

**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO**

**FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS**

**ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL**



**INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA, PORCENTAJE DE GRASA Y  
SÓLIDOS NO GRASOS EN EL CRECIMIENTO CINÉTICO DE  
BACTERIAS ACIDOLÁCTICAS DEL YOGUR**

**TESIS**

**PRESENTADA POR:**

**EDWIN CHILA CHOQUE**

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:  
INGENIERO AGROINDUSTRIAL**

**PUNO – PERÚ**

**2014**

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO  
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS  
ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL

INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA, PORCENTAJE DE GRASA Y SÓLIDOS NO GRASOS EN  
EL CRECIMIENTO CINÉTICO DE BACTERIAS ACIDOLÁCTICAS DEL YOGUR

TESIS

PRESENTADA POR:

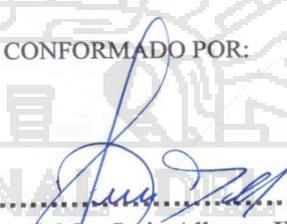
**EDWIN CHILA CHOQUE**

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

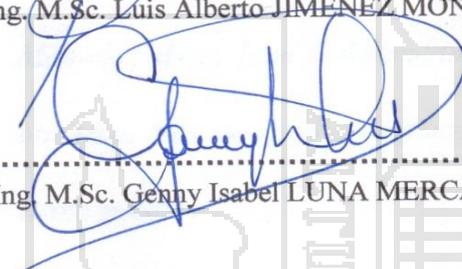
**INGENIERO AGROINDUSTRIAL**

APROBADA POR EL JURADO REVISOR CONFORMADO POR:

**PRESIDENTE**

  
Ing. M.Sc. Luis Alberto JIMENEZ MONROY

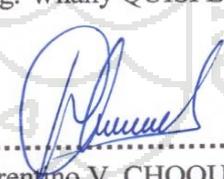
**PRIMER MIEMBRO**

  
Ing. M.Sc. Genny Isabel LUNA MERCADO

**SEGUNDO MIEMBRO**

  
Ing. Whany QUISPE CHAMBI

**DIRECTOR DE TESIS**

  
Ing. M.Sc. Florentino V. CHOQUEHUANCA CÁCERES

**ASESOR DE TESIS**

Ing. M.Sc. Thomas ANCCO VIZCARRA

PUNO – PERÚ

2014

Área: Ingeniería y tecnología

Tema: Desarrollo de procesos y productos agroindustriales sostenibles y eficientes

## DEDICATORIA



*A mis queridos padres Jaime A. Chila y Nelly M.*

*Choque; a mi hermana Nilda; A mis abuelos*

*Manuel, Sabina, Juan y Alejandrina quienes me*

*brindaron todo su apoyo y confianza. A ellos mi*

*eterna gratitud.*

## AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional del Altiplano, a la Facultad de Ciencias Agrarias y la Escuela Profesional de Ingeniería Agroindustrial por la formación profesional recibida en sus aulas.

A mi director de tesis Ing. M.Sc. Florentino Víctor Choquehuanca Cáceres y asesor Ing. M.Sc. Thomas Ancco Vizcarra por su acertada dirección y asesoramiento en la ejecución del presente trabajo de investigación.

A los miembros del jurado por su aporte y correcciones realizados en el presente trabajo de investigación.

Al Sr. Pablo, laboratorista de Microbiología Agroindustrial; al Sr. German, laboratorista de Procesamiento de Productos Agropecuarios y Planta Piloto de Industrias Lácteas, por su pre disposición en la ejecución de este trabajo.

A mis padres y hermana por su incondicional apoyo y cariño durante la ejecución del presente trabajo de investigación y toda mi vida. Así mismo a mis abuelos Manuel, Sabina, Alejandrina y Juan.

Finalmente mi eterno agradecimiento a mis amigos(as) Daysi, Edhy, Renán, Ronald Rachel, Deysi, Miriam, Jesús, Edwin, Edgar y Eddy por motivarme y apoyarme en todo momento de mi vida.

