN	
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	3
2.1 Antecedentes	3
2.2 Leche ácida	4
2.2.1 Historia	5
2.2.2 Efectos benéficos de la leche ácida	6
2.2.3 Características físico – químicas y microbiológicas	11
2.2.4 Normalización	12
2.3 Optimización de los parámetros de fermentación	15
2.4 Definición de conceptos	16
2.4.1 Prebióticos	16
2.4.2 Probióticos	17
2.4.2.1 <i>Lactobacillus acidophilus</i>	18
2.4.3 Preservantes	20
2.4.3.1 Sorbato de potasio	20
2.4.3.2 Benzoato de sodio	21
III. MATERIALES Y MÉTODOS	23
3.1 Obtención de la materia prima	23
3.2 Estandarización de la carga microbiana	23
3.3 Optimización de los parámetros para la elaboración de leche ácida	24
3.4 Elaboración de la pulpa jarabeada	24
3.5 Análisis bromatológico de la leche ácida	25
3.6 Análisis de preservantes y microbiológico de la leche ácida	25
3.7 Análisis sensorial de la leche ácida	26
3.8 Análisis estadístico	27
IV. RESULTADOS	28
V. DISCUSIÓN	52
VI. CONCLUSIONES	59
VII. RECOMENDACIONES	60
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61
ANEXOS	68

Optimización de parámetros para la elaboración de leche ácida con *Lactobacillus acidophilus*

Autora: Bach. Katherin Ruth Taco Quispe.

Asesora: Mg. Paula García Godos Alcázar.

RESUMEN

El presente trabajo tuvo por objetivos: optimizar los parámetros de fermentación para la elaboración de leche ácida con *Lactobacillus acidophilus*, optimizar el empleo del tipo y concentración de preservantes y realizar el control de calidad del producto elaborado. Se empleó como materia prima leche de vaca la cual se adquirió de la Empresa Lactaria de la ciudad de Ayacucho y la cepa de *Lactobacillus acidophilus* que fue aislada del producto comercial PROBIOTICS elaborado por el Laboratorio Pharmatech de los Estados Unidos de Norte América. Para optimizar los parámetros se inoculó en leche fresca previamente pasteurizada el 5% v/v de cultivo de *Lactobacillus acidophilus* en concentraciones de 10^6 , 10^8 y 10^{10} UFC/ml, estas muestras fueron incubadas a 42, 45 y 50 °C por un tiempo de 8, 10 y 12 h para llevar a cabo la fermentación. Después de la incubación se refrigeró a una temperatura de 3 – 6°C durante un periodo de 2 h para finalmente realizar un batido ligero y medir el pH. De acuerdo a los resultados obtenidos las mejores condiciones de fermentación de la leche con *Lactobacillus acidophilus* se observó a 10^8 UFC/ml incubado a 45°C durante 8h con un pH final de 4.5 y una acidez titulable de 90 °D. Para el análisis bromatológico se tomó en cuenta las normas y procedimientos de la AOAC (1980) en la que la leche ácida fue frutada con durazno y chirimoya obteniéndose así un producto con un valor nutritivo esencial. También se evaluó la viabilidad de la leche ácida de la cual se observó que sin refrigeración sólo se podía conservar por 5 días, mientras que con refrigeración esta podía conservarse entre 21 – 45 días. Cuando se usó preservantes los mejores resultados se observaron a una concentración de 50 mg de sorbato de potasio y 50 mg de benzoato de sodio para la leche ácida frutada con durazno puesta bajo refrigeración y sin refrigeración respectivamente. Para la leche ácida frutada con chirimoya el mejor resultado se observó con 50 mg de benzoato de sodio con y sin refrigeración. Para la aceptación de la leche ácida elaborada se realizó una encuesta a 81 personas, en la que esta tuvo una alta calificación sensorial entre las categorías buenas y excelentes, estos resultados demuestran que hay aceptación del producto.

Palabras clave: *Leche ácida, Lactobacillus acidophilus, probióticos.*

I. INTRODUCCIÓN

El desarrollo de alimentos funcionales constituye una oportunidad real de contribuir a mejorar la calidad de la dieta y la selección de alimentos que puedan afectar positivamente a la salud y el bienestar del individuo.

La interrelación de disciplinas como la biotecnología, biología molecular, la informática, entre otras, con la nutrición, permite a las industrias alimentarias el desarrollo de nuevos productos con funciones adicionales a las del alimento original.

Debido al creciente interés de introducir productos lácteos fermentados con bacterias probióticas que aumenten el valor de su papel funcional, es una realidad actual y una apuesta a futuro para la innovación empresarial y la investigación en el campo de la alimentación. La leche ácida fermentada con *Lactobacillus acidophilus* es uno de estos productos, la cual ofrece un elevado valor nutritivo y diversos efectos benéficos sobre la salud; sin embargo, es necesario realizar más estudios en las diferentes cepas de *Lactobacillus acidophilus* para confirmar su funcionalidad probiótica

Los estudios sobre la capacidad probiótica del *Lactobacillus acidophilus* en la leche ácida han demostrado que posee propiedades de gran interés como en desórdenes intestinales a consecuencia de los microorganismos patógenos, estilo de vida, situaciones de estrés, ciertos hábitos en la dieta, la edad o tratamientos con antibióticos entre otros; hipercolesterolemia humana, el síndrome de la fatiga crónica, en personas intolerantes a la lactosa y cáncer al colon.

Debido a estas virtudes que nos ofrece la leche ácida, se evaluó los parámetros de fermentación en la cual la bacteria pueda realizar una óptima fermentación utilizando como sustrato a la leche y ofrecernos así un producto de calidad que sea capaz de fortalecer la flora microbiana del sistema digestivo.

Los objetivos de la presente investigación fueron:

- a. Optimizar los parámetros de fermentación para la elaboración de leche ácida con *Lactobacillus acidophilus*.
- b. Optimizar el empleo del tipo y concentración de preservantes.
- c. Realizar el control de calidad del producto elaborado.

II. MARCO TEÓRICO

2.1 . ANTECEDENTES

La tecnología de las leches fermentadas es relativamente simple y las elaboraciones a pequeña escala sólo requieren un equipo muy sencillo. En las fabricaciones a gran escala es necesaria una producción uniforme y a bajo costo, lo que exige un mayor control y generalmente un equipo más sofisticado, aunque los principios básicos de fabricación son los mismos. Hay muchos tipos de leches fermentadas que se elaboran utilizando una tecnología parecida y en muchos casos, las diferencias se limitan al tipo de cultivo iniciador y al contenido en sólidos totales de la leche (Walstra y col., 2001).

Lang y Lang (1975) efectuaron una revisión de varios productos acidófilos fermentados con *Lactobacillus acidophilus*, ya sea solo o en combinación con otras bacterias ácido lácticas (BAL) o levaduras, en estas destacan el fuerte sabor ácido de la leche y su equilibrio en la adición de saborizantes, siendo estos productos en los años de 1970 muy populares en varios países del Este de Europa.

Lactobacillus acidophilus fermenta la leche o una base láctea lentamente. Kosikowski (1977) y Lang y Lang (1975), reportan que 38 °C es la temperatura óptima para el crecimiento del lactobacilo con un inóculo entre 1 a 5% v/v; la fermentación requiere entre 8 a 18 h para lograr una acidez titulable del orden de 100 °D. Mientras que Knaysi (1931), utilizó leche descremada a la cual inoculó el 1% v/v del cultivo vigoroso de esta bacteria y lo dejó incubar entre 37 – 40°C hasta que se produzca la formación de coágulo. Sin embargo, Hernández (2005), logró obtener leche ácida en 8 h de incubación a una temperatura de 42 – 45°C, alcanzando un pH final de 4.8 con una acidez de 70 °D.

2.2 . LECHE ÁCIDA

La leche ácida es un producto lácteo elaborado con *Lactobacillus acidophilus* bacteria reconocida como probiótica desde hace varias décadas, ésta es ácido tolerante produciendo en la leche una fermentación láctica con contenido de ácido láctico que oscila entre 1 – 2% (Walstra y col., 2001). En el pasado se reportó que la leche ácida adolecía de atractivo sensorial, actualmente al contar con cepas seleccionadas de la bacteria y disponer de insumos diversos y mejorados, es posible elaborar un producto más atractivo y palatable, pero con las mismas cualidades probióticas (Villegas y col., 2006). Estos lactobacilos que predominan en el tracto gastrointestinal de humanos y animales contribuyen al mantenimiento de un balance microbiano saludable son reconocidos como probióticos (Torres, 2000).

Entre los diferentes productos lácteos la leche ácida fermentada por *Lactobacillus acidophilus* ha sido reconocida durante décadas como una bebida con efectos positivos en el tratamiento de desórdenes intestinales a

consecuencia de los microorganismos patógenos, estilo de vida, situaciones de estrés, ciertos hábitos en la dieta, la edad o tratamientos con antibióticos entre otros; del mismo modo se realizaron estudios en pacientes con hipercolesterolemia humana, el síndrome de la fatiga crónica, intolerantes a la lactosa y hasta en personas con cáncer al colon.

2.2.1 . HISTORIA

Existen evidencias que demuestran la existencia de productos fermentados de la leche ya desde hace 10.000 años. Así encontramos que de las regiones de Turquía, Asia Central y Bulgaria trasladaban leche fresca en sacos de piel de cabra, ésto hizo que las bacterias presentes más el calor emanado por estos sacos produzcan una fermentación en la leche, dándole una consistencia sólida (coágulo). Esta fermentación poseía un agradable sabor y debido a la facilidad que ofrecía su transporte y conservación se convirtieron en el elemento fundamental en la alimentación; a esta la denominaron como "leche búlgara" o yogurt . Asimismo fue a través del consumo habitual que estos pueblos descubrieron virtudes relacionadas con el buen funcionamiento del sistema digestivo y en la prevención de enfermedades intestinales. Todos estos conocimientos fueron difundidos por diversos lugares, donde se comenzaron a producir otros tipos de leches fermentadas como: el "dahi" originario de la india, "mazum" en Armenia, el "villi" en Finlandia, entre otras (URL 3).

En 1900 Metchnikoff, puso en manifiesto las propiedades higiénicas y terapéuticas de las leches fermentadas ácidas, a través de sus investigaciones demostró que los lactobacilos eran capaces de convertir la lactosa en ácido láctico, el cual impedía que otros microorganismos patógenos que producían

toxinas en el tracto intestinal se desarrollaran (Gilliland, 1989). Además él observó en los pobladores de las regiones de Bulgaria, donde el consumo de leches fermentadas con lactobacilos era muy frecuente, que sus vidas eran muy prolongadas (Martínez y col., 2007; Gilliland, 1989).

En el año de 1920 *Lactobacillus acidophilus* saltó a la fama como un suplemento dietético, dándose así que en 1935 los primeros resultados de los ensayos clínicos publicados, demostraron normalizar la función intestinal en pacientes con estreñimiento crónico. Debido a estos descubrimientos se llega a elaborar leche ácida en los Estados Unidos de Norte América, pero no se llega a comercializar debido a que el sabor de la leche fermentada es menos agradable en comparación con otras ya elaboradas (Alais, 1970). Sin embargo, en este mismo país el consumo de leche ácida sin fermentar se volvió muy popular, donde *Lactobacillus acidophilus* liofilizado es adicionado a la leche fresca pasteurizada, convirtiéndose en una vía para que este bacilo llegue al organismo exclusivamente al intestino donde se implantará formando colonias con los beneficios para el consumidor (Gilliland, 2000).

2.2.2 . EFECTOS BENÉFICOS DE LA LECHE ÁCIDA

El lactobacilo en unión con la leche produciendo ya sea la fermentación o no, posee una acción preventiva contra las infecciones gastrointestinales (Contardo y col., 2005) restaurando el balance intestinal donde prevalece la microbiota potencialmente beneficiosa, que supone una barrera de resistencia frente a microorganismos patógenos contaminantes de los alimentos que puedan llegar a colonizar el intestino como Salmonella, Shigella, Campylobacter, entre otras (Sellars y Babel, 1978), lo que ha sido demostrado claramente por diferentes investigaciones.

Sreekumar y Hosono (2000), evaluaron el efecto inmediato que producía *Lactobacillus acidophilus* contra *Escherichia coli*, para lo cual se preparó un cocultivo en un medio de leche descremada la cual fue fermentada y luego administrada a las ratas infectadas con *Escherichia coli*. Ellos observaron que el patógeno fue inhibido por el crecimiento del *Lactobacillus acidophilus* de la siguiente manera: hasta las 24 horas se mantenía constante, pero después su viabilidad decrecía probablemente por la producción de ácido durante la fermentación de la leche. El análisis del intestino delgado mostró que las concentraciones de coliformes en el duodeno, jejunio e ileón fueron significativamente reducidas por la administración de la bacteria ácido láctica. Se llegó a la conclusión de que la leche con *Lactobacillus acidophilus* fermentada puede ser usada en aplicaciones clínicas en personas con desórdenes gastrointestinales causadas por coliformes.

Asimismo, realizaron estudios haciendo uso de pollos libres de gérmenes a quienes se les alimentó con un cultivo de *Lactobacillus acidophilus* los cuales fueron divididos en 3 grupos: el primero el control, el segundo enfrentado con *Salmonella typhimurium* o *Staphylococcus aureus* y un sub grupo recibió un tratamiento con *Lactobacillus acidophilus* y el tercero alimentado con *Lactobacillus acidophilus* cada 2 días durante 10 días. Los resultados indicaron que los animales alimentados inicialmente con *Lactobacillus acidophilus* sobrevivieron mejor que los animales que fueron enfrentados con los primeros patógenos. La mejor forma de tratamiento se observó en la alimentación con *Lactobacillus acidophilus* frente a los patógenos. Por lo tanto los resultados sugieren que es importante tener inicialmente *Lactobacillus acidophilus* y proporcionar al organismo como una continuación básica en la dieta para un mejor control de estos patógenos (Watkins y Miller, 1983).

La presencia de bacterias lácticas viables en la leche ácida permite una mayor asimilación de la lactosa en personas que son intolerantes a esta. La digestión de la lactosa a través de la β -galactosidasa, disminuye la intolerancia a la lactosa y los síntomas causados por ella (diarrea, flatulencia, distensión y dolor abdominal) (Murao y col., 1992).

Mustapha y col. (1997), evaluaron en 11 sujetos (identificados como intolerantes a la lactosa) el mejoramiento que producía la leche acidófila sin fermentar con 4 cepas diferentes de *Lactobacillus acidophilus* en la digestión de este disacárido. Ellos observaron que la leche acidófila con la cepa N1 fue la más efectiva a comparación de las otras con respecto a la digestión y la tolerancia a la lactosa, llegando a la conclusión de que la bilis y la tolerancia al ácido pueden ser factores importantes para considerar que una cepa de *Lactobacillus acidophilus* puede mejorar la digestión y tolerancia a la lactosa.

La leche ácida es capaz de proporcionar un efecto benéfico en individuos intolerantes a la lactosa, así Alm (1982) experimentó en un total de 12 personas el consumo de leche y productos lácteos (leche ácida y yogurt), de las cuales 8 personas que consumieron leche mostraron síntomas de dolor abdominal y diarrea, mientras que los que consumieron una pequeña cantidad de leche acidófila y yogurt no tuvieron ningún síntoma de intolerancia a la lactosa. Los resultados mostraron que los productos de leches fermentadas especialmente la leche acidófila y el yogurt estarían consideradas como una alternativa en la formulación de dietas para personas intolerantes a la lactosa.

