



## V. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1 Estandarización del inóculo

Se separó el microorganismo *Streptococcus thermophilus* del cultivo iniciador liofilizado y de vertido directo "WISBY" (Danisco Cultor Nuebüll GMBH, Busch-Johannsen-Straße 1, D-25899 Neibüi, Alemania) que lo contenía junto con el *Lactobacillus bulgaricus*. Para ello el cultivo iniciador se inoculó en caldo MRS para posteriormente aislar en caja (agar MRS y ST), y separar los microorganismos antes mencionados. Ya separado el microorganismo de interés (*S. thermophilus*) se conservó en cuñas de agar ST en refrigeración (5°C).

La cepa de *Lactobacillus plantarum* NRRL B-4496, fue proporcionada por el Dr. Alejandro P. Rooney del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos, se inoculó en caldo MRS y se sembró en caja con agar MRS para su posterior conservación en cuñas de agar MRS bajo temperaturas de refrigeración (5°C).

### 5.2 Evaluación de medios selectivos

#### 5.2.1 Producción de ácido

Se probará la capacidad de fermentar carbohidratos por medio del estuche de prueba API 50 CH (bioMérieux, Inc., Hazelwood Missouri, EE.UU.). Para la preparación del estuche, el microorganismo se inoculará durante 48 horas en caldo MRS. Se confirmará el tipo de microorganismo analizado de acuerdo a los resultados obtenido, comparando con las tablas y software del equipo API 50 CH (bioMérieux, Inc. Hazelwood Missouri, EE.UU.).

---

---



### 5.2.1.1 API 50.

API es un sistema manual miniaturizado considerado estándar a escala mundial en la identificación de bacterias y levaduras en género y especie. Consta de galerías de generalmente 20 pruebas bioquímicas miniaturizadas relacionadas con una amplia base de datos a través de la cual se obtiene la identificación del microorganismo estudiado (BIOMERIEUX, 2005).

La realización de la identificación microorganismos de es sencilla, rápida y fácil. Se requiere el adecuado aislamiento de una colonia por el método tradicional, a partir de esto se realiza una suspensión bacteriana en solución salina o agua destilada, se estandariza el inóculo en unidades MacFarland y se procede a la inoculación de cada una de las pruebas bioquímicas de la galería, para incubarse durante 18 a 24 horas, posteriormente a lo cual se hará la interpretación de los resultados de cada prueba, para obtener un bionúmero (de 7 dígitos), el cuál será el que nos de la identificación final en género y especie al ser comparado con la base de datos a través de un software en línea. API maneja un tipo de galería para cada grupo o familia bacterianos con pruebas bioquímicas especiales para cada uno de ellos, lo que lo hace muy específico en la identificación en género y especie.

API 50 permite el estudio del metabolismo de 49 carbohidratos y está adaptada para la identificación de *Lactobacillus* en 48 horas (BIOMERIEUX, 2005).

### 5.2.2 Medios selectivos

De acuerdo a Dave y Shah (1996), las condiciones para crecimiento adecuado para el microorganismo *S. thermophilus* es en Agar ST, cuyas especificaciones se mencionan en la tabla X, y de acuerdo con los datos proporcionados por Maní (2005), reporta que el medio en el que mejor se desarrolla el *L. plantarum* es el Agar MRS.

---

---

**Tabla X.** Medios selectivos para *S. thermophilus* y *L. plantarum*

<b>Nombre del agar</b>	<b>Ingredientes /condiciones</b>	<b>Crecimiento</b>
Agar ST	10 g de triptona, 10 g de sacarosa, 5 g de extracto de levadura, 0.2 g de K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 12 g de agar y 6 mL de solución de púrpura de bromocresol al 0.5% en 1 L de agua. Se incuba aerobio a 37 °C por 24 h.	<i>S. thermophilus</i> forma colonias con halo amarillo.
Agar MRS	Se prepara con 70 g de agar en 1 L de agua, se hierve durante un minuto previo a la esterilización. Se incuba anaerobio a 37 °C por 48 h.	El crecimiento de <i>L. plantarum</i> es en forma de colonias blancas algodonadas.