## ÍNDICE GENERAL

Pág.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE TABLA

ÍNDICE DE FIGURAS

ÍNDICE DE ANEXOS

SIGLAS

RESUMEN .....	1
I. INTRODUCCIÓN .....	2
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA .....	4
2.1. GENERALIDADES .....	4
2.2. LECHE .....	5
2.2.1. Composición de la Leche .....	6
2.2.2. pH y acidez de la leche.....	8
2.2.3. Estandarización del contenido en grasa de la leche .....	9
2.2.4. Estandarización de sólidos no grasos de la leche .....	10
2.2.5. Tratamiento térmico de la leche .....	11
2.3. PRODUCTOS LÁCTEOS FERMENTADOS .....	12
2.4. BACTERIAS ACIDOLÁCTICAS DEL YOGUR.....	13
2.4.1. Principales características del <i>Streptococcus salivarius subsp.</i> <i>thermophilus</i> .....	13

2.4.2. Principales características del <i>Lactobacillus delbrueckii subsp.</i> <i>bulgaricus</i> .....	14
2.5. SIMBIOSIS DE LAS BACTERIAS ACIDOLÁCTICAS DEL YOGUR .....	16
2.6. FERMENTACIÓN DE LA LECHE POR BACTERIAS ACIDOLÁCTICAS DEL YOGUR .....	17
2.7. PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS RELACIONADAS CON EL YOGUR .....	18
2.7.1. pH.....	18
2.7.2. Acidez.....	18
2.8. TEMPERATURA DE INCUBACIÓN DE LAS BACTERIAS ACIDOLÁCTICAS DEL YOGUR .....	19
2.9. MICROBIOLOGÍA PREDICTIVA .....	19
2.9.1. Modelo matemático predictivo.....	20
2.9.1.1. Modelo de Gompertz Modificado .....	20
2.9.2. Construcción de modelo.....	22
2.9.2.1. Selección de cepa de microorganismo .....	23
2.9.2.2. Generación de datos .....	23
2.9.2.3. Método de recuento total en placa.....	23
2.9.3. Descripción matemática del modelo .....	24
2.10. CRECIMIENTO MICROBIANO .....	24
2.10.1. Fases de crecimiento microbiano.....	25
2.10.2. Parámetros cinéticos de crecimiento microbiano .....	26
2.10.2.1. Tiempo de adaptación .....	26

2.10.2.2. Tiempo de generación .....	27
2.10.2.3. Velocidad máxima de crecimiento .....	28
III. MATERIALES Y MÉTODOS .....	29
3.1. LUGAR DE EJECUCIÓN .....	29
3.2. MATERIAL EXPERIMENTAL .....	29
3.3. MATERIALES Y EQUIPOS .....	29
3.3.1. Materiales .....	29
3.3.2. Equipos de laboratorio .....	30
3.3.3. Reactivos .....	30
3.3.4. Medios de cultivo .....	31
3.4. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL .....	31
3.4.1. Descripción del proceso experimental .....	33
3.5. MÉTODO DE ANÁLISIS .....	35
3.5.1. Método para el análisis microbiológico de bacterias ácidolácticas del yogur.....	35
3.5.1.1. Preparación de muestras y diluciones .....	35
3.5.1.2. Cuantificación de <i>Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus</i> .....	36
3.5.1.3. Cuantificación de <i>Streptococcus salivarius subsp. termophilus</i> .....	36
3.5.2. Método para el análisis fisicoquímico.....	37
3.5.2.1. Determinación de pH.....	37
3.5.2.2. Determinación de acidez titulable .....	37