Otro de los beneficios encontrados es que ayuda a prevenir las enfermedades coronarias y es mucho más eficaz que la leche para mantener bajo los niveles de

colesterol sanguíneo. Las BAL pueden intervenir en la disminución del colesterol ya que las enzimas presentes pueden asimilar el colesterol *in vivo* en el intestino delgado. Sin embargo, la poca densidad de colonización de esta área y su rápido vaciamiento imposibilita la actividad enzimática bacteriana. La asociación física del colesterol pueden facilitar a la célula una acción similar a la de una esponja llevándola fuera del sistema (Silva y col., 1987).

Anderson y col. (1999), evaluaron los efectos que producía el consumo de leche fermentada con 2 tipos de cepa de *Lactobacillus acidophilus* la L1 y ATCC 43211 en personas con hipercolesterolemia para lo cual realizó 2 estudios: el primero consistió en consumir por 3 semanas 2 tipos de leche fermentada después de cada comida por las noches (el primero con *Lactobacillus acidophilus* aislada del hombre L1 y la segunda aislada de cerdos ATCC 43211). El segundo estudio consistió en asignar a un grupo el consumo por 4 semanas de leche fermentada con bacterias inactivas (placebo) y al otro leche fermentada conteniendo la cepa de *Lactobacillus acidophilus* L1. Las primeras dos semanas fueron un período de limpieza esto para comparar los efectos de lípidos en suero de la leche fermentada con *Lactobacillus acidophilus* L1 y con la leche fermentada sin cepa (placebo). Los resultados mostraron para el primer estudio que hubo una reducción de 2.4% en la concentración de colesterol para la cepa L1 y el segundo estudio la misma cepa redujo 3.2% de colesterol. Del estudio, se concluyó que se debería realizar una buena selección de la cepa para indicar que poseen un potencial significativo para reducir las concentraciones de colesterol y un consumo regular de leches fermentadas conteniendo *Lactobacillus acidophilus* puede reducir el colesterol activo y disminuir el riesgo a las enfermedades coronarias entre un 6 – 10%.

De la misma manera Mann y Spoerry (1974) condujeron un estudio en el que involucraron a 25 individuos los cuales fueron alimentados con leche sometida a una fermentación natural con una cepa silvestre de lactobacilos. La leche fermentada fue consumida por un período de 6 días (4 – 5 litros por día por cada hombre). Después de dicho consumo se realizó un análisis para observar si había un incremento en los niveles de colesterol en suero sanguíneo, aunque esto no fue objeto de estudio encontrar los efectos benéficos de la leche fermentada, para sorpresa de los investigadores los niveles de colesterol disminuyeron en todos los hombres.

El síndrome de la fatiga crónica (SFC) es una afección de cansancio o agotamiento fuerte y prolongado (fatiga) que no se alivia con el descanso y no es causada directamente por otras enfermedades (Englerberg, 2009). Por ello, se han realizado estudios en los cuales el consumo del *Lactobacillus acidophilus* está involucrado. Uno de ellos fue reportado por Sullivan y col. (2009), en el cual 15 personas que sufrían este mal consumieron un producto probiótico el cual contenía 10^8 UFC/ml de *Lactobacillus paracasei ssp. paracasei* F19, *Lactobacillus acidophilus* NCFM 1748 y *Bifidobacterium lactis* Bb12. Este producto fue administrado 2 veces diariamente por un mes. De esta prueba 6 de 15 personas reportaron un mejoramiento en salud física y mental. Del estudio se demostró que es posible mejorar la salud haciendo uso de probióticos en pacientes con SFC.

Lactobacillus acidophilus también modificaría las enzimas bacterianas que originan los carcinógenos en el tracto digestivo, inhibiendo así la absorción y formación de estas sustancias precancerígenas (Mahaut y col., 2004) y

mutagénicas (Parvez, 2006). De esta manera se hizo una evaluación en ratas, en la que se estudió la influencia de *Lactobacillus acidophilus* frente a células tumorales. Estas células fueron implantadas en las ratas las cuales fueron alimentadas con leche fermentada con *Lactobacillus acidophilus*. Al séptimo día los animales fueron sacrificados para determinar el número de células tumorales, los resultados mostraron que las ratas que habían recibido leche fermentada con *Lactobacillus acidophilus* presentaron un bajo número de células tumorales, es decir que presentaron un efecto antagónico en la proliferación de este tipo de células (Shahani y col., 1977).

2.2.3 . CARACTERÍSTICAS FÍSICO – QUÍMICAS Y MICROBIOLÓGICAS

Según la Canadian Dairy Commission (2007), la leche ácida es fermentada a menudo con bajo contenido en grasas (1.5 - 2%) o sin grasas (0.5%), a la que se adiciona *Lactobacillus acidophilus* como agente de fermentación, que utiliza la lactosa para convertirla en ácido láctico originando un producto con características organolépticas notablemente típicas de ella. Esta leche posee un tiempo de vida de anaquel bajo refrigeración a 4 °C por 2 semanas.

El contenido en ácido láctico de la leche puede elevarse en 1 – 2%. Si no se conserva a una temperatura suficientemente baja el número de bacterias viables se reduce muy rápidamente; esta temperatura ayudará a que la leche no se acidifique cada vez más evitando que el producto se heche a perder (Walstra y col., 2001).

Según Hernández (2005), la leche ácida debe poseer una acidez desarrollada del producto joven entre unos 75 – 90 °D y con un pH cercano a 4.5; sin

embargo Lang y Lang (1975) reportaron que después de 8 y 18 h de fermentación la acidez titulable llega a 100 °D.

Para que se manifiesten las bondades de *Lactobacillus acidophilus* se recomienda ingerir entre 100 millones y 1000 millones de células por día, constantemente y por un período muy prolongado (Villegas y col., 2006).

2.2.4 . NORMALIZACIÓN

En cuanto se refiere a las normas, el CODEX STAN 243 – 2003 aplica para leches fermentadas incluyendo las leches fermentadas tratadas térmicamente, las leches fermentadas concentradas y los productos lácteos compuestos basados en estos productos para consumo directo o procesamiento posterior (Codex Alimentarius, 2003).

En dicha norma la leche ácida es considerada como un yogurt a base de cultivos alternativos, obtenido por medio de fermentación de la leche con ayuda de *Lactobacillus acidophilus*. Esta leche debe cumplir los siguientes requisitos estipulados en la sección 3.3 de dicha norma:

Tabla N° 1: Contenido mínimo de la composición de la leche ácida

Composición	Leche ácida
Proteína láctea ^(a) (% w/w)	Mín.2.7
Grasa láctea (% w/w)	Menos del 15
Acidez valorable, expresada como % de ácido láctico (% w/w)	Mín0.6
Etanol (% vol./w)	-----
Suma de microorganismos que comprenden el cultivo (UFC/g en total)	Min. 10 ⁷
Microorganismos etiquetados ^(b) (UFC/g en total)	Min. 10 ⁶
Levaduras (UFC/g)	-----

^(a) El contenido en proteínas es 6.38 multiplicado por el nitrógeno Kjeldahl total determinado.

^(b) Se aplica cuando en el etiquetado se realiza una declaración de contenido que se refiere a la presencia de un microorganismo específico que ha sido agregado como complemento del cultivo específico.

Fuente: Codex Alimentarius, 2003.

En la sección 3.4 “Características esenciales de elaboración”, se menciona que se encuentra prohibido retirar el suero luego de la fermentación en la elaboración de leches fermentadas, salvo sea el caso de leches fermentadas concentradas (aquellas a las cuales se le agrega después de la fermentación un mínimo de 5.6% de proteína) (Codex Alimentarius, 2003).

En cuanto se refiere a aditivos alimentarios, la sección 4 menciona que sólo podrán emplearse las clases de aditivos que se indican en la siguiente tabla para las categorías de productos que se especifican. Dentro de cada clase de aditivos

y cuando esté permitido de acuerdo con la tabla, solamente podrán emplearse los aditivos específicos listados y solamente dentro de los límites especificados. Para el caso de leches fermentadas simples sólo se podrá hacer uso de estabilizadores y espesantes (Codex Alimentarius, 2003).

En el diario El Peruano el 28 de Junio de 2003 se publicó los Principios para el Establecimiento y la Aplicación de Criterios Microbiológicos para los Alimentos; mostrando así en el Capítulo IV “De los Grupos Alimentos”, el Artículo 17° los criterios microbiológicos que deben cumplir los productos fermentados (El Peruano, 2003).

Tabla N° 2: Criterios microbiológicos para el yogurt y productos fermentados o acidificados

1.7 Yogurt y Productos Fermentados o acidificados						
Agentes microbianos	Categoría	Clases	n	c	Límite por g/ml	
					m	M
Coliformes	5	3	5	2	10	10 ²
Mohos	5	3	5	2	10	10 ²
Levaduras	5	3	5	2	10	10 ²
Salmonella en 25g	11	2	5	0	0	-

n Número de unidades de muestra.

c Criterio de aceptación o de rechazo, donde m y M son sus límites. Se rechazarán todos aquellos resultados cuyos valores sean superiores a M; ninguna de las muestras del plan de tres clases sobrepasará el valor de M.

Fuente: El Peruano, 2003.

2.3. OPTIMIZACIÓN DE LOS PARÁMETROS DE FERMENTACIÓN

Para obtener leche ácida, se inocula leche fresca sin pasteurizar con suero de manteca, que contiene el cultivo iniciador necesario gracias a la acidificación experimentada por la crema. Si no se inocula la leche, además de las bacterias lácticas se desarrollarían fácilmente otros microorganismos que podrían estropear el sabor. Después de 15 – 20 h a 18 – 20°C se habrá formado la cantidad de ácido necesario para precipitar la caseína. A partir de ésta, se libera el paracaseinato cálcico, que coagula a valores de pH comprendidos entre 5 y 6 (Jagnow y Dawid, 1991).

Knaysi (1931), elaboró un método económico para producir leche ácida utilizando leche limpia, pasteurizada y descremada la cual la dejó incubando a una temperatura de 37 – 40°C durante 2 ½ - 3 h (sin calentamiento), luego se llevó lo más cerca posible al punto de ebullición y se mantuvo la temperatura durante 30 minutos. La leche descremada fue enfriada rápidamente a 37 – 40°C e inmediatamente incubada con un aproximado de 1% v/v de cultivo puro de *Lactobacillus acidophilus*, en condición de crecimiento activo; y se mantuvo la temperatura hasta la coagulación, preferentemente de 3 a más horas después de la coagulación para asegurar una mejor calidad.

Sin embargo estos procedimientos connotaban mucha demanda de tiempo. Hernández (2005) obtuvo leche ácida tras 8 h de incubación a una temperatura de 42 – 45°C, la cual alcanzó un pH final de 4.8, luego esta fue enfriada en baño de agua – hielo y conservada entre 6 y 10 °C, después de 12 h sufrió una post – acidificación de hasta 85 °D que equivale a un pH de 4.5. Observó la cinética de fermentación, en la que resalta que *Lactobacillus acidophilus* posee una

acidificación más lenta siendo esta de 5 h en la fase lag, en comparación con el yogurt que es de sólo una hora y media esto debido al efecto simbiótico mutualista de sus bacterias.

2.4 . DEFINICIÓN DE CONCEPTOS

2.4.1 . PREBIÓTICOS

Estudios más recientes indican que algunas estructuras celulares aisladas pueden ejercer los efectos beneficios sin necesidad de que el microorganismo se encuentre viable (Ouwehand y col., 2002). Los prebióticos son ingredientes no digeribles de la dieta, que producen efectos beneficiosos estimulando selectivamente el crecimiento y/o actividad de uno o más tipos de bacterias en el colon, las que tienen a su vez la propiedad de elevar el potencial de salud del hospedero (De las Cagigas y Blanco, 2002). Son fundamentalmente fructo y galacto oligosacáridos; incluida en este concepto está la fibra dietética (Torres, 1991).

Toda fibra dietética como la inulina y la oligofruktosa, llega al intestino grueso sin haber sido transformada digestivamente. Las bacterias del colon, con sus numerosas enzimas digestivas de gran actividad metabólica, la pueden digerir en mayor o menor medida en dependencia de su composición química y de su estructura (De las Cagigas y Blanco, 2002). Los ácidos grasos de cadena corta, productos de un proceso metabólico, son ácidos grasos volátiles que en su mayoría se absorben rápidamente. De estos (butirato, acetato y propionato), el butirato aporta mayor cantidad de energía y desempeña importantes funciones en la biología del colon (Velazquez y col., 1996), como:

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

2.4.2 . PROBIÓTICOS

Se entienden como probióticos a microorganismos vivos incorporados como suplementos a algunos alimentos para beneficiar la salud del hospedero humano a través de mejorar el balance de su flora intestinal. Las bacterias que tienen la capacidad de implantarse en la flora intestinal como algunas especies de bifidobacterias, *Lactobacillus casei* o *Lactobacillus acidophilus*, son las que pueden considerarse como bacterias probióticas típicas y las que más interés han despertado (Gilliland, 1998; Salminen y col., 1998).

El probiótico más empleado es *Lactobacillus acidophilus*, además de sus beneficios al tracto intestinal también produce vitaminas del complejo B (B6, B12, ácido fólico, riboflavina, niacina, biotina y ácido pantoténico), mejora absorción del calcio, produce enzimas como la lactasa, mejora los síntomas del síndrome de intestino irritable, produce antibióticos naturales que ayudan en el control de bacterias patógenas intestinales, ayuda en la digestión de los alimentos y controla la candidiasis intestinal (Gomes, 2006).

Para la utilización de los lactobacilos como probióticos es necesario que las cepas sean capaces de adherirse a las células intestinales ya que constituye y es un prerrequisito para la colonización. Dichas cepas deben soportar las

barreras potenciales tales como el bajo pH del estómago, la baja tensión superficial, la presencia de ácidos biliares y las interacciones con otros microorganismos presentes también en el tracto gastrointestinal, pero también estas deben ser productoras de sustancias antimicrobianas y ser resistentes a antibióticos (Fernandes y col., 1987).

El potencial beneficio de la ingestión en los alimentos tanto de probióticos como de prebióticos o de ambos (simbiótico), se basa en la gran influencia que ejerce la microbiota intestinal en el estado de salud de los individuos, en cómo ésta puede verse influenciada por diferentes hábitos de conducta (Requena y Peláez, 2005).

2.4.2.1. *Lactobacillus acidophilus*

Es un bacilo Gram positivo, generalmente inmóvil y aerotolerante (es capaz de fermentar fructosa, galactosa, glucosa, lactosa, pero no fermenta sacarosa ni maltosa). Crece a temperaturas superiores a 45°C, su temperatura óptima de crecimiento es de 40 a 48°C, no crecen a temperaturas menores de 15°C a su vez crecen a pH inferior a 5, no reacciona frente a la catalasa (Mitsuoka, 1990).

Poseen las enzimas glicosidasas que se requieren para romper los enlaces β de los fructanos, de esta manera pueden fermentar los fructo – oligosacáridos y utilizar esta energía para su multiplicación y proliferación (Seminario, 2003).

Esta bacteria produce una variedad de factores antagónicos que incluyen productos finales, con acción similar a la de un antibiótico y con actividad bactericida dirigida a diversos microorganismos patógenos Gram – negativos,

estas son proteínas o complejos proteicos, representan una gran clase de antagonistas heterogéneos que varían bastante en el peso molecular, propiedades bioquímicas. Esta acción bactericida hace que sean atractivas como agentes potenciales para preservar alimentos (Larpen, 2006).