### 5.3 Curvas de crecimiento en sistemas modelo

En 100 mL de caldo MRS se inoculó 1 mL de agua peptonada que contenía una población de  $10^3$  de *S. thermophilus* y 1 mL de la misma solución pero conteniendo una población de  $10^3$  de *L. plantarum*. Se procedió a incubar el caldo y durante la incubación se tomaron muestras de 1 mL a los siguientes tiempos: 1, 2, 4, 6, 10, 16, 24, 38, 43 y 48 h. Se sembraron las diluciones adecuadas de acuerdo al crecimiento en agar MRS y ST y se graficó la curva de crecimiento.





## 5.4 Curvas de crecimiento en leche

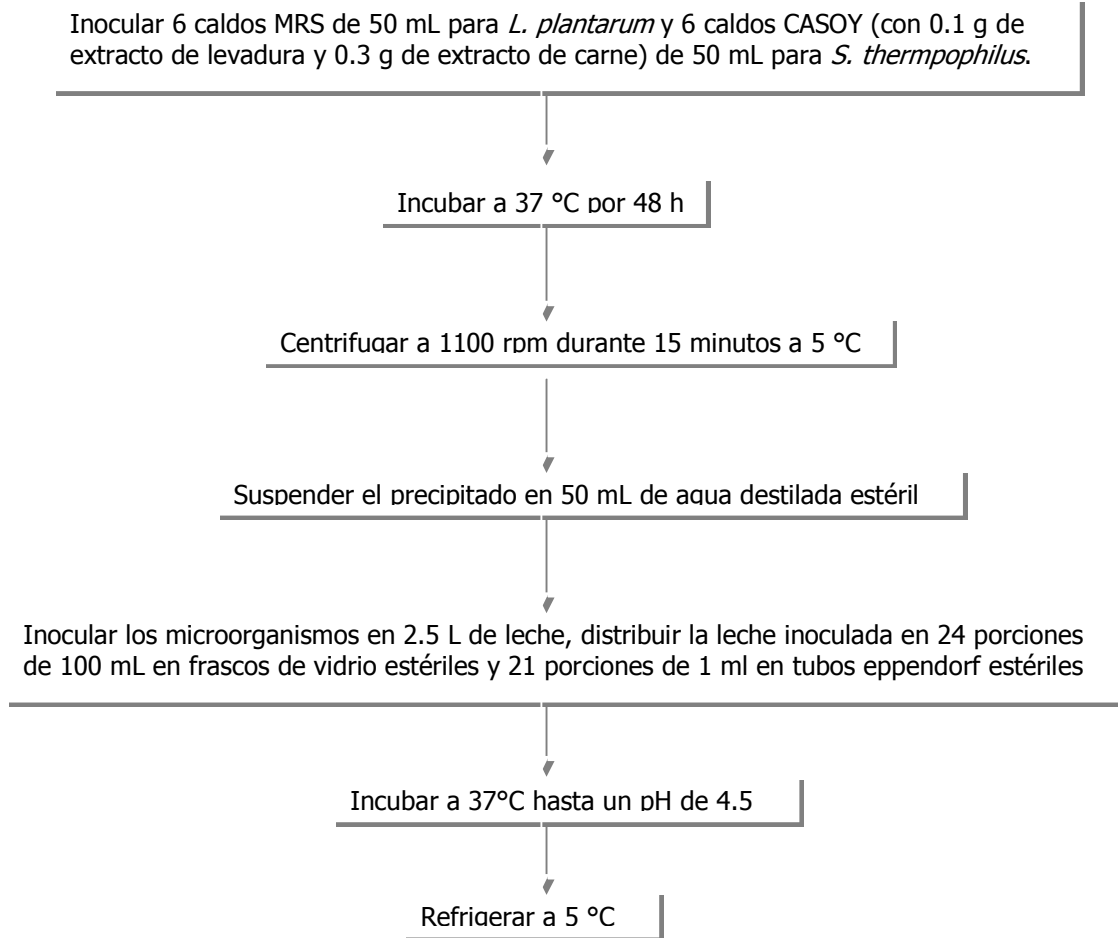
Se inocularon 100 mL de leche pasteurizada con 1 mL de agua peptonada que contenía una población de  $10^3$  de *S. thermophilus* y  $10^3$  de *L. plantarum*. Después de la inoculación y durante la incubación se tomaron muestras a diferentes tiempos: 1, 2, 4, 6, 8, 10, 15, 24, 38, 43 y 48 h. Se sembraron las diluciones adecuadas para cada tiempo en agar MRS y ST, para su posterior conteo y se graficó la curva de crecimiento.