3.5.3. Determinación de la curva de crecimiento y parámetros de crecimiento cinético.....	38
3.5.3.1. Modelo de Gompertz Modificado .....	38
3.6. UNIDADES DE ANÁLISIS Y OBSERVACIONES .....	39
3.6.1. Factores en estudio.....	39
3.6.2. Factores de respuesta.....	39
3.6.3. Indicadores .....	40
3.7. DISEÑO DE INVESTIGACIÓN .....	40
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	43
4.1. EFECTO DE LA TEMPERATURA, PORCENTAJE DE GRASA Y SÓLIDOS NO GRASOS EN EL CRECIMIENTO CINÉTICO DE <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> y <i>Streptococcus salivarius</i> subsp. <i>termophilus</i> .....	43
4.1.1. <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> .....	43
4.1.2. <i>Streptococcus salivarius</i> subsp. <i>termophilus</i> .....	50
4.2. DETERMINACIÓN DE MEJORES VALORES DE PARÁMETROS FÍSICOQUÍMICOS.....	55
4.2.1. DETERMINACIÓN DE pH .....	55
4.2.2. DETERMINACIÓN DE ACIDEZ.....	59
V. CONCLUSIONES .....	63
VI. RECOMENDACIONES .....	64
VII. BIBLIOGRAFÍA .....	65
ANEXOS.....	74

## ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Requisitos fisicoquímicos de la leche según NTP.....	6
Tabla 2. Composición de los productos lácteos fermentados.....	12
Tabla 3. Análisis de Varianza (ANOVA) para la regresión lineal múltiple sobre el tiempo de adaptación ( $\lambda$ ) del <i>Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus</i> .....	44
Tabla 4. Análisis de Varianza (ANOVA) para la regresión lineal múltiple sobre el tiempo de generación (Tg) del <i>Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus</i> .....	47
Tabla 5. Análisis de Varianza (ANOVA) para la regresión lineal múltiple sobre la velocidad máxima de crecimiento ( $\mu_{\text{máx}}$ ) del <i>Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus</i> .....	48
Tabla 6. Análisis de Varianza (ANOVA) para la regresión lineal múltiple sobre el tiempo de adaptación ( $\lambda$ ) <i>Streptococcus salivarius subsp. termophilus</i> .....	50
Tabla 7. Análisis de Varianza (ANOVA) para la regresión lineal múltiple sobre el tiempo de generación (Tg) del <i>Streptococcus salivarius subsp. termophilus</i> .....	52
Tabla 8. Análisis de Varianza (ANOVA) para la regresión lineal múltiple sobre la velocidad máxima de crecimiento ( $\mu_{\text{máx}}$ ) del <i>Streptococcus salivarius subsp. termophilus</i> .....	53
Tabla 9. Análisis de varianza (ANOVA) para la variación de pH.....	56
Tabla 10. Análisis de varianza (ANOVA) para la variación de acidez.....	59

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Representación gráfica del modelo de Gompertz.....	21
Figura 2. Diagrama de flujo para obtener los parámetros cinéticos de crecimiento del <i>Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus</i> y <i>Streptococcus salivarius subsp. thermophilus</i> .....	32
Figura 3. Descenso del pH para los 12 tratamientos.....	58
Figura 4. Desarrollo de la acidez (% ácido láctico) para los 12 tratamientos.....	60



## ÍNDICE DE ANEXOS

	Pág.
ANEXO 1. Parámetros ajustados por el Modelo de Gompertz modificado para <i>Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus</i> .....	75
ANEXO 2. Parámetros de crecimiento cinético del <i>Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus</i> .....	76
ANEXO 3. Curvas de crecimiento del <i>Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus</i> ajustadas por el Modelo de Gompertz modificado.....	77
ANEXO 4. Parámetros ajustados por el Modelo de Gompertz modificado para <i>Streptococcus salivarius subsp. termophilus</i> .....	83
ANEXO 5. Parámetros de crecimiento cinético del <i>Streptococcus salivarius subsp. termophilus</i> .....	84
ANEXO 6. Curvas de crecimiento del <i>Streptococcus salivarius subsp. termophilus</i> ajustadas por el Modelo de Gompertz modificado.....	85
ANEXO 7. Resultados de la evolución del pH obtenidos en cada tratamiento.....	91
ANEXO 8. Resultados de la evolución de la acidez obtenidos en cada tratamiento...	92
ANEXO 9. Panel Fotográfico.....	93