Las bacterias ácido lácticas fueron descubiertas por Pasteur en 1857. En 1878, Lister las aisló de la leche rancia. Posteriormente se aislaron del tracto intestinal. Pero no fue sino hasta que en 1900 Moro descubrió *Lactobacillus acidophilus* (Milke, 2000).

Lactobacillus acidophilus pertenece a la familia Lactobacillaceae (Mac Faddin, 1997; Madigan, 2004), cuya característica es de producir una mayor cantidad de ácido láctico (hasta 2.7%) fermentando los azúcares C_6 por ello se le denomina homofermentativo; es termófilo, su temperatura óptima es de 40 – 50°C (Alais, 1970).

Los estudios han mostrado que el consumo de productos de leche conteniendo *Lactobacillus acidophilus* es un potencial para prevenir o controlar las infecciones intestinales, mejorar la digestión de la lactosa en personas clasificadas como malos digestores de lactosa también ayuda en el control de los niveles de colesterol y es muy empleado en la actividad anticancerígeno (Gilliland, 1989).

2.4.3 . PRESERVANTES

Se conoce que más del 20% de todos los alimentos producidos en el mundo se pierden por acción de los microorganismos y que estos alimentos alterados pueden resultar muy perjudiciales para la salud del consumidor.

El Código de Prácticas de Higiene para la leche y productos lácteos, menciona que la proliferación microbiana depende de muchas condiciones presentes en el entorno del organismo tales como: ingredientes, nutrientes, actividad de agua, pH, presencia de conservantes, microorganismos competitivos, atmósfera gaseosa, potencial redox, tiempo y temperatura de almacenamiento. Por consiguiente, se puede utilizar el control de estas condiciones para limitar, retrasar o prevenir la proliferación microbiana (Codex Alimentarius, 2007).

Un preservante es una sustancia utilizada como aditivo alimentario, que adicionada a los alimentos aumenta la calidad y la estabilidad mediante la actividad antimicrobiana y/o fungicida (detiene el deterioro causado por la presencia de diferentes tipos de microorganismos como bacterias, levaduras y mohos) ya sea directa o indirecta. La mayoría de los preservantes son bastante específicos y solamente tienen un efecto sobre algunos microorganismos (URL 2).

2.4.3.1. SORBATO DE POTASIO

El sorbato de potasio es un producto químico que se utiliza como preservante, es soluble en agua y alcohol. Este actúa impidiendo la aparición de mohos, levaduras y bacterias impidiendo la formación de micotoxinas; también evita el enranciamiento, el desdoblamiento microbiano de grasas y la saponificación por ello desarrolla mejor su acción a un pH de hasta 6.5 aproximadamente (URL 1).

El mecanismo de inhibición incluye alteraciones en la morfología, integridad y función de la membrana celular, así como la inhibición de funciones de

transporte y actividad metabólica. La muerte de los microorganismos expuestos a altas concentraciones de sorbato de potasio se debe a que la membrana celular se torna más permeable. Este compuesto disminuye la asimilación del carbono (glucosa, acetato, succinato, piruvato, lactato, etanol, entre otros) (Sofos y Busta, 1993).

Este conservante se utiliza en jugos de fruta, frutas secas, pulpas de fruta, vinos, cereales, mantequilla, margarina, mayonesa, crema, quesos, repostería, productos horneados, tortillas, refrescos embotellados, pescados ahumados, productos cárnicos (curados y cocidos) y yogures (URL 1).

2.4.3.2 . BENZOATO DE SODIO

El benzoato de sodio viene en una presentación de polvo o gránulos de color blanco, este es inodoro o con olor ligero, su sabor es astringente y dulce. Entre las características que resalta es que es soluble en agua. Actúa mejor a un pH menor o igual a 4.5; la dosis máxima permitida es de 0.1% (URL 1).

Este se utiliza como un conservador que inhibe la actividad de los microorganismos tales como levaduras, bacterias y mohos. El mecanismo comienza con la absorción del ácido benzoico por la célula. Si el pH intracelular cambia a menor igual a 5, la fermentación anaerobia de la glucosa con fosfofructocinasa es disminuida a un 95% (Krebs, 1983).

Es importante que se adicione al producto que va a preservar desde los primeros pasos de la fabricación, con una homogeneización adecuada a fin de garantizar la correcta distribución del conservador. Este conservante se utiliza en

bebidas carbonatadas, jarabes para bebidas, sidra, encurtidos y vinagres, frutas y jugos de frutas, mermeladas y jaleas, aderezos, salsas y condimentos, como también en yogures (URL 1).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. OBTENCIÓN DE LA MATERIA PRIMA

El presente trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Biotecnología Microbiana de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, se utilizó como materia prima a la leche de vaca el cual se adquirió de la Empresa Lactaria “El Vaquerito”. La cepa de *Lactobacillus acidophilus* fue aislada del producto comercial PROBIOTICS, elaborado por el laboratorio Pharmatech de los Estados Unidos de Norte América.

3.2. ESTANDARIZACIÓN DE LA CARGA MICROBIANA

La estandarización de la carga microbiana de *Lactobacillus acidophilus* se hizo con el método de espectrofotometría y Recuento Estándar en Placa (Huamán, 1986). Se utilizó un espectrofotómetro de marca Milton Roy modelo 20D. Se suspendió la cepa de *Lactobacillus acidophilus* en 3 tubos con 5 ml de Caldo Lactobacilli, luego se incubó a 37°C por intervalos de tiempo de 5, 15 y 30 minutos, leyéndose la absorbancia a 640 nm el cual es proporcional a la concentración de células en suspensión. Inmediatamente después se realizaron

diluciones sucesivas hasta 10^4 , 10^6 y 10^8 UFC/ml las cuales fueron sembradas por incorporación en Agar Lactobacilli. Estas placas fueron incubadas a 37 °C por 24 h y luego se realizó el recuento de colonias (ver ANEXO N° 2).

3.3. OPTIMIZACIÓN DE LOS PARÁMETROS PARA LA ELABORACIÓN DE LECHE ÁCIDA

Para optimizar los parámetros, se procedió a pasteurizar la leche fresca a 72°C durante 15 minutos, esta se dejó enfriar y con la ayuda del lactodensímetro se leyó la densidad de la leche que debe encontrarse en un rango de 1.029 – 1.032; también se realizó la lectura del pH para ello se tuvo en consideración que ésta debe poseer un pH de entre 5 - 5.6.

Ya cuando la leche se encontró a una temperatura de 43 °C se inoculó el 5% v/v del cultivo de *Lactobacillus acidophilus* en concentraciones de 10^6 , 10^8 y 10^{10} UFC/ml. Estas muestras fueron colocadas en diferentes incubadoras a 42, 45 y 50 °C por un tiempo de 8, 10 y 12 h, para así permitir la fermentación. Después de la incubación se llevó a 3 – 6°C durante un periodo de 2 h. Finalmente se realizó un ligero batido y se leyó el pH (ver Anexo N° 3).

3.4. ELABORACIÓN DE PULPA JARABEADA

Para elaborar la pulpa jarabeada se procedió a lavar 1 Kg. de fruta; en este caso durazno de la variedad “huayco” y chirimoya de la variedad “cumbe”, estas se pelaron y trozaron para luego ser licuadas, luego se adicionó el 50% p/p de

azúcar y se pasteurizó a 75°C por 25 min., se dejó enfriar y se colocó a 4 °C (ver Anexo N° 4).

A la mejor muestra del producto final se le agregó el 5% v/v de la pulpa de fruta.

3.5. ANÁLISIS BROMATOLÓGICO DE LA LECHE ÁCIDA

Para el análisis bromatológico se tomó en cuenta las normas de la A.O.A.C para leche y productos lácteos. Entonces se determinó:

- a. La humedad y peso seco por el método Gravimétrico (AOAC, 1980).
- b. Cenizas por medio del método de la incineración indirecta (AOAC, 1980).
- c. Proteína por el método de Micro-Kjeldahl (AOAC, 1980).
- d. Grasa por el método de Gerber (AOAC, 1980).
- e. Carbohidratos totales por el método directo (AOAC, 1980).
- f. Valor energético y valor nutricional por el Método de Added Water (AOAC, 1980).

3.6. ANÁLISIS DE PRESERVANTES Y MICROBIOLÓGICO DE LA LECHE ÁCIDA

Se realizó el análisis de viabilidad con y sin refrigeración, ya sea con o sin preservantes. Para este último se hizo uso de dos preservantes entre benzoato de sodio y sorbato de potasio, los cuales fueron adicionados en diferentes concentraciones ya sean solos o en combinación, como sigue:

Tabla N° 3: Preservantes utilizados en la leche ácida bajo diferentes concentraciones

Codificación	Benzoato de sodio (%)	Sorbato de potasio (%)
1	0.1	-
2	-	0.1
3	0.05	0.05
4	0.05	-
5	-	0.05
6	0.025	0.025

Para el análisis microbiológico se tomó en cuenta las normas establecidas para Leches Fermentadas del Codex Alimentarius, la cual exige un análisis de cuantificación de coliformes totales y fecales, salmonella, mohos y levaduras (El Peruano, 2003).

3.7. ANÁLISIS SENSORIAL DE LA LECHE ÁCIDA

El examen sensorial (organoléptico), se llevó a cabo por el método de graduación; de excelente hasta muy malo, codificados como sigue:

Tabla N° 4: Codificación de la evaluación del sabor

Código	Criterio
1	muy malo
2	malo
3	regular
4	bueno
5	excelente

Para ello se aplicó una encuesta a 81 personas que oscilaban en un rango de edad entre 18 – 70 años; entre docentes, estudiantes y trabajadores pertenecientes a la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, disponibles a la degustación.

3.8 . ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados obtenidos fueron sometidos a un análisis de varianza factorial $A \times B \times C$ ($3 \times 3 \times 3$) con un nivel de significancia de $\alpha = 0.05$, donde:

A= UFC/ml (10^6 , 10^8 y 10^{10})

B= Temperatura (42, 45 y 50°C)

C= Tiempo de incubación (8, 10 y 12 h)

Para el resultado de las encuestas se aplicaron tablas de frecuencias. Se utilizó el paquete estadístico SPSS versión 15, considerándose para todos los análisis un nivel de significancia de $\alpha = 0.05$.

Tabla N° 6: Valores de la evaluación del pH final de la leche ácida para 10^6 UFC/ml de *Lactobacillus acidophilus*. Ayacucho – 2010.

Tiempo (horas)	Temperatura (°C)		
	42	45	50
8	4.90	4.80	4.60
10	4.90	4.77	4.90
12	4.90	4.87	4.90

Tabla N° 7: Valores de la evaluación del pH final de la leche ácida para 10^8 UFC/ml de *Lactobacillus acidophilus*. Ayacucho – 2010.

Tiempo (horas)	Temperatura (°C)		
	42	45	50
8	4.90	4.50	4.60
10	4.87	4.30	4.77
12	4.83	4.27	4.83

Tabla N° 8: Valores de la evaluación del pH final de la leche ácida para 10^{10} UFC/ml de *Lactobacillus acidophilus*. Ayacucho – 2010.

Tiempo (horas)	Temperatura (°C)		
	42	45	50
8	4.9	4.80	4.60
10	5.0	4.57	4.90
12	5.0	4.60	4.87

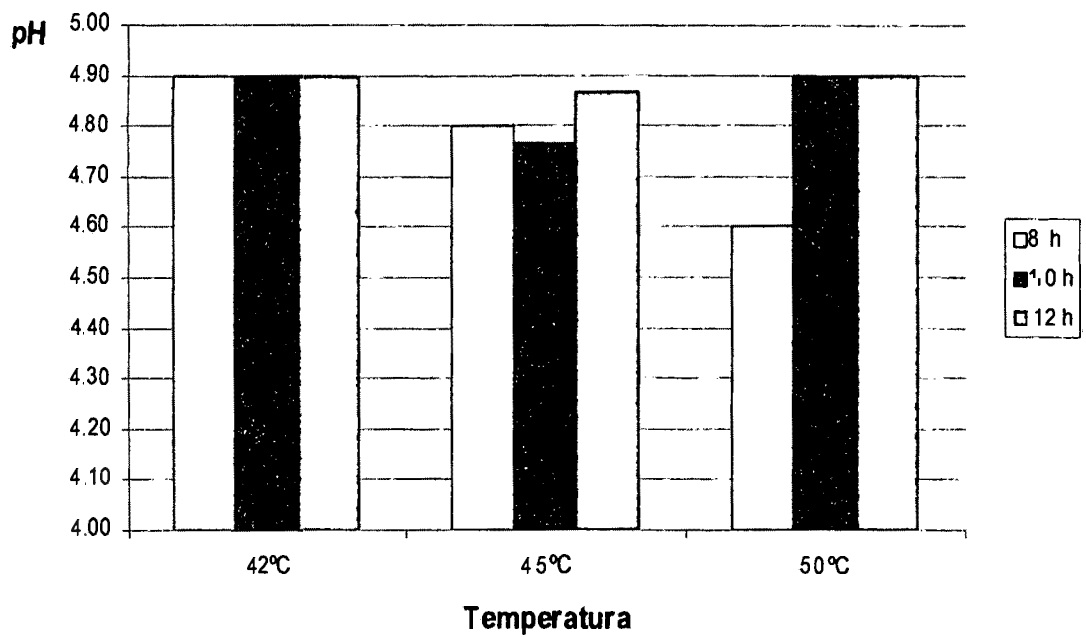


Figura N° 1: Valores de la evaluación del pH final de la leche ácida para 10^6 UFC/ml de *Lactobacillus acidophilus*. Ayacucho – 2010.

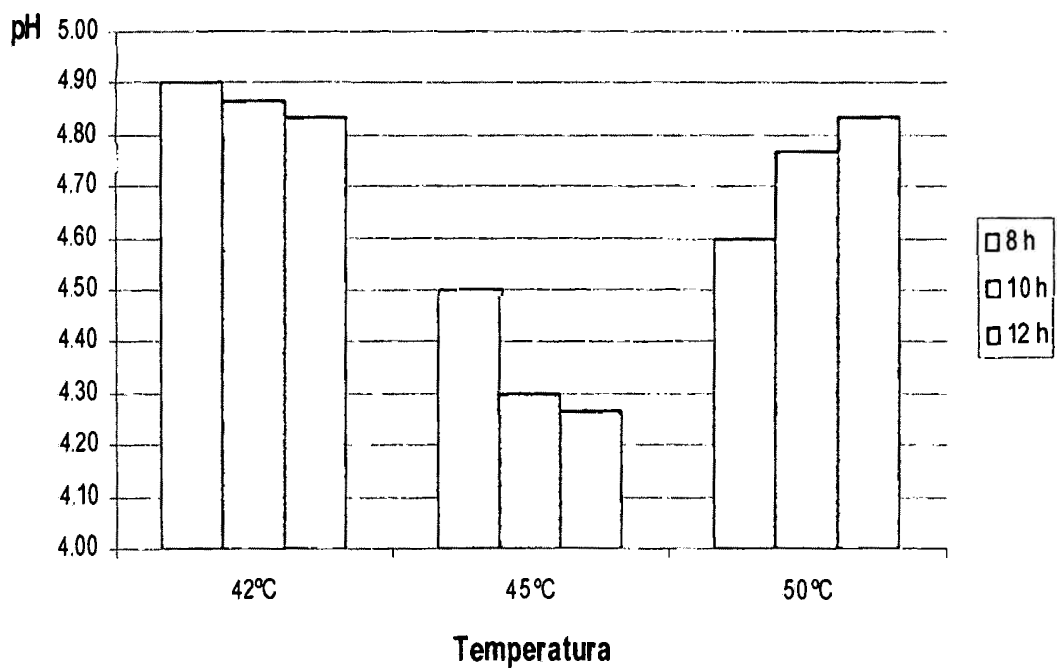


Figura N° 2: Valores de la evaluación del pH final de la leche ácida para 10^8 UFC/ml de *Lactobacillus acidophilus*. Ayacucho-2010.