## 5.5 Elaboración de leche fermentada

Se elaboró leche fermentada utilizando leche entera pasteurizada, se inocularon 2.5 L de leche de las siguientes características: 3.5% de proteínas, 3% de lípidos y 4.64% de carbohidratos. El procedimiento de elaboración de la leche probiótica fermentada se describen en la figura 2.

---

---



**Figura 2.** Diagrama de elaboración de leche fermentada (Maní, 2005).

Las especificaciones de los frascos que se utilizaron son: No 216, capacidad 100 mL, diámetro de 4.5 cm, altura de 9 cm y tapa metálica de rosca.

## 5.6 Determinación de las propiedades fisicoquímicas

### 5.6.1 Determinación de textura

Para llevar a cabo este análisis se empleó el Texturómetro Analyzer-XT2 (Stable Micro System, New York, EE.UU) que se encuentra en el laboratorio de



bromatología de la UDLAP. Se realizó una prueba de penetración por triplicado 3 minutos después de sacar la muestra del refrigerador. La prueba se llevó a cabo directamente en 200 mL de muestra contenida en un vaso de vidrio de 5 cm de diámetro y una altura de 10 cm. El aditamento que se utilizó fue un cilindro metálico de 9 cm de altura, 4 cm de diámetro y un peso de 328 g, la velocidad de penetración con la que se determinó la fuerza fue de 1mm/s hasta alcanzar una distancia de 10 mm desde la superficie del producto y la velocidad de retiro de 10mm/s. Estos parámetros son los especificados para los alimentos tipo yogurt. La prueba cuantifica la firmeza del gel con el área positiva de la gráfica de fuerza (N) vs. el tiempo (t), que indica la fuerza necesaria para romperlo. Al mismo tiempo se midió el área negativa obtenida de la misma curva durante el regreso del cilindro a su posición original se conoce la adhesividad del producto.

### 5.6.2 Evaluación de color

Para medir el color, la prueba se realizó por triplicado utilizando un Colorímetro Color Gardner System 05 (Gardner Laboratories, EE.UU.) que se encuentra en el laboratorio de bromatología de la UDLAP, el cual se calibró para medir Reflectancia, empleando la escala triestímulo de Hunter y midiendo los parámetros  $L_h$ ,  $a_h$ ,  $b_h$ , se calculó el tono (h) mediante la ecuación 1, croma (C) con la ecuación 2 y la diferencia neta de color ( $\Delta E$ ) empleando la ecuación 3. Las mediciones se hicieron a 200 mL de muestra y en un vaso de cristal de las siguientes especificaciones: transparente, de 5 cm de diámetro y 10 cm de altura.