## SIGLAS

$\mu_{\text{máx}}$	: Velocidad Máxima de Crecimiento
ANOVA	: Analysis Of Variance; Análisis de Varianza
BAL	: Bacterias ácidolácticas
CLE	: Cantidad de leche entera
CLPD	: Cantidad de leche descremada en polvo
DCA	: Diseño Completo al Azar
GDL	: Grasa deseada en la leche
GLE	: Grasa de leche entera
Lb	: <i>Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus</i>
LD	: Leche descremada
LDP	: Leche descremada en polvo
MRS	: Man Rugosa Sharpe
NTP	: Norma Técnica Peruana
pH	: Potencial hidrogeno
PMP	: Patogen Modelling Program
RTP	: Recuento Total en Placa
SG	: Sólidos Grasos
SNG	: Sólidos no Grasos
St	: <i>Streptococcus salivarius subsp. termophilus</i>
STD	: Sólidos totales deseados
STL	: Sólidos totales de la leche
$T_g$	: Tiempo de generación
UFC	: Unidad Formadora de Colonia
USDA	: United States Department of Agriculture

## RESUMEN

El trabajo de investigación se realizó en la Universidad Nacional del Altiplano Puno, ubicada a 3827 msnm. en el Laboratorio de Microbiología Agroindustrial de la Escuela Profesional de Ingeniería Agroindustrial. Se utilizó como materia prima Leche fresca, proveniente del Centro de Producción de Lácteos Ecológica y Aromática de la Cooperativa de Servicios San Santiago del distrito de Acora. El objetivo fue determinar la influencia de la temperatura, porcentaje de grasa y sólidos no grasos en el crecimiento cinético de las bacterias acidolácticas del yogur (*Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* y *Streptococcus salivarius subsp. termophilus*) y en los parámetros fisicoquímicos (pH y acidez) durante el proceso de fermentación de la leche. Para ello se planteó 12 tratamientos, sometiendo a la leche fresca a incubación a temperaturas de 37°C, 40°C Y 43°C; previa estandarización de los sólidos grasos (1% y 3%) y sólidos no grasos (8% y 9%); determinándose las UFC/ml, pH y acidez titulable. Con los resultados de crecimiento cinético del *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* y *Streptococcus salivarius subsp. termophilus*, se graficó la curva de crecimiento y se ajustó los parámetros cinéticos de crecimiento mediante el modelo matemático de Gompertz Modificado; el tiempo de adaptación ( $\lambda$ ) del *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* es influido por la temperatura, el tiempo de generación ( $T_g$ ) no es influido por la temperatura, porcentaje de grasa y sólidos no grasos, la velocidad de crecimiento máximo ( $\mu_{m\acute{a}x}$ ) solo es influida por la temperatura. Para el crecimiento del *Streptococcus salivarius subsp. termophilus*, tanto la temperatura, el porcentaje de grasa y sólidos no grasos no influyen en el tiempo de adaptación ( $\lambda$ ), tiempo de generación ( $T_g$ ) y la velocidad máxima de crecimiento ( $\mu_{m\acute{a}x}$ ). En cuanto al pH, no hubo diferencia entre los tratamientos obteniéndose valores de 4,6 a 4,8; y la acidez mostró un mejor y mayor valor, a temperatura de 37° C, 3% de grasa y 8% de sólidos no grasos con una valor de 0.9 % de ácido láctico.

## I. INTRODUCCION

La leche y sus derivados representan un grupo de alimentos caracterizados por su gran valor nutricional; sin embargo la mayor parte de ellos son altamente perecederos, y se ha determinado que en su fabricación se incorporen sustancias conservadoras que muchas veces producen efectos colaterales para la salud del consumidor. Así mismo se ha desarrollado a través del tiempo microorganismos viables para inhibir o eliminar a los microorganismos alterantes y aumentar el periodo de vida útil de los productos lácteos y otros alimentos, por tal razón en la industria láctea se viene empleando muchos tipos de bacterias lácticas con funciones conservadoras y creadoras de alimentos funcionales. Por tanto el estudio de microorganismos ocupa una atención especial en la ciencia de los alimentos, porque de ellos dependen muchas de las características organolépticas de los mismos.