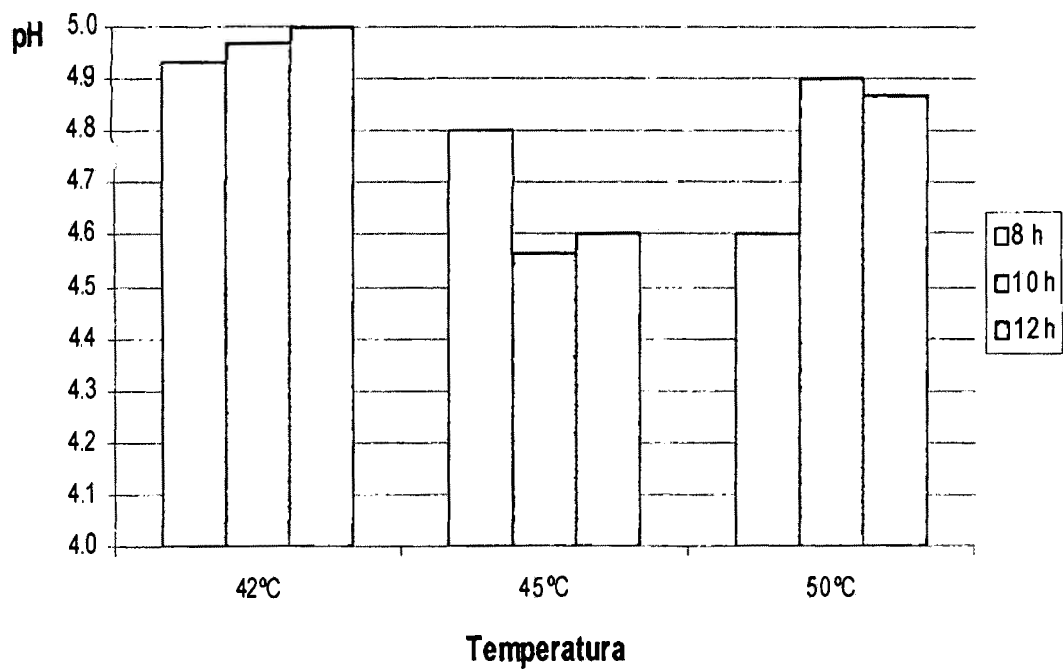


Figura N° 3: Valores de la evaluación del pH final de la leche ácida para 10^{10} UFC/ml de *Lactobacillus acidophilus*. Ayacucho – 2010.

Tabla N° 9: Resultados de la determinación de la carga microbiana, acidez total y porcentaje de ácido láctico de la leche ácida elaborada. Ayacucho – 2010.

	UFC/ml inicial	UFC/ml final	° Dornic	% de ácido láctico
Leche ácida	10 ⁸	10 ¹⁵	90	0.9

Tabla N° 10: Resultados del análisis organoléptico de la leche ácida sin y con refrigeración. Ayacucho – 2010.

Leche ácida	Sin refrigeración (días)	Con refrigeración (días)
Natural	5	35
Durazno	5	25
Chirimoya	5	21

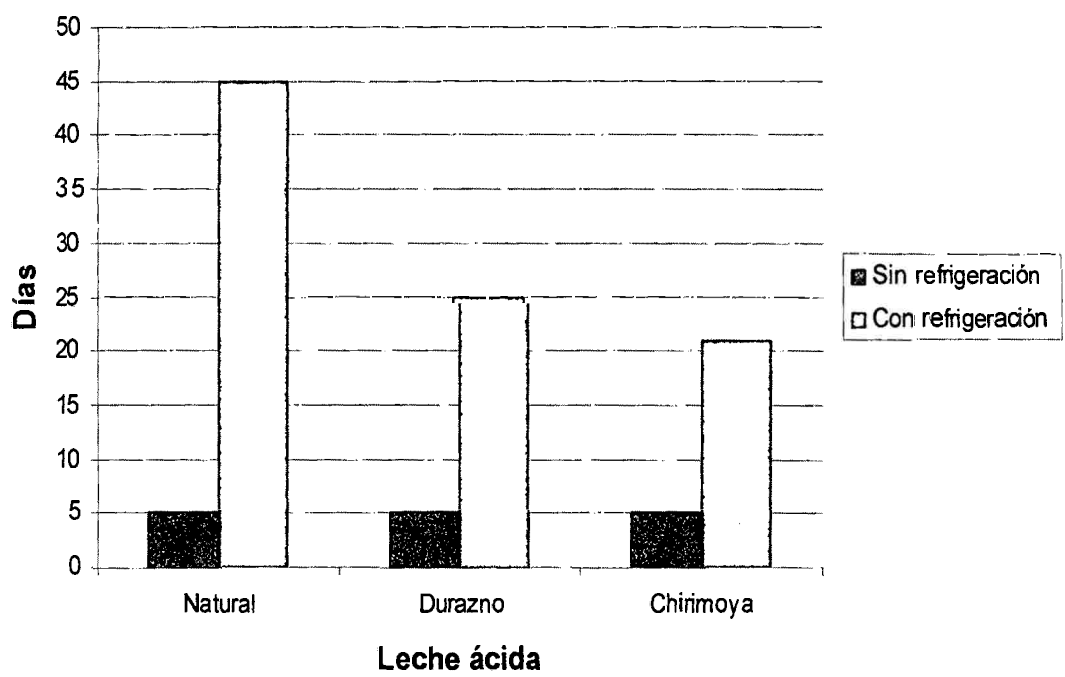


Figura Nº 4: Resultados del análisis organoléptico de la leche ácida sin y con refrigeración. Ayacucho – 2010.

Tabla Nº 11: Resultados del análisis organoléptico de la leche ácida frutada sin y con refrigeración. Ayacucho– 2010.

Tiempo (días)	Leche ácida frutada (sin refrigeración)	Leche ácida frutada (con refrigeración)
1	5	5
2	5	5
3	5	5
4	4	5
5	3	5
10	1	4
20	1	4
30	1	3
40	1	3
45	1	3

1 = Muy malo; 2 = Malo; 3 = Regular; 4 = Bueno; 5 = Excelente

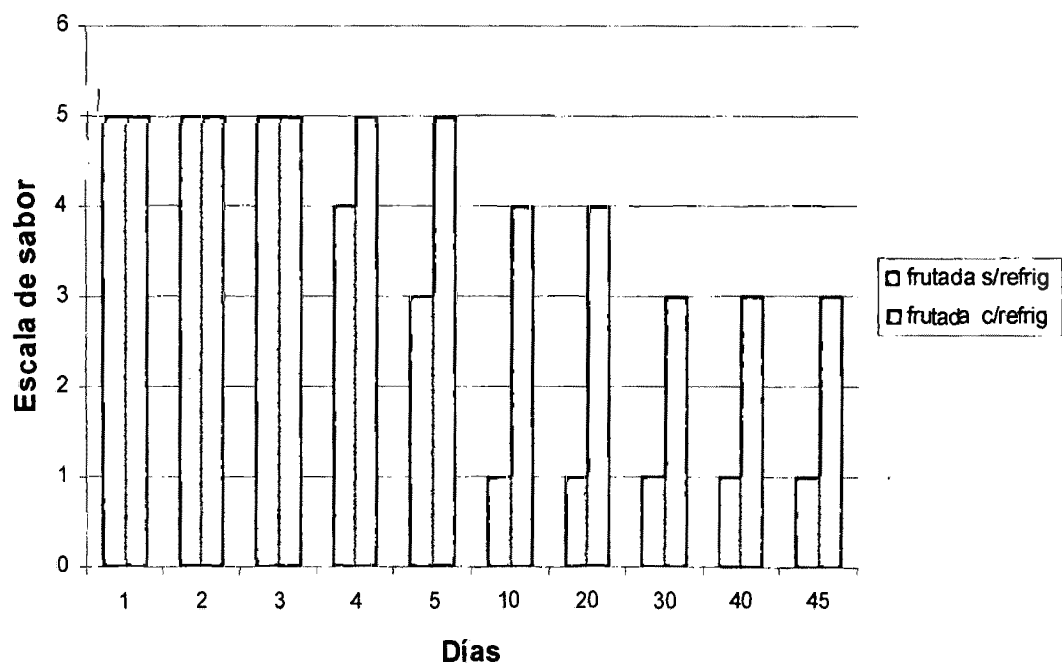


Figura Nº 5: Resultados del análisis organoléptico de la leche ácida frutada con y sin refrigeración. Ayacucho – 2010.

**Tabla N° 12: Resultados del análisis bromatológico de la leche ácida.
Ayacucho – 2010.**

Producto		%H	%Prot.	%Grasa	%Carb.	%Cenizas	V.C Kcal./100g	V.N Kcal.
Leche ácida	Natural	85.39	4.59	1.0	8.14	0.88	59.92	4.78
	Durazno	74.60	3.57	1.3	19.94	0.59	105.74	14.28
	Chirimoya	73.60	4.34	1.5	19.79	0.67	110.74	11.77

V.C = Valor calórico; V.N = Valor nutritivo

**Tabla N° 13: Resultados del análisis microbiológico de la leche ácida.
Ayacucho– 2010.**

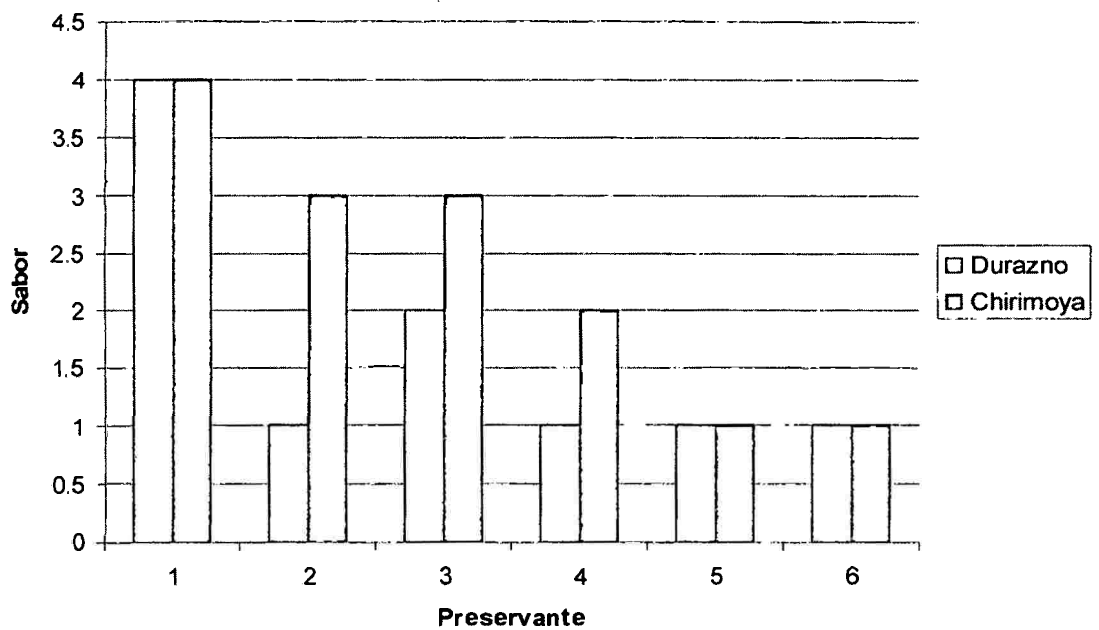
Agentes microbianos	Recuento
Coliformes	<10
Mohos	<10
Levaduras	<10
Salmonella en 25g	ausencia

Tabla Nº 14: Resultados de la evaluación de la carga microbiana (UFC/ml) en diferentes concentraciones de preservantes en la leche ácida sin refrigeración. Ayacucho–2010.

Leche ácida	Preservante	Días								Escala
		0	5	10	15	20	25	30	35	Sabor
Durazno	1	10^{15}	10^6	10^6	10^6	10^8	10^8	10^8	10^9	4
	2	10^{15}	10^6	10^6	10^6	10^8	10^8	10^8	10^8	1
	3	10^{15}	10^6	10^6	10^6	10^6	10^8	10^9	10^9	2
	4	10^{15}	10^6	10^6	10^6	10^8	10^8	10^8	10^9	1
	5	10^{15}	10^6	10^6	10^6	10^6	10^6	10^9	10^9	1
	6	10^{15}	10^6	10^6	10^6	10^6	10^6	10^9	10^9	1
	7	10^{15}	10^{28}	---	---	---	---	---	---	---
Chirimoya	1	10^{15}	10^6	10^6	10^8	10^8	10^8	10^9	10^9	4
	2	10^{15}	10^6	10^6	10^6	10^6	10^8	10^8	10^9	3
	3	10^{15}	10^6	10^6	10^6	10^6	10^8	10^6	10^9	3
	4	10^{15}	10^6	10^6	10^6	10^6	10^6	10^6	10^9	2
	5	10^{15}	10^7	10^7	10^7	10^7	10^7	10^9	10^9	1
	6	10^{15}	10^7	10^7	10^7	10^7	10^7	10^9	10^9	1
	7	10^{15}	10^{26}	---	---	---	---	---	---	---

1 = 0.1% de benzoato de sodio; 2 = 0.1% de sorbato de potasio; 3 = 0.05% de benzoato de sodio + 0.05% de sorbato de potasio; 4 = 0.05% de benzoato de sodio; 5= 0.05% de sorbato de potasio; 6 = 0.025% de benzoato de sodio + 0.025% de sorbato de potasio, 7 = Control.

Escala de Sabor: Ver Tabla Nº 4.



1 = 0.1% de benzoato de sodio; 2 = 0.1% de sorbato de potasio; 3 = 0.05% de benzoato de sodio+ 0.05% de sorbato de potasio; 4 = 0.05% de benzoato de sodio; 5= 0.05% de sorbato de potasio; 6 = 0.025% de benzoato de sodio+ 0.025% de sorbato de potasio.

Figura N° 8: Resultados de la evaluación organoléptica del sabor en las diferentes concentraciones de preservantes en la leche ácida frutada con durazno y chirimoya sin refrigeración. Ayacucho – 2010.

Tabla N° 15: Resultados de la evaluación de la carga microbiana (UFC/ml) en diferentes concentraciones de preservantes en la leche ácida con refrigeración. Ayacucho – 2010.