$$h = \tan^{-1} \left( \frac{b}{a} \right) \quad \text{Ec. 1}$$

$$C^{AB} = (a^2 + b^2)^{\frac{1}{2}} \quad \text{Ec. 2}$$

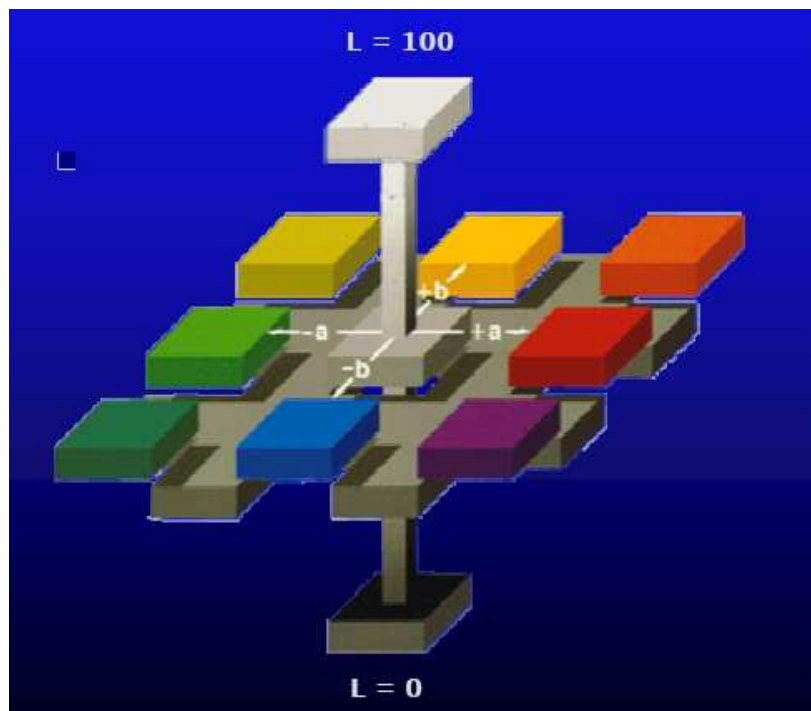
$$\Delta E = (\Delta L^2 + \Delta a^2 + \Delta b^2)^{1/2} \quad \text{Ec. 3}$$

---

---

El espacio de color Hunter  $L$ ,  $a$ ,  $b$  es un espacio de color rectangular de 3 dimensiones basadas en la teoría de los colores opuestos (HunterLab, 2001):

- $L$  (luminosidad) – 0 es negro y 100 es blanco
- $a$  (rojo-verde) – valores positivos son rojos y los valores negativos son verdes
- $b$  (azul-amarillo) – valores positivos son azules y negativos amarillos



**Figura 3.** Espacio de color Hunter  $L$ ,  $a$ ,  $b$ .

Todos los colores que se pueden percibir visualmente se pueden mostrar con este espacio rectangular de color (HunterLab, 2001).

### **5.6.3 Medición del porcentaje de sinéresis**

Para medir el porcentaje de sinéresis que presentaba la leche fermentada probiótica, fue colocada después de la inoculación en tubos eppendorf para minicentrífuga y se incubaron con el resto de las muestras. Después de la



fermentación y durante el almacenamiento los tubos fueron centrifugados en una Minicentrífuga (Force 7, Denver Instrument Co., Vernon, USA) a 2000 g durante 5 minutos. Con este procedimiento el suero es separado y pesado. El porcentaje de sinéresis fue calculado por medio de la ecuación 4.

$$\% \text{sinéresis} = \frac{(P_{\text{suero}})(100)}{P_{\text{muestra}}} \quad \text{Ec. 4}$$

Esta evaluación se realizó al tiempo cero, después de la fermentación, y cada 7 días durante 35 días, durante el almacenamiento en refrigeración. Todas las pruebas fueron realizadas por triplicado.

#### **5.6.4 Determinación de pH**

La determinación del pH se realizó utilizando un potenciómetro modelo Basic Bio (Denver Instrument Co. Colorado, EE.UU.) por inmersión directa del electrodo previamente calibrado. Las pruebas se realizaron por triplicado después de la fermentación y cada 7 días durante 35 días.

#### **5.6.5 Acidez titulable**

El porcentaje de acidez titulable se determinó titulando 5 mL de muestra con hidróxido de sodio 0.1 N y expresado el resultado como porcentaje de ácido láctico en leche.