Las bacterias ácidolácticas (BAL) son empleados para producir una gran variedad de productos fermentados y dentro de estas se encuentran el *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* y el *Streptococcus salivarius subsp. termophilus*, BAL del yogur, que por efecto de su metabolismo le atribuyen diferentes sabores y textura al yogur y contribuye a su valor nutricional, por ello se hace necesario conocer la cinética de su crecimiento y las propiedades fisicoquímicas generadas (pH y acidez) a diferentes temperaturas con concentraciones diferentes de sólidos grasos y sólidos no grasos, factores que determinan su crecimiento y así evaluar y caracterizar las curvas de crecimiento microbiano, con las que se determinó la velocidad máxima de crecimiento ( $\mu_{m\acute{a}x}$ ), tiempo de adaptación ( $\lambda$ ) y tiempo de generación ( $T_g$ ) para el óptimo desarrollo y resultado de crecimiento mediante el uso de la microbiología predictiva implementada con modelos matemáticos.

Por tal razón se plantearon los siguientes objetivos:

1. Evaluar el efecto de la temperatura, porcentaje de grasa y sólidos no grasos que determinan el crecimiento cinético del *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* y del *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus*.
2. Determinar la temperatura, porcentaje de grasa y sólidos no grasos que presentan mejores valores fisicoquímicos (pH y acidez) en el proceso de incubación de las bacterias acidolácticas del yogur.



## II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. GENERALIDADES

La importancia de la leche está en su alto valor nutritivo, donde sus componentes se encuentran en forma y proporción adecuada, considerándose como una importante fuente de proteínas (Fennema, 2000).

La leche es un producto fácilmente fermentable por la acción de las bacterias lácticas (acidificantes) dando lugar a un producto de aroma y sabor agradable que puede ser consumido (Sánchez, 1992).

Uno de estos alimentos fermentados ha sido desarrollado en forma natural, con las técnicas tradicionales de selección y a partir del desarrollo de la microbiología, aislando y seleccionando algunas bacterias para ser utilizadas como cultivo.

Estos cultivos se han desarrollado comercialmente como cultivos iniciadores, principalmente en productos lácteos como el yogur (Sánchez, 1992).

El yogur se define como el producto obtenido de la leche entera, semidescremada o descremada, sometida a un proceso de pasteurización y coagulación por fermentación, mediante la inoculación de cultivos lácticos.

El yogur resulta a partir de la leche acidificada por un proceso de fermentación en el que se modifican los componentes de la leche; la lactosa es transformada a ácido láctico, dándose además una hidrólisis parcial de las proteínas (Tamime y Robinson, 1991).

El cultivo láctico para yogur contiene *Streptococcus salivarius subsp. termophilus* y *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* en proporciones iguales (Gómez, 1999).

Ambas bacterias tienen un crecimiento asociativo (simbiosis) que permite una producción rápida de ácido láctico, el *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* proporciona aminoácidos a partir del rompimiento de las proteínas de la leche, estimulando

el crecimiento de *Streptococcus salivarius subsp. termophilus* y éste a la vez produce ácido fórmico el cual estimula el crecimiento de *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* (Gómez, 1999).

Al inicio de la preparación, el pH y la acidez es favorable a los *Streptococcus salivarius subsp. termophilus* los cuales predominan y ponen en marcha la fermentación láctica (Espinoza y Zapata, 2010).

La acidez es uno de los mejores índices de aceptabilidad de los consumidores. El desarrollo de la acidez y aroma van de la mano en los productos lácticos, por eso se utilizan bacterias simbióticas (Sánchez, 1992).

Las fases de crecimiento de mayor interés en alimentos corresponden a las tres primeras (adaptación, exponencial y estacionaria), ya que es en ellas donde ocurren los mayores problemas microbiológicos (producción de metabolitos importantes cambios en las características de los alimentos, producción de toxinas, etc.). Tomando esas tres fases de la curva, el crecimiento presenta una forma sigmoideal, de allí que varios modelos sean desarrollados para ajustarse a dicha forma (Castro *et al.*, 2008).