Leche ácida	Preservante	Días								Escala
		0	5	10	15	20	25	30	35	Sabor
Durazno	1	10^{15}	10^6	10^6	10^9	10^9	10^9	10^9	10^9	4
	2	10^{15}	10^6	10^6	10^9	10^9	10^9	10^9	10^9	5
	3	10^{15}	10^6	10^6	10^9	10^9	10^9	10^9	10^9	4
	4	10^{15}	10^6	10^6	10^9	10^9	10^9	10^9	10^9	1
	5	10^{15}	10^6	10^6	10^9	10^9	10^9	10^9	10^9	2
	6	10^{15}	10^6	10^6	10^9	10^9	10^9	10^9	10^9	2
	7	10^{15}	10^{15}	10^{15}	10^{15}	10^{15}	10^{15}	10^{14}	10^{15}	10^{15}
Chirimoya	1	10^{15}	10^6	10^8	10^8	10^8	10^9	10^9	10^9	5
	2	10^{15}	10^6	10^8	10^9	10^9	10^9	10^9	10^9	1
	3	10^{15}	10^6	10^8	10^9	10^9	10^9	10^9	10^9	2
	4	10^{15}	10^6	10^8	10^9	10^9	10^9	10^9	10^9	2
	5	10^{15}	10^6	10^9	10^9	10^9	10^9	10^9	10^9	1
	6	10^{15}	10^6	10^9	10^9	10^9	10^9	10^9	10^9	2
	7	10^{15}	10^{15}	10^{15}	10^{15}	10^{15}	10^{15}	10^{14}	10^{15}	10^{15}

1 = 0.1% de benzoato de sodio; 2 = 0.1% de sorbato de potasio; 3 = 0.05% de benzoato de sodio + 0.05% de sorbato de potasio; 4 = 0.05% de benzoato de sodio; 5= 0.05% de sorbato de potasio; 6 = 0.025% de benzoato de sodio + 0.025% de sorbato de potasio, 7 = Control.

Escala de Sabor: Ver Tabla N° 4.

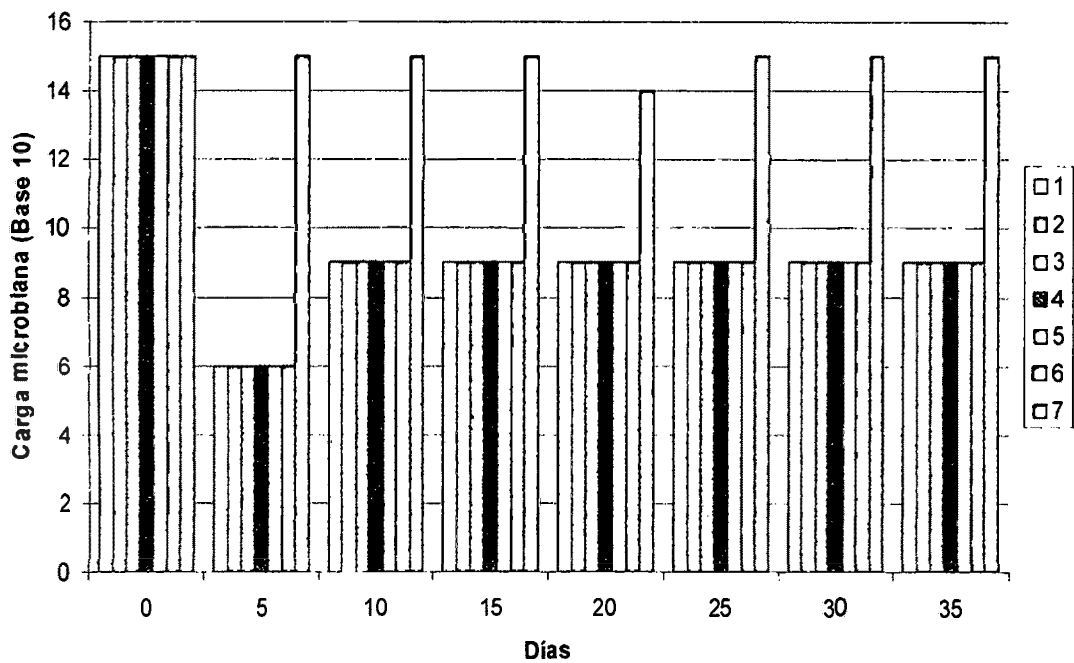


Figura Nº 9: Resultados de la evaluación de la carga microbiana (UFC/ml) en diferentes concentraciones de preservantes en la leche ácida frutada con durazno con refrigeración. Ayacucho– 2010.

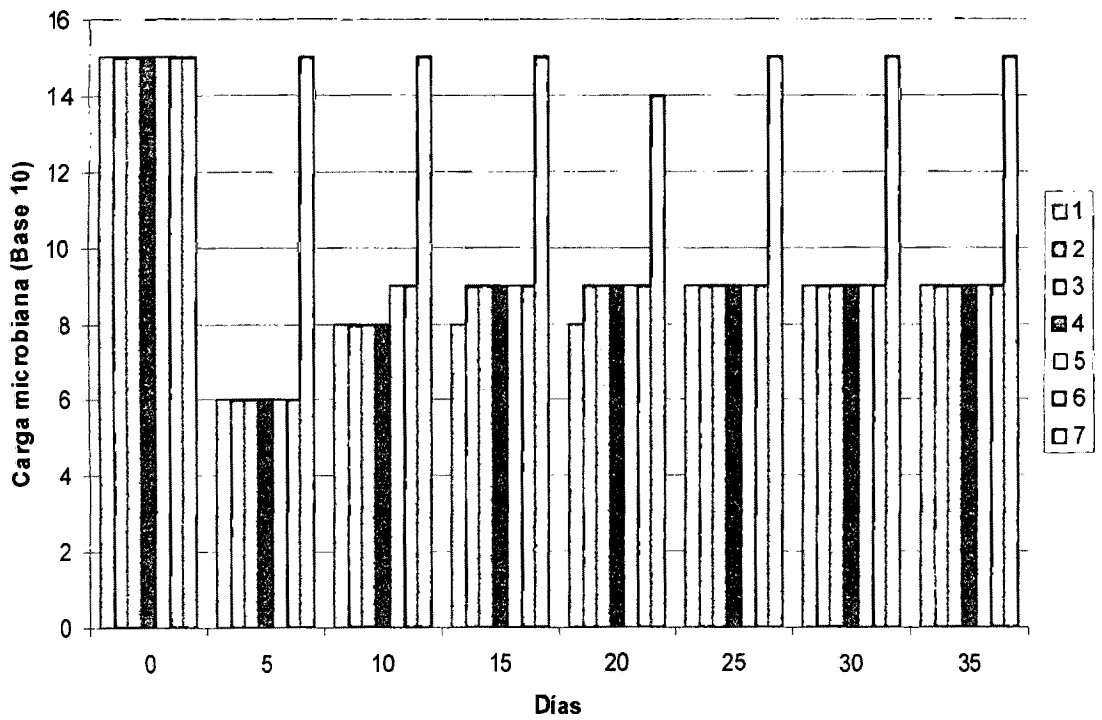
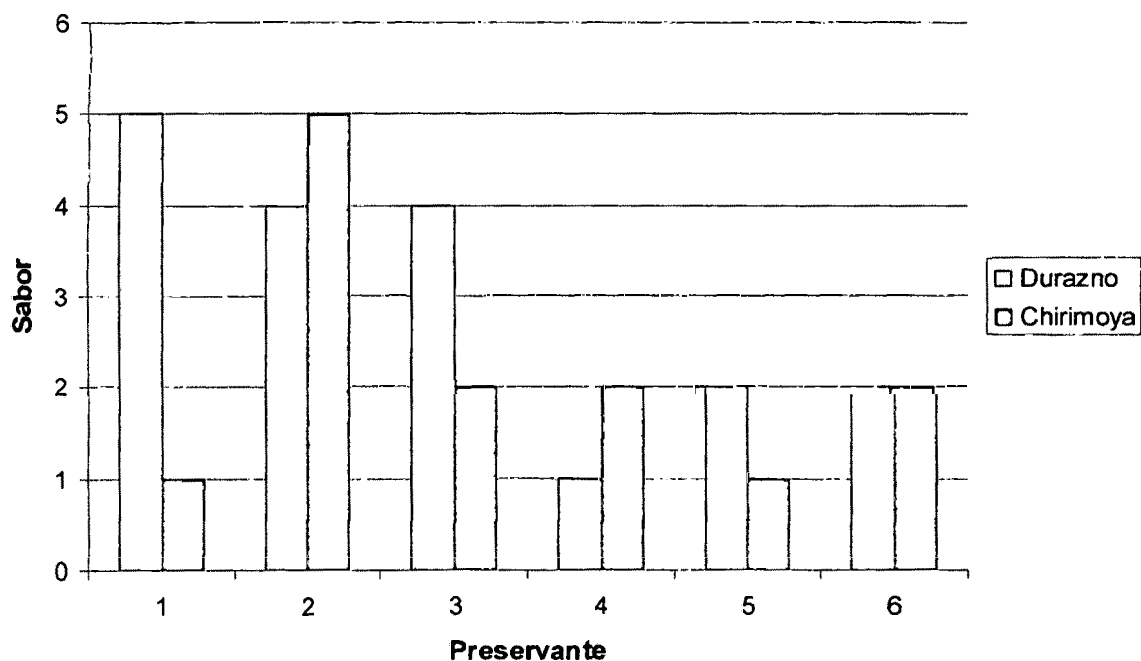


Figura N° 10: Resultados de la evaluación de la carga microbiana (UFC/ml) en diferentes concentraciones de preservantes en la leche ácida frutada con chirimoya con refrigeración. Ayacucho – 2010.



1 = 0.1% de benzoato de sodio; 2 = 0.1% de sorbato de potasio; 3 = 0.05% de benzoato de sodio+ 0.05% de sorbato de potasio; 4 = 0.05% de benzoato de sodio; 5= 0.05% de sorbato de potasio; 6 = 0.025% de benzoato de sodio + 0.025% de sorbato de potasio.

Figura N° 11: Resultados de la evaluación organoléptica del sabor en las diferentes concentraciones de preservantes en la leche ácida frutada con durazno y chirimoya con refrigeración. Ayacucho –2010.

Tabla N° 16: Frecuencia de encuestados de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga según la edad. Ayacucho – 2010.

Edad	Frecuencia	Porcentaje
18 a 23	37	65.4
24 a 39	22	7.4
40 a 50	14	17.3
51 a 60	5	6.2
61 a más	3	3.7
TOTAL	81	100.0

Tabla N° 17: Frecuencia de encuestados de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga según el sexo. Ayacucho – 2010.

Sexo	Frecuencia	Porcentaje
Femenino	26	32.1
Masculino	55	67.9
TOTAL	81	100.0

Tabla N° 18: Frecuencia de encuestados de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga según la ocupación. Ayacucho – 2010.

Ocupación	Frecuencia	Porcentaje
Docente	18	22.2
Estudiante	54	66.7
Trabajador	9	11.1
TOTAL	81	100.0

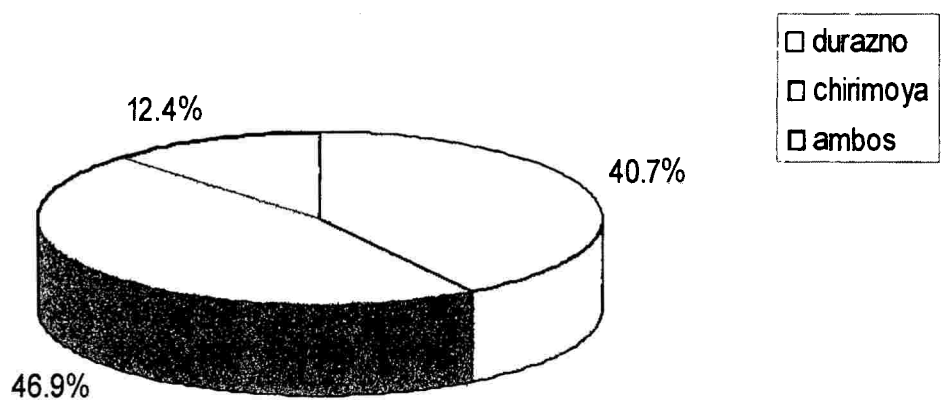


Figura N° 12: Resultados del porcentaje de la preferencia de la leche ácida en sus dos sabores durazno y chirimoya. Ayacucho – 2010.

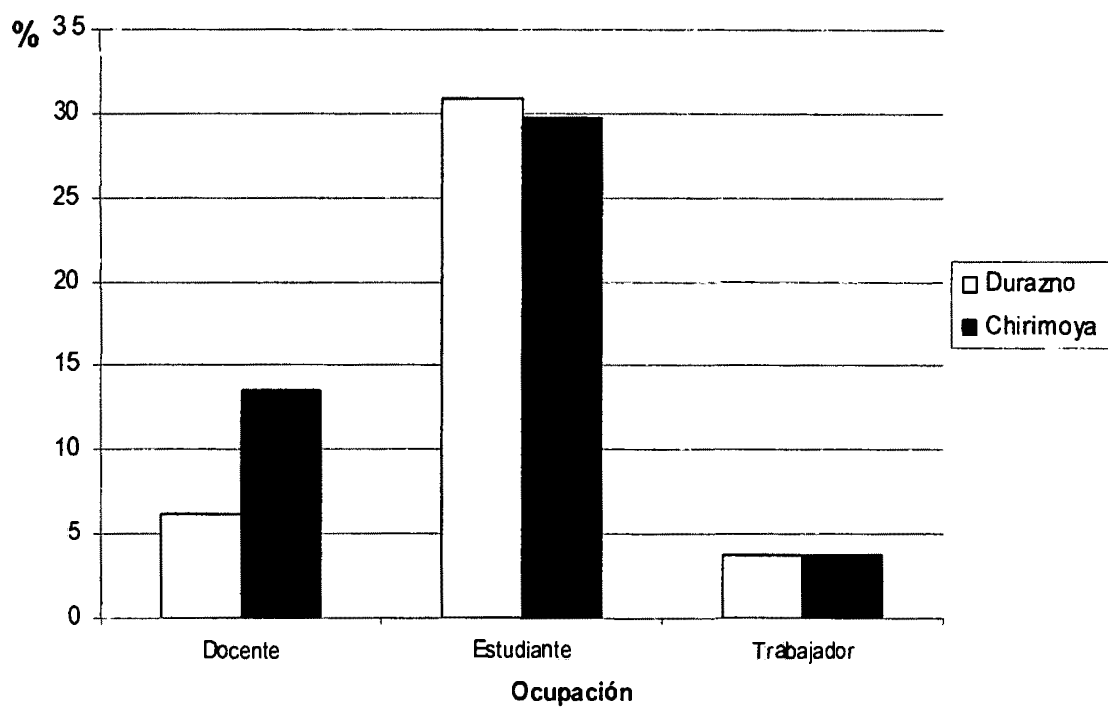


Figura Nº 13: Resultados del porcentaje de la preferencia de la leche ácida en sus dos sabores con respecto a la ocupación. Ayacucho – 2010.

Tabla N° 19: Resultados de la evaluación de las características organolépticas de la leche ácida frutada con durazno y chirimoya. Ayacucho – 2010.

Análisis	Características							
	Consistencia %		Color%		Aroma%		Sabor%	
	D	Ch	D	Ch	D	Ch	D	Ch
Excelente	13.6	19.8	23.5	27.2	12.3	27.2	23.5	29.7
Bueno	60.5	50.6	58.0	50.6	51.9	53.1	56.8	43.2
Regular	25.9	28.4	18.5	22.2	35.8	18.5	19.8	25.9
Malo	0.0	1.2	0.0	0.0	0.0	1.2	0.0	1.2
Muy malo	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
TOTAL	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0

D = Durazno; Ch = Chirimoya.