El porcentaje de acidez se calculó con la ecuación 5, donde el valor correspondiente al miliequivalente de ácido láctico es de 0.09008 y este es expresado como porcentaje de ácido láctico en la leche fermentada:







$$\%deacidéz = \frac{(Vol_{NaOH})(N_{NaOH})(meqdeácido)(100)}{ml_{muestra}} \quad \text{Ec. 5}$$

## 5.7 Evaluación de la viabilidad

El recuento de los microorganismos se realizó inoculando 1 mL del producto en 9 mL de agua peptonada previamente esterilizada, y se sembraron las diluciones adecuadas, por vertido en placa en agar ST para *S. thermophilus* y agar MRS para *L. plantarum*. Se incubaron en aerobias por 48 h a 37°C. El recuento para *L. plantarum* en la leche fermentada probiótica se realizó restando de la cuenta en MRS el número de UFC que hubo en agar ST que corresponden al *S. thermophilus*.

## 5.8 Evaluación sensorial

Se aplicó una prueba pareada que consiste en comparar dos muestras (leche fermentada probiótica y yogurt comercial), y decir si son o no diferentes; en caso de que la evaluación de la característica en cuestión fuera diferente, se pedía que decidiera cual fue el de mayor agrado.

Para esta prueba, los alimentos analizados fueron llevados a la misma temperatura. Se colocaron en recipientes provistos con etiquetas y codificados con un número seleccionado al azar de tablas de números aleatorios, y se colocaron en ellos las muestras de los alimentos.

Enseguida se llevó a cabo el análisis donde se presentó a cada panelista el par de muestras codificadas, y se procedió al análisis empleando el cuestionario del apéndice A.

Después, se llevó a cabo una de las pruebas más populares para evaluarla aceptabilidad de los productos, se realizó una evaluación mediante una escala





hedónica de nueve niveles; esta escala fue desarrollada en 1947 por la Quartermaster Food and Container Institute de la Fuerza Armada de los Estados Unidos (Peryam y Girardot, 1952). Esta escala define los estados psicológicos de "gusto" y "disgusto" en una escala lineal donde el que menos gusta esta en la parte inferior y el que más gusta en la parte superior (Apéndice B). Para cada descripción hedónica a lo largo de nueve puntos se le ha asignado un número, de 1 (me desagrada muchísimo) a 9 (me gusta muchísimo). Esta escala cuenta con un punto que la divide, es el punto neutral (ni me gusta ni me disgusta).

Esta prueba se aplicó a panelistas, donde se les dio a probar la leche fermentada probiótica elaborada con *S. thermophilus* y *L. plantarum*, cada panelista seleccionó el nivel en el que se encontraba el producto dependiendo de la característica evaluada, las muestras se codificaron empleando el cuestionario que se presenta en el apéndice B.

Por último se llevó a cabo un análisis estadístico con el programa MINITAB15 que determinó si las muestras son iguales o son diferentes con un nivel de significancia del 95 %.

## 5.9 Análisis Bromatológico

Se evaluó el contenido de ceniza, grasa, proteína, agua y carbohidratos a la leche fermentada probiótica elaborada.

### 5.9.1 Cenizas

Este análisis se llevó acabo empleando el método 7.009 del AOAC (1984), y se calculó el contenido de cenizas mediante la ecuación 6.

$$\% \text{ cenizas} = \frac{W_{c+cen} - W_{crisol}}{W_{c+m} - W_{crisol}} * 100$$

Ec. 6





### 5.9.2 Grasa

Para llevar a cabo este análisis se empleó el método 16.064 del AOAC (1984), y el porcentaje de grasa en la muestra se calculó por medio de la ecuación 7.

$$\% \text{grasa} = \frac{W_{v+grasa} - W_{vaso}}{W_{v+muestra} - W_{vaso}} * 100 \quad \text{Ec. 7}$$

### 5.9.3 Humedad

Para calcular la humedad se empleó el método de secado, y el resultado fue calculado con la ecuación 8.

$$\% \text{humedad} = \frac{\text{agua}}{\text{total}} = \left( \frac{W_f - W_i}{W_1} \right) * 100 \quad \text{Ec. 8}$$

### 5.9.4 Proteína

Para llevar a cabo esta cuantificación se empleó el método Kjeldahl, y el porcentaje de proteína fue calculado por medio de la ecuación 9.

$$\% \text{proteína} = \frac{(\text{mL gastados})(0.1N)(0.014)(6.25)}{\text{g muestra}} * 100 \quad \text{Ec. 9}$$

---

---