## 2.2. LECHE

Según INDECOPI.NTP 202.001 (2003) define a la leche como: El producto íntegro de la secreción mamaria normal sin adición ni sustracción alguna y que ha sido obtenida mediante el ordeño. La designación de "leche" sin especificación de la especie productora, corresponde exclusivamente a la leche de vaca. A las leches obtenidas de otras especies les corresponde, la denominación de leche, pero seguida de la especificación del animal productor.

**Tabla 1.** Requisitos fisicoquímicos de la leche según NTP INDECOPI.NTP 202.001

Ensayo	Requisito	Método de ensayo
Materia grasa (g/100g)	Mín. 3,2	NTP 202.028: 1998
Sólidos no grasos (g/100g)	Mín. 8,2	* Por diferencia
Sólidos totales (g/100g)	Mín. 11,4	NTP 202.118: 1998
Acidez (g ac. láctico/100g)	0.14-0.18	NTP202.116:2000
Densidad (g/ml) a 15°C	1.0296-1,034	NTP 202.007: 1998
Índice de refracción de suero, 20°C	Mín. 1,34179	NTP. 202.016: 1998
Ceniza total (g/100g)	Máx. 0,7	NTP 202.172: 1998
Índice crioscópico	Máx. 0.540°C	NTP 202.184 1998
Sustancias extrañas a su naturaleza	Ausencia	
Prueba de alcohol (74%v/v)	No coagulable	NTP 202.030: 1998
Prueba reduc. azul metileno	Mínimo 4 horas	NTP 202.014: 1998

Fuente: INDECOPI.NTP 202.001 (2003)

### 2.2.1. Composición de la Leche

#### a. Agua

El agua es el componente principal de la leche, siendo su función principal de actuar como disolvente de los demás componentes (Spreer, 1991).

El agua es el principal componente de la leche, varía entre 86 a 90%, se presenta en su mayor parte como agua libre y en pequeño porcentaje, no más del 4% como agua ligada a otras sustancias mayormente a las proteínas y fosfolípidos (Ludeña y Chirinos, 2000).

#### b. Sólidos grasos

De todos los componentes de la leche, la fracción que más varía es la formada por las grasas, estado en una proporción que oscila entre 3,2% y el 6%. Estas variaciones se

deben principalmente a la selección realizada para obtener las distintas razas de vacuno (Spreer, 1991).

Los lípidos de la leche están formados en un 98 a 99% de triglicéridos y los restantes son esteroides, también son grasas saturadas en su mayoría, pero que tienen también grasas mono insaturadas como el oleico y las grasas poliinsaturadas como el linoleico de 4 a 5%; tienen grasas de cadena corta que contienen entre 4 a 10 átomos de carbono como el butírico, cáprico, caproico y caprílico. De estos 4, el ácido butírico y caproico son volátiles y responsables del aroma de la leche (Amiot, 1991).

#### **c. Proteína**

Las proteínas son los elementos constitutivos esenciales de toda célula viviente y tiene gran importancia en la leche y productos lácteos. La leche contiene como término medio un 3,2% de proteínas de las que el 80% son caseínas. Normalmente se distingue entre la caseína que precipita a pH de 4,6 y las otras proteínas que se denominan proteínas del Lactosuero y que no precipitan con las caseínas a menos de que previamente hayan sido desnaturadas por el calor u otros tratamientos. El ácido tricloroacético precipita todas las proteínas más las proteasas y las peptonas. Las proteínas del Lactosuero incluyen lactoalbuminas y lactoglobulinas (Amiot, 1991).

#### **d. Lactosa**

Amiot (1991) indica que los glúcidos de la leche están compuestos esencialmente por lactosa y algunos otros azúcares en pequeñas cantidades, como la glucosa (0,1%) y la galactosa. La lactosa es el componente cuantitativamente más importante de los sólidos no grasos. La leche contiene alrededor de un 5%, la leche en polvo desnatada contiene un 52%.

Su fórmula es  $C_{12}H_{22}O_{11}$ , la lactosa es reductora, las bacterias lácticas pueden transformar la lactosa en ácido láctico, lo cual es conveniente para la producción de yogur, mantequilla y queso (Alcázar, 1997).