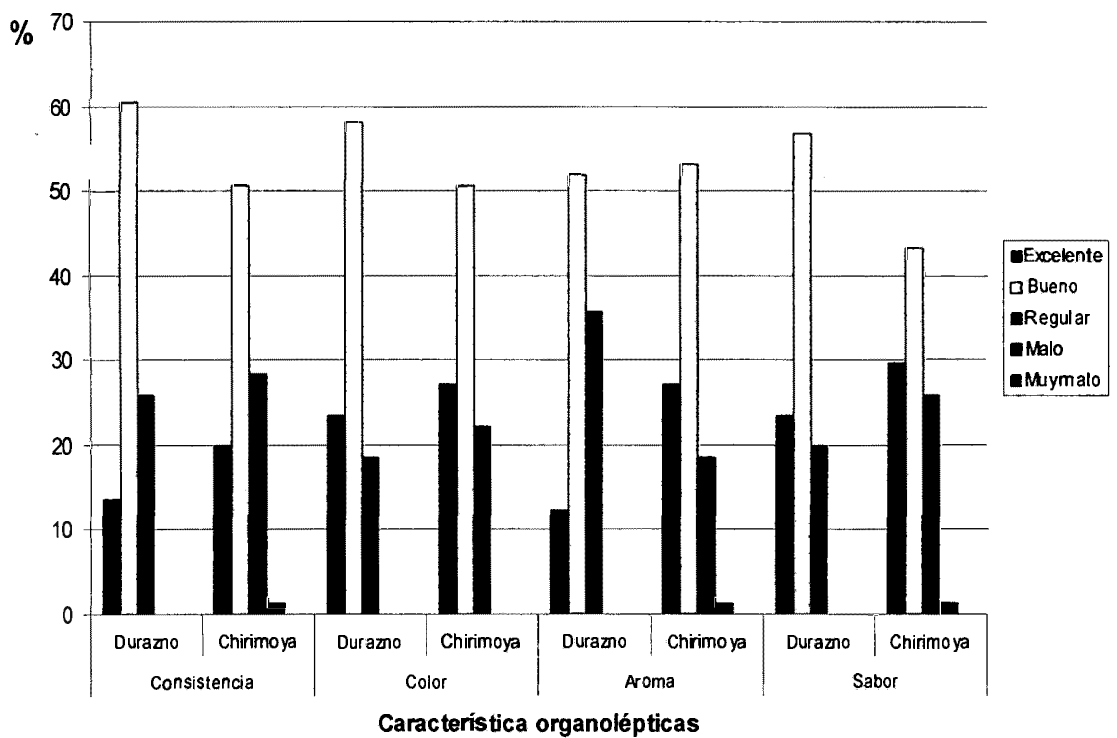


Figura N° 14: Resultados de la evaluación de las características organolépticas de la leche ácida frutada con durazno y chirimoya. Ayacucho – 2010.

V. DISCUSIÓN

La estandarización de la carga microbiana se puede realizar por diferentes métodos como la comparación con la Escala de Mc Farlan (Salcedo, 1993), sin embargo existe otro método como es la medición de la turbidez seguido por el recuento estándar en placa (Huamán, 1986), el cual está basado en la determinación de la turbidez o densidad óptica la cual es proporcional a la masa de las partículas en suspensión (células) y para esto se utiliza un espectrofotómetro; así Flores (2008), haciendo uso de esta técnica para la estandarización de la carga microbiana de *Lactobacillus acidophilus* obtuvo 10^6 UFC/ml a una absorbancia de 0.137 con un periodo de incubación de 4h y para 10^8 UFC/ml de *Lactobacillus acidophilus* una absorbancia entre 0.150 – 0.195 en un periodo de 5 a 6 horas. En el presente trabajo a través de la medición de la absorbancia se obtuvo 10^6 UFC/ml a una absorbancia de 0.136 con un periodo de incubación de 10 minutos; para 10^8 UFC/ml de una absorbancia de 0.245 en un periodo de 15 minutos; y para una concentración de 10^{10} UFC/ml a una absorbancia de 0.305 con un periodo de incubación de 30 minutos (Tabla Nº 5). La limitación de este sistema es que no distingue células

vivas de muertas y que normalmente no es capaz de detectar densidades celulares menores a 10.000 células por mililitro.

Para la elaboración de leche ácida se requiere de mayores conocimientos en la que se necesita obtener una leche que posea las características necesarias para la fermentación (parámetros físico – químicos adecuados), ofrecerle un proceso de pasteurización, entibiarla a una temperatura en la que al inocular la concentración adecuada el lactobacilo esta pueda adaptarse y multiplicarse, para luego fermentarla en un determinado tiempo y temperatura, realizarle un ligero batido y por último refrigerarla (para la formación del ácido).

De esta manera Knaysi (1931), ejecutó un nuevo método en el que utilizó leche descremada pasteurizada, a la cual inoculó el 1% v/v de un cultivo vigoroso de *Lactobacillus acidophilus* y lo dejó incubar entre 37 – 40°C hasta la formación de un coágulo (de 3 a más horas). Mientras que Kosikowski (1977), y Lang y Lang (1975) reportaron que entre 8 y 18 h con un inóculo entre 1 a 5% v/v y a una temperatura de 38 °C se obtiene leche acidófila con una acidez de 100. En tanto que Hernández (2005) elaboró leche ácida, en la que utilizó leche UHT, una cepa de *Lactobacillus acidophilus* del cultivo VIVOLAC con una dosis recomendada por el proveedor, con una temperatura de incubación en termo de entre 42 – 45 °C. Después de la fermentación ésta leche alcanzó un pH final de 4.8 con 70° Dornic, sin embargo después del baño de agua con hielo y conservada bajo 6 – 10° C durante 12 horas esta llegó a obtener un pH final de 4.5 con una acidez igual a 85 ° Dornic. En nuestro estudio se obtuvo leche ácida al inocular 10⁸ UFC/ml de *Lactobacillus acidophilus*, 45° C y 8 horas de incubación llegando a obtener un producto con una acidez titulable de 90° Dornic

correspondiente a 0.9% de ácido láctico (Tabla Nº 9) y un pH final de 4.5 (Tabla Nº 7). Estadísticamente (ANOVA, Duncan $p > 0.05$) nos indica que el pH varía significativamente de acuerdo con las UFC/ml, tiempo y temperatura de incubación (Tablas Nº 20, 21y 22). Comparando con los trabajos reportados se puede obtener leche ácida en menor tiempo.

La conservación de los productos alimenticios es muy importante para su conservación a través del tiempo ya sea bajo refrigeración (Trammal y Hastings, 1930; y Kupl, 1931) o no. En el presente estudio sobre la conservación sin refrigeración sólo duró unos 5 días y con refrigeración el producto se mantuvo palatable durante 21 a 35 días para todos los sabores (Tablas Nº 10 y 11), la conservación también se vio afectada por el tipo de leche utilizada; en este caso pasteurizada; las cuales tienen como desventaja una baja durabilidad (4 días) por ello es que precisan de refrigeración (Kuklinski, 2003).

Una de las líneas de aplicación de las bacteriocinas de interés en la industria alimentaria se basa en su carácter biopreservativo, es por eso que se requiere desarrollar procesos económicos confiables basados en el uso directo de bacteriocinas en la preservación de los alimentos (Eckner, 1992). Del mismo modo la producción de ácido durante la fermentación impide el crecimiento de microorganismos patógenos al igual que el pH (entre 4 – 5), se menciona que con valores más bajos los microorganismos se tornan más sensibles a otras medidas de control microbiológico. Es posible que estas bacteriocinas presentes en el *Lactobacillus acidophilus*, el ácido láctico producido en la fermentación y el pH final hayan estado ayudando en la conservación de la leche ácida con refrigeración.

Los estudios sobre el análisis bromatológico mostraron tanto para la leche ácida sin frutar (natural) como frutada (Tabla Nº 12) que ambas cumplen con las normas del Codex para leches fermentadas (Tabla Nº 1). En la investigación se obtuvo un porcentaje de proteínas para la leche ácida un total de 4.59% (natural), 4.34% (chirimoya) y 3.57% (durazno) que a comparación con el análisis realizado por Collazos (1993) para el yogurt (igual de 4.1% de proteína) es inferior al obtenido para la leche ácida, sin embargo al comparar con el yogurt de la Empresa Gloria (igual de 5.8% de proteína) ésta se encuentra en menor porcentaje, pero la diferencia no es tan significativa. En cuanto se refiere a grasa, la leche ácida preparada posee un menor porcentaje igual a 1% (natural), 1.5% (chirimoya) y 1.3% (durazno) que a comparación del yogurt de la Empresa Gloria (5.6%). En cuanto al valor calórico el de la Empresa Gloria es mucho mayor (186.0 Kcal) a comparación con nuestra leche ácida preparada (59.92 Kcal. para la leche ácida natural, 105.74 Kcal. la de durazno y 110.74 Kcal. para la de chirimoya). El valor nutricional el cual establece el aporte nutricional que nos proporciona un alimento para ser considerado como ideal (León, 2007), muestra en la leche ácida un alto porcentaje de Kcal. a comparación de Collazos (3.62 Kcal). La variación en los porcentajes de la información nutricional citada, se debe al tipo de pasteurización utilizada, en el caso nuestro utilizamos un tipo de leche pasteurizada en donde la leche es sometida a una alta temperatura (< 85 °C) por un periodo de tiempo corto de 7 minutos; mientras que el yogurt de la empresa Gloria utiliza una leche UHT (ultra high temperature) es decir pasteurización a una temperatura muy elevada por un periodo muy corto (140 °C por 6 – 10 segundos), la cual posee como ventaja el conservar las características iniciales (como las proteínas) que apenas se ven afectadas por el tratamiento y llegando hasta 6 meses sin refrigeración (Kuklinski, 2003).

Los resultados de los índices microbiológicos para la leche ácida denotan, excelente calidad higiénica sanitaria (Tabla N° 13) durante el periodo evaluado, esto es debido probablemente a la presencia de bacteriocinas las cuales ejercen una acción bactericida a bacterias susceptibles inhibiendo el crecimiento de estas bacterias patógenas, por ello es que son tan atractivos como agente potenciales para preservar los alimentos (Torres, 2000) y a la formación del ácido láctico en la fermentación (Sreekumar y Hozono, 2000). Por lo tanto la leche ácida elaborada cumple con las normas establecidas para leches fermentadas del Codex Alimentarius (CAC/GL– 21 (1997)) (Tabla N° 2).

El análisis de la leche ácida con y sin refrigeración haciendo uso de preservantes (Tabla N° 14 y 15) dio a conocer que a pesar de que se haya analizado dos tipos de preservantes bajo sus diferentes concentraciones (Tabla N° 3) aún exista la necesidad de hacer uso de otros tipos de preservantes. Del estudio se observó que los preservantes mantenían estable el número de células de *Lactobacillus acidophilus* durante el tiempo analizado, sin embargo a una concentración menor igual a 0.5% el producto no fue bien conservado contaminándose con mohos. Los mejores resultados se observaron a una concentración de 0.1% de sorbato de potasio y 0.1% de benzoato de sodio para la leche ácida frutada con durazno puesta bajo refrigeración y sin refrigeración respectivamente. Para la leche ácida frutada con chirimoya el mejor resultado se observó bajo 0.1% de benzoato de sodio (leche ácida con y sin refrigeración) (Figuras N° 8 y 11).

Las pruebas de degustación son utilizadas con el fin de introducir al mercado un nuevo producto (Lees, 1982). Si se requiere que los resultados sean válidos y significativos el número de entrevistados deben ser por lo menos de 80

personas. Con estas referencias se realizó la encuesta a un público heterogéneo (81 en total) cuyas edades oscilan de 18 – 71 años (Tabla Nº 16) entre varones y mujeres (Tabla Nº 17) cuya ocupación abarcaba de entre docentes, estudiantes y trabajadores (Tabla Nº 18) de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga para poder observar el grado de aceptabilidad en el público. De ello se observó que el sabor a preferir entre el público encuestado fue la leche ácida frutado con chirimoya (46.9%) (Figura Nº 12) del total el sabor que más preferían los docentes fue la chirimoya, los estudiantes prefirieron el durazno y en cuanto se refiere a los trabajadores pues se dividió entre ambos en porcentajes iguales (Figura Nº 13). Es notable observar que los docentes son más exigentes que los demás degustadores esto debido a la experiencia que poseen. En cuanto se refiere a la evaluación de las características organolépticas (Tabla Nº 4) se tuvo una alta calificación sensorial de entre bueno a excelente para los sabores de durazno y chirimoya (Tabla Nº 19 y Figura Nº 14).

Mientras que Hernández (2005) en su estudio de degustación de la leche ácida presentada en dos tipos de sabores (durazno y zarzamora) en donde participaron 59 personas del total 81.7% eran estudiantes, 10% empleados, 3.3% profesores y 5% tesisistas, todos de la Universidad Autónoma Chapingo - México. El autor se basó en el empleo de una escala de 6 categorías: excelente, muy bueno, bueno, regular, malo y muy malo a lo cual sólo consideramos la escala de 5 (excelente, bueno, regular, malo y muy malo). Sus resultados mostraron para sabor que la leche ácida tuvo una calificación sensorial de bueno a excelente para ambos sabores. No se observó diferencias entre ambos trabajos en cuanto se refiere a las características organolépticas analizadas en la leche ácida.

Como resultado de la encuesta se podría revelar que es posible la introducción de este nuevo producto debido a su agradable sabor (cuando es adicionada la pulpa de frutas o sólo con la adición de un cierto porcentaje de azúcar) y sus efectos benéficos que posee este producto probiótico ya mencionado anteriormente con diferentes estudios realizados.

VI. CONCLUSIONES

1. Se logró optimizar los parámetros para la elaboración de leche ácida con 10^8 UFC/ml de *Lactobacillus acidophilus*, con un período de incubación de 8 h a 45 °C. Lográndose un producto con un pH final de 4.5 y una acidez titulable de 90 °D.
2. Se logró optimizar los parámetros para el empleo de dos tipos de preservantes (benzoato de sodio y sorbato de potasio) por un periodo de 35 días el cual oscilo en crecimiento entre 10^6 - 3×10^9 UFC/ml de *Lactobacillus acidophilus*, en cuanto se refiere a la conservación del sabor los mejores fueron, para el durazno 0.1% de sorbato de potasio y 0.1% de benzoato de sodio y para la chirimoya 0.1% de benzoato de sodio.
3. Se realizó el control de calidad microbiológico y físico - químico encontrándose en los rangos establecidos por las normas. En cuanto al tiempo de vida anaquel se observó que la conservación del producto es mejor bajo refrigeración que sin ella. La leche ácida sin frutar con refrigeración se conservó por un periodo de 35 días, la leche ácida frutada con durazno 25 días y la leche ácida frutado con chirimoya 21 días. Todas las leches ácidas sin refrigeración se conservaron por 5 días.

VII. RECOMENDACIONES

1. Realizar estudios *in vivo* del producto elaborado para poder determinar los beneficios que ofrece esta cepa de *Lactobacillus acidophilus* dentro del tracto intestinal.
2. Realizar más análisis con otros tipos de preservantes tanto químicos como hacer uso de bioconservantes (bacteriocinas).

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Alais, Ch.** 1970. Ciencia de la Leche: Principios de técnica lechera. Edit. Lengua Española. DF – México.
2. **Alm, L.** 1982. Effect of fermentation on lactose, glucose and galactose content in milk and suitability of fermented milk products for lactose intolerant individuals. J, Dairy Sci. 65:3.
3. **Anderson, J., Stanley, M. and Gilliland, S.** 1999. Effect of ferment milk (yogurt) containing *Lactobacillus acidophilus* L1 on serum cholesterol in hypercholesterolemic humans. Journal of the American College of Nutrition. Vol. 18 (1): 43– 50.
4. **A.O.A.C.** 1980. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. Association of official analytical chemists. 3th edit. Washington.
5. **Codex Alimentarius.** 2003. Norma del Codex para Leches fermentadas. Codex Stan 243 – 2003. Sede Roma – Italia.
6. **Codex Alimentarius.** 2007. Leche y productos lácteos. Código de Prácticas de Higiene para la leche y productos lácteos. 1ª edic. Roma – Italia.
7. **Collazos, C., White, P., White, H., Viñas, E., Alvistur, E., Urquieta, R., Vasquez, J., Días, C., Quiroz, A., Roca, A., Hegsted, M., Bradfield, R., Herrera, N., Faching, A., Robles, N., Hernández, E. y Arias, M.** 1993. La composición de alimentos de mayor consumo en el Perú. 6ª edición. Ministerio de Salud. Instituto Nacional de Nutrición. Perú.
8. **Contardo, V., Bustamante, G. y Rodrigues, J.** 2005. Probióticos en niños con diarrea aguda. Rev. Ped. Elec. Vol. 2 (3):32 – 35.

9. **De las Cagigas, A. y Blanco, J.** 2002. Prebióticos y probióticos, una relación beneficiosas. *Revista Cubana Aliment Nutr.* 16(1): 63 – 68.
10. **Eckner, K.** 1992. Bacteriocins and food applications. *Dairy Food Environ. Sanit.* 12: 204 – 209.
11. **El Peruano.** 2003. Criterios Microbiológicos de Calidad Sanitaria e Inocuidad para los Alimentos y Bebidas de Consumo Humano. Tomo 325.28 de Junio. Pp. 246849.
12. **Engleberg, N.** 2009. Chronic fatigue syndrome. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, eds. *Principies and Practice of Infectious Diseases.* 7th ed. Philadelphia, Pa: Elsevier Churchill Livingstone: chap 131.
13. **Canadian Dairy Commission.** 2007. Fermented Milk Products. Consultado el 01 de mayo de 2010.
14. **Fernandes, D., Shahani, K. and Amer, M.** 1987. Therapeutic role of dietary lactobacilli fermented diary products. *FEMS Microbiology Review.* 46: 343 – 356.
15. **Flores, M.** 2008. Actividad probiótica del “yacón” *Smallantus sonchifolia* en el crecimiento poblacional del *Lactobacillus acidophilus* en ratas wistar. Ayacucho 2006. Tesis para optar el título profesional de Químico farmacéutica. Facultad de Ciencias Biológicas. UNSCH. Perú.
16. **Gilliland, S.** 1989. Acidophilus milk: products: A review of potential benefits to consumers. *Journal Dairy Science* 72: 2483 – 2494.
17. **Gilliland, S.** 1998. Fermented milks and probiotics. In: “Applied Dairy Microbiology” (Marth E. y Steele J., Eds.) Marcel Dekker, Inc., New York- USA.

18. **Gilliland, S.** 2000. Fermented milks and probiotics. En: "2° Simposio Mexicano de probiótico y prebióticos". 8 – 9 de junio. Guadalajara – México.
19. **Gomes, J.** 2006. Probiótico. Boletín Microbiología en Protección de Alimentos. UDES – Colombia.
20. **Hernández, E.** 2005. Evaluación de la calidad fisicoquímica y sensorial de una leche probiótica fermentada con *Lactobacillus acidophilus*. Tesis de Licenciatura. Departamento de Ingeniería Agroindustrial. UACH. Chapingo – México.
21. **Huamán, A.** 1986. Guía de práctica de microbiología de alimentos. Facultad de Ciencias Biológicas. UNSCH. Ayacucho – Perú.
22. **Jagnow, G. y Dawid, W.** 1991. Biotecnología: Introducción con Experimentos Modelo. Edit. Acribia. Zaragoza – España.
23. **Knaysi, G.** 1931. An Economical Method of Producing *Acidophilus* Milk. Department of dairy industry. Cornell University. Ithaca – USA.
24. **Kosikowski, F.** 1977. Cheese and fermented milk foods. 2nd Edition. Edward Brothers Inc. Michigan – USA.
25. **Krebs, H., Wiggins D. and Stubbs, M.** 1983. Studies on the mechanism of the antifungal action of benzoate. *Biochem J* (214): 657-663.
26. **Kuklinski, C.** 2003. Nutrición y Bromatología. Ediciones Omega. España.
27. **Kulp, W.** 1931. Studies on the viability of *Lactobacillus acidophilus* in "Acidophilus milk". *Amer. J. of Dairy Sci.* 14:198.

28. **Lang, F. and Lang N.** 1975. Acidophilus milk products: little known cultured milks of great potential. In: "Milk Industry". Vol. 77, N° 3.
29. **Larpent, J.** 2006. Las Bacterias Lácticas. Departamento de Microbiología Alimentaria. Universidad de Navarra. España.
30. **Lees, R.** 1982. Análisis de los Alimentos: Métodos Analíticos y de Control de Calidad. Editorial Acribia. 2º Edic. España.
31. **León, E.** 2007. Guía de Prácticas de Bromatología y Nutrición. Facultad de Ciencias Biológicas. UNSCH. Ayacucho – Perú.
32. **Mac Faddin, J.** 1997. Pruebas Bioquímicas para la Identificación de Bacterias de Importancia Clínica. Editorial médica Panamericana. 3ª edic. Buenos Aires - Argentina.
33. **Madigan, M., Martinko, J. y Parker, J.** 2004. Brock Biología de los Microorganismos. Editorial Prentice Hall. 10ª edic. España.
34. **Mahaut, M., Jeantet, R., Brulé, G. y Schuck, P.** 2004. Productos Lácteos Industriales. Edit. Acribia. Zaragoza – España.
35. **Mann, G. and Spoerry, A.** 1974. Studies of a surfactant and cholesterolemia in the Massai. Am. J. Clin. Nutr. 27:464 – 469.
36. **Martínez, M., Pacho, S., Vicario, S. y Cutuli, T.** 2007. Probióticos: Potencial para prevenir y curar. Revista Complutense de Ciencias Veterinarias 1(2): 573 – 583.
37. **Milke, P.** 2000. Flora intestinal y salud. En: "2º Simposio Mexicano de probiótico y prebióticos". 8 – 9 de junio. Guadalajara – México.
38. **Mitsuoka, T.** 1990. Bifidobacteria and their roce in human health. **S.** Microbiology. 6: 263 - 287.
39. **Murao, N., Igaki, K., Hasebe, H. Kaseko, T. and Susuki, A.** 1992. Differences in breath hydrogen excretion and abdominal symptoms

after ingestion of milk and yogurt by lactose – intolerant individuals.
J. Jpn. Soc. Nutr. Food Sci. 45: 507 – 512.

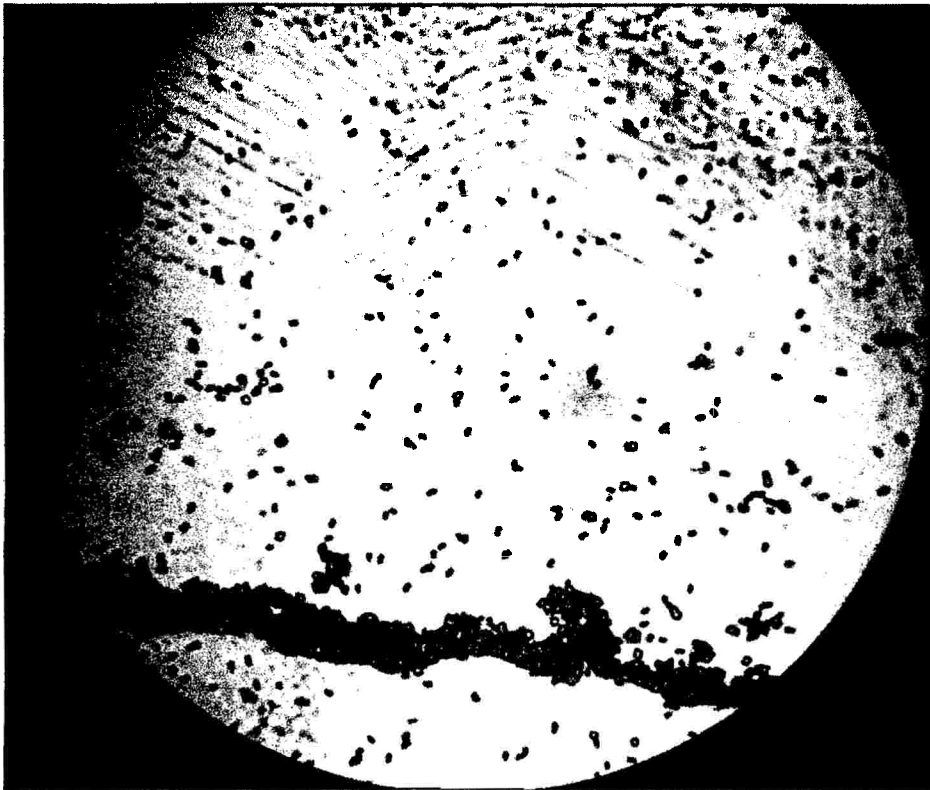
40. **Mustapha, A., Jiang, T. and Saviano, D.** 1997. Improvement of lactose digestion by humans following ingestion of unfermented acidophilus milk: Influence of bile sensitivity, lactose transport and acid tolerance of *Lactobacillus acidophilus*. J. Dairy Sci. 80: 1537 – 1545.
41. **Ouwehand, A., Salminen, S. and Isolauri, E.** 2002. Probiotics: an overview of beneficial effects. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 82:279 – 289.
42. **Parvez, S.** 2006. Probiotics and their fermented food are beneficial for health. *Journal of Applied Microbiology* 100:1171 – 1185.
43. **Requena, T. y Peláez, C.** 2005. Leches fermentadas probióticas. Instituto del Frío. Departamento de Ciencia y tecnología de productos lácteos.
44. **Salcedo, D.** 1993. La microbiología clínica y el laboratorio bioquímico. 1ª Edición. Editorial Gráfica Impresiones. Lima – Perú.
45. **Salminen, S., Deighton, M., Benno, Y. and Gorbach S.** 1998. Lactic acid bacteria in health and disease. In: "Lactic Acid Bacteria" 2nd. Edition (Salminen S: y von Wright A, Eds.) Marcel Dekker. Inc., New York – USA.
46. **Sellars, L. and Babel, J.** 1978. Cultures for the manufacture of dairy products. Chr. Hansen's laboratory Inc. Winsconsin, USA.
47. **Seminario, J.** 2003. El yacón: Fundamentos para el aprovechamiento de un recurso promisorio. Perú.

48. **Silva, M., Jacobus, N., Deneke, C. and Gorbach, S.** 1987. Antimicrobial substances from a human *Lactobacillus* strain. In: Antimicrobial agents and Chemoteraphy. 31: 1231- 1233.
49. **Shahani, K., Vakil, J. and Kilara, A.** 1977. Natural antibiotic activity of *Lactobacillus acidophilus* and *bulgaricus* II. Isolation of acidophilin from *L. acidophilus*. Cult. Dairy Prod. J. 12:8
50. **Sofos, J. and Busta, F.** 1993. Sorbic acid and sorbates. In: Antimicrobials in foods. G. A. Davidson Ed. NewYork, NY:Marcel Dekker, Inc. pp. 49-94.
51. **Sreekumar, O. and Hosono, A.** 2000. Immediate effect of *Lactobacillus acidophilus* on the intestinal flora fecal enzymes of rats and the *in vitro* inhibition of *E. coli* en coculture. Journal Dairy Science, 83:931 – 939.
52. **Sullivan, A., Nord, C. and Evengard, B.** 2009. Effect of supplement with lactic – acid producing bacteria on fatigue and physical activity in patients with chronic fatigue syndrome. Nutritional Journal Vol. 8:4.
53. **Torres, R.** 1991. Flora Intestinal, Probióticos y Salud. Edit Gráfica Nueva. Yakult. Guadalajara – México.
54. **Torres, R.** 2000. Microbiología de las bacterias con características probióticas. En: “2º Simposio Mexicano de probiótico y prebióticos”. 8 – 9 de junio. Guadalajara – México.
55. **Trammal, H. and Hastings, E.** 1930. Lower storage temperature better for Acidophilus milk. Annual Rpt. Wis. Agr. Exp. Sta.
56. **URL1: Cosmotienda.** <http://www.cosmotienda.com>.
57. **URL2:** <http://www.porquebiotecnologia.com.ar>
58. **URL3:** <http://www.alimentacion-sana.com.ar>

59. **Velazquez, O., Lederrer, H. and Rombean, J.** 1996. Butyrate and the colonocyte. Implications for neoplasia. *Dig. Dis. Sci.* 41:727 – 739.
60. **Villegas, A., Hernández, N. y Santiago, O.** 2006. La leche acidófila: revisión de gran potencialidad en México. Alfa Editores Técnicos.
61. **Walstra, T., Geurts, A., Noonen, A., Jellena, A. y van Boekel, M.** 2001. *Ciencia de la Leche y Tecnología de los Productos Lácteos.* Editorial Acribia, S.A. Zaragoza – España.
62. **Watkins, B. and Millar, B.** 1983. Competitive gut exclusion of avian pathogens by *Lactobacillus acidophilus* in gnotobiotic chicks. *Poult. Sci.* 62:1772 – 1779.

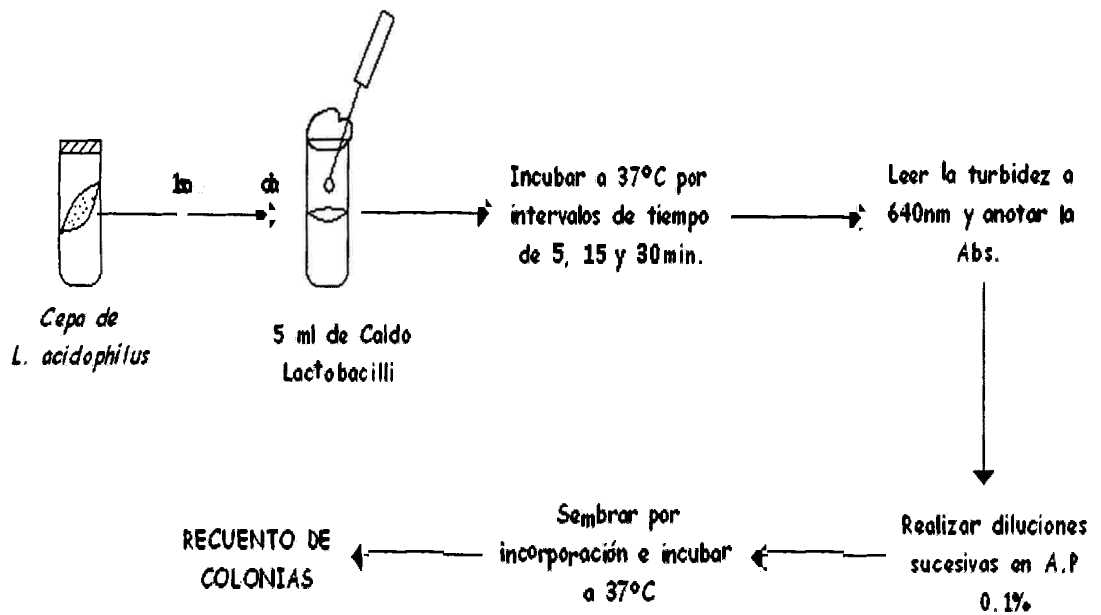
ANEXOS

ANEXO Nº 1



Fotografía Nº 1: Microfotografía de la cepa *Lactobacillus acidophilus*

ANEXO Nº 2

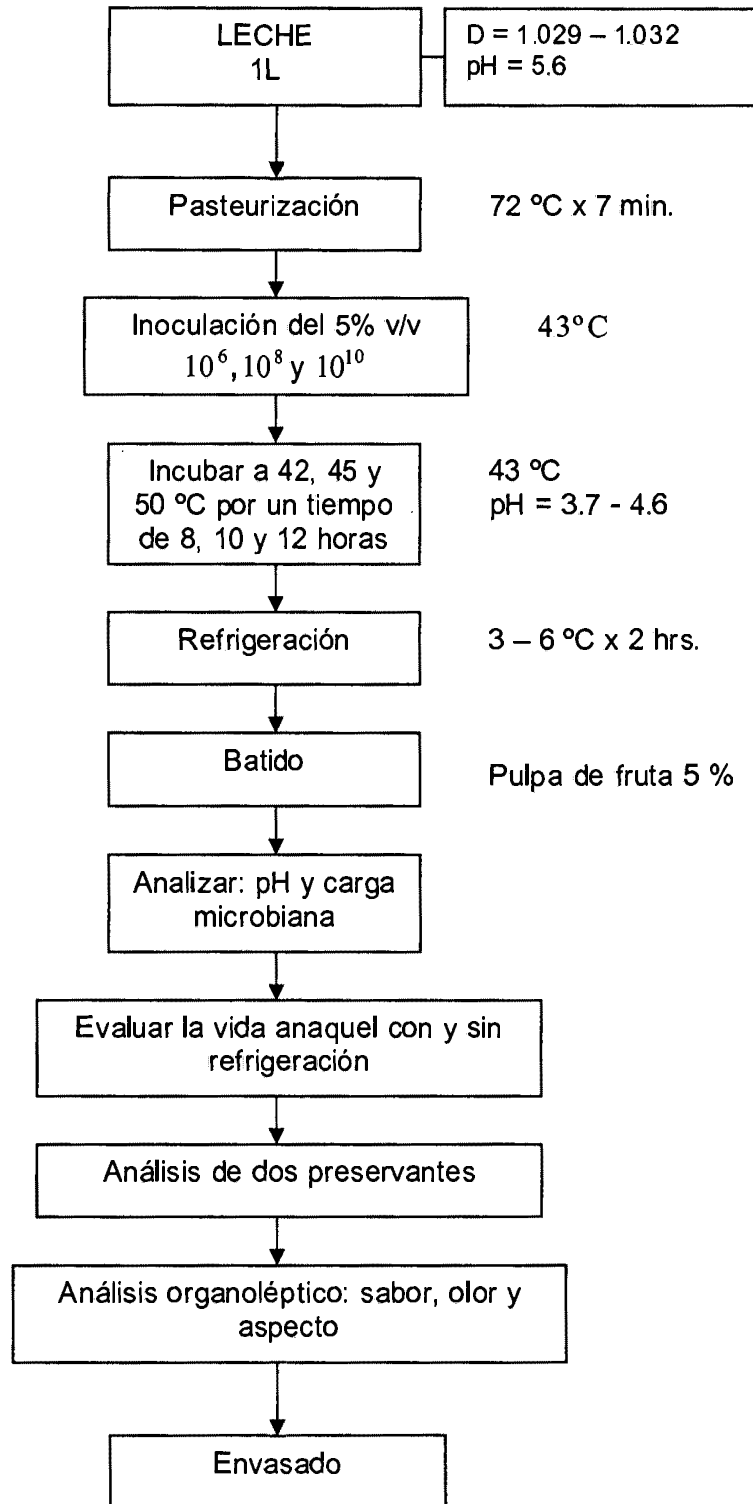


Referencia: Elaboración propia.

Figura Nº 15: Flujograma de la estandarización de la carga microbiana

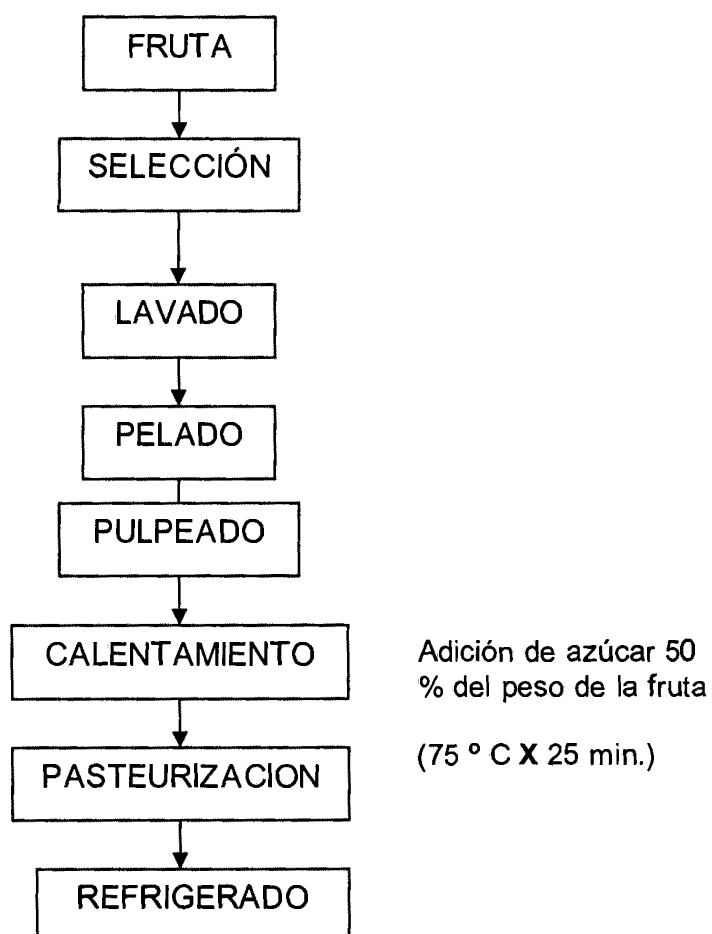
ANEXO Nº 3

Flujograma para la elaboración de leche ácida



ANEXO N° 4

Flujo de operación para la elaboración de pulpa jarabeada



Fuente: Laboratorio de Química – UNSCH.

ANEXO Nº 6

Tabla Nº 20: Resultados de la evaluación estadística según Duncan del pH final de la leche ácida con respecto a la carga microbiana expresada en ufc/ml de *Lactobacillus acidophilus*

UFC	N	Subconjunto		
		2	3	1
10 E8 UFC/ml	27	4.6519		
10 E10 UFC/ml	27		4.8037	
10 E6 UFC/ml	27			4.8481
Significación		1.000	1.000	1.000

a Usa el tamaño muestral de la media armónica = 27.000

b Alfa= .05.

ANEXO Nº 7

Tabla Nº 21: Resultados de la evaluación estadística según Duncan del pH final de la leche ácida con respecto a la temperatura de incubación

Temperatura	N	Subconjunto		
		2	3	1
45°C	27	4.6185		
50°C	27		4.7741	
42 °C	27			4.9111
Significación		1.000	1.000	1.000

a Usa el tamaño muestral de la media armónica= 27.000

b Alfa= .05.

ANEXO N° 8

Tabla N° 22: Resultados de la evaluación estadística según Duncan del pH final de la leche ácida con respecto al tiempo de incubación

	Tiempo	N	Subconjunto	
			2	1
Duncan(a,b)	8 h	27	4.7370	
	10 h	27		4.7815
	12 h	27		4.7852
	Significación		1.000	.849

a Usa el tamaño muestral de la media armónica= 27.000

b Alfa= .05.

ANEXO Nº 9

Encuesta para la aceptación de la leche ácida

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL DE HUAMANGA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

E.F.P. BIOLOGÍA - ESPECIALIDAD DE BIOTECNOLOGÍA

ENCUESTA: ACEPTACIÓN DEL PRODUCTO FINAL "LECHE ÁCIDA"

Sexo: F () M () Edad:.....

Docente () Estudiante () Trabajador ()

Consistencia D () Ch ()	Aroma D () Ch ()	ColorD () Ch()	Sabor D () Ch ()
5 = Excelente	5 = Excelente	5 = Excelente	5 = Excelente
4 = Bueno	4 = Bueno	4 = Bueno	4 = Bueno
3 = Regular	3 = Regular	3 = Regular	3 = Regular
2 = Malo	2 = Malo	2 = Malo	2 = Malo
1 = Muy malo	1 = Muy malo	1 = Muy malo	1 = Muy malo

D = Durazno Ch = Chirimoya

MATRIZ DE CONSISTENCIA

TÍTULO	PROBLEMA	OBJETIVOS	MARCO TEÓRICO	VARIABLES	METODOLOGÍA
<p>Optimización de parámetros para la elaboración de leche ácida con <i>Lactobacillus acidophilus</i>.</p>	<p>¿Cuáles serán los parámetros óptimos para la elaboración de la leche ácida usando <i>Lactobacillus acidophilus</i>?</p>	<p>General: Optimizar los parámetros para la elaboración de leche ácida con <i>Lactobacillus acidophilus</i>.</p> <p>Específico:</p> <ol style="list-style-type: none"> Optimizar el empleo del tipo y concentración de preservantes. Realizar el control de calidad del producto elaborado. 	<p>Antecedentes</p> <p>Leche ácida</p> <ul style="list-style-type: none"> Historia Efectos benéficos de la leche ácida Características físico – químicas y microbiológicas Normalización <p>Optimización de los parámetros de fermentación</p> <p>Definición de conceptos</p> <ul style="list-style-type: none"> Prebióticos. Probióticos. - <i>Lactobacillus acidophilus</i> Preservantes - Sorbato de potasio - Benzoato de sodio 	<p>Variable Independiente: Parámetros de fermentación</p> <p>Indicadores Temperatura: 42, 45 y 50°C. Tiempo de incubación: 8, 10 y 12h.</p> <p>Variable dependiente: Leche ácida</p> <p>Indicador Sabor Aroma Aspecto Consistencia UFC/ml pH</p>	<p>Población: Cepa de <i>Lactobacillus acidophilus</i>.</p> <p>Metodología: Se estandarizará la carga microbiana, luego se realizará la optimización de los parámetros para la elaboración de leche ácida, luego la elaboración de pulpa jarabeada, luego se realizará el análisis bromatológico y el control de calidad; y finalmente se realizará una encuesta para la aceptación del producto final.</p> <p>Análisis estadístico: Los resultados obtenidos serán sometidos a un análisis de varianza factorial AxBxC (3x3x3) con un nivel de significancia de $\alpha = 0.05$, donde: A= UFC/ml (10^{10}, 10^8 y 10^6) B= Temperatura (42, 45 y 50°C) C= Tiempo de incubación (8, 10 y 12 horas) Para el resultado de las encuestas se aplicarán tablas y cuadros de frecuencias.</p>

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

R.D Nº 233–2010– FCB– D

Bach. Katherin Ruth Taco Quispe

En la ciudad de Ayacucho, siendo las once y diez de la mañana del día jueves seis de enero del año dos mil once en el auditorio del Vice rectorado Académico de la Universidad nacional de San Cristóbal de Huamanga, reunidos bajo la presidencia del Master en Ciencias Elmer Ávalos Pérez como Decano de la Facultad de Ciencias Biológicas y la asistencia de los miembros: Magister Fidel Mujica Lengua; Bióloga Sonia palomino Felices; Magister Paula García Godos Alcázar (Asesora); Magister Vidalina Andía Ayme (Cuarto jurado), actuando como secretaria docente la Magister Maricela López Sierralta para recopiar la Sustentación de Tesis: Optimización de parámetros para la elaboración de leche ácida con *Lactobacillus acidophilus*, presentado por la Bachiller Katherin Ruth taco Quispe, quien pretende optar el título profesional de Bióloga en la Especialidad de Biotecnología.

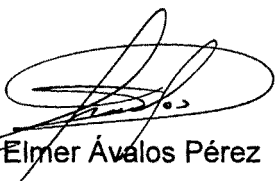
El Decano da inicio al acto de sustentación solicitando a la secretaria docente que; después de verificar los documentos en mesa, de lectura a la Resolución Decana Nº 233 – 2010 – FCB – D luego instruye a la sustentante sobre aspectos relacionados a la exposición del trabajo de investigación autorizando el inicio de la sustentación en el tiempo correspondiente de cuarenta y cinco minutos.

Culminada la exposición se inicia la segunda etapa en la que el jurado calificador realizará las observaciones y preguntas que crea conveniente. Inicia la ronda de preguntas con la participación de la profesora Sonia Palomino Folices que pregunta sobre: pH; Grados Dornic; preservantes; efectos del alto consumo de Yogurt; La profesora Vidalina Abdía pregunta sobre: leche ácida; leche fermentada; pH; variación del pH en materia prima; variación de densidad; degustación en población variada; cuantificación de encuestas. El profesor Fidel Mujica felicita a la sustentante y evalúa sobre: pasteurización; fermentación; lectura que longitud de onda; luego participa el Decano y cede la palabra a la asesora quien aclara y fundamenta los aspectos que tiene en cuenta.

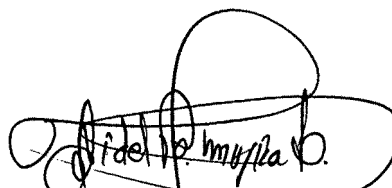
Luego el señor Decano solicita a la sustentante y público en general que abandone el auditorio para que el jurado calificador pueda deliberar y evaluar como sigue:

JURADO CALIFICADOR	Exposición	Respuesta preguntas	Promedio
Mg. Fidel Mujica Lengua	18	18	18
Biga. Sonia Palomino Felices	18	18	18
Mg. Paula García Godos Alcázar	18	18	18
Mg. Vidalina Andía Ayme	17	16	17

Luego de la evaluación la sustentante obtuvo la nota promedio de DIECIOCHO (18) de la cual dan fé los jurados estampando su firma al pie de la presente. Culmina el acto de sustentación siendo la una y quince de la tarde.



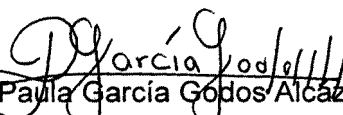
M.S. Elmer Ávalos Pérez
PRESIDENTE



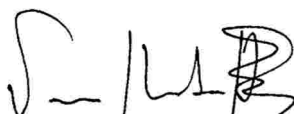
Mg. Fidel Mujica Lengua
MIEMBRO



Iga. Sonia Palomino Felices
MIEMBRO



Mg. Paula García Godos Alcázar
MIEMBRO - ASESOR



J. Vidalina Andía Ayme
CUARTO JURADO



Mg. Marcela López Sierralta
SECRETARIA - DOCENTE