#### **e. Minerales y Vitaminas**

Las sales presentes en la leche se encuentran en disolución y las principales son el calcio, sodio, potasio y magnesio. En caso de enfermedades de la vaca el contenido de cloruro sódico aumenta, disminuyendo el resto de las sales (Madrid *et al.*, 2001)

Madrid (1999) señala que la leche es rica en vitaminas solubles en grasa (A y D) y en vitaminas solubles en agua (complejo vitamínico B y vitamina C).

#### **f. Enzimas de la leche**

Madrid (1999) indica que entre las enzimas más importantes presentes en la leche y que de alguna manera influyen en la elaboración de productos lácteos son: Peroxidasas, Lactasas, Proteasas, Catalasas, Fosfatasas, Lipasas, Amilasas, Esterasas, Ribonucleasas, oxidasas.

#### **2.2.2. pH y acidez de la leche**

El pH (acidez activa) de una leche normal varía entre 6,2 y 6,8, pero la mayoría de las leches tienen un pH comprendido entre 6,4 y 6,6 (Amiot, 1991)

El valor del pH en la leche normal es de 6,6 y esta puede bajar mediante la adición de un ácido o por la fermentación microbiológica de la lactosa. La proteína de la leche, especialmente al caseína es el componente básico a partir del cual, el coagulo se forma cuando el valor del pH desciende. Las partículas de la caseína tienen una pequeña cantidad de cargas negativas. Conforme el pH desciende, la electronegatividad de las partículas de

caseína se reduce gradualmente, luego a un pH de 5,2 la carga será suficiente baja que permitirá el inicio de la formación de coágulo. (Gómez, 1999).

La Acidez de valoración global de la leche expresada en porcentaje de ácido láctico, puede variar entre el 0,10 y el 0,30%. La mayor parte de las leches tiene una acidez del 0,14 a 0,17%. Los componentes naturales de la leche que contribuyen a la acidez son los fosfatos (0,09%), las caseínas (0,05-0,08%), el resto de las proteínas (0,01%), los citratos (0,01%) y el dióxido de carbono (0,01%) (Amiot, 1991).

### **2.2.3. Estandarización del contenido en grasa de la leche**

Gómez (1999) señala que es necesario que la composición de la leche sea estandarizada en su contenido graso para la elaboración de los distintos tipos de yogur, el contenido de grasa de la leche oscila entre 3.8 y 4.2% y el yogur comercial entero es del orden del 1.5%. Para lo cual indica que los métodos para la estandarización de la leche incluyen:

- a) Eliminación de parte de la grasa de la leche;
- b) Mezclar la leche entera y leche desnatada descremada;
- c) Adición de nata a la leche entera o desnatada; y
- d) Los métodos a y b con la utilización de centrifugas.

Villegas y Santos (2009) señalan la técnica de la estandarización de leche por descremado mecánico parcial, empleando una descremadora, que separa la grasa de la leche, produciéndose dos flujos: Uno de crema y otro de leche descremada. En concreto el descremado mecánico parcial consiste en pasar parte de la leche por la descremadora y mezclar la leche descremada con la leche entera, para así reducir el contenido de grasa.

Para realizar los cálculos de la cantidad de leche a descremar se utiliza la siguiente ecuación:

$$LD = \frac{CLE (\%GLE - GDL)}{\%GLE} \quad (1)$$

Dónde:

LD : Leche por descremar

CLE : Cantidad de leche entera

%GLE : Porcentaje de grasa de leche entera

GDL : Grasa deseada en la leche

#### **2.2.4. Estandarización de sólidos no grasos de la leche**

Gómez (1999) señala que el porcentaje de sólidos no grasos mínimo (incluye lactosa, proteínas, sales minerales y otros) que debe presentar un yogur oscila del 8.0% al 8,6%, con la finalidad de garantizar el mantenimiento de un valor de sólidos no grasos semejante al de la leche. Los sólidos no grasos tienen gran importancia en las propiedades físicas del yogur como la consistencia y en general, cuanto más elevado sea el contenido de sólidos no grasos de la mezcla destinada a la elaboración de yogur mayor consistencia tendrá el producto final. Para incrementar los sólidos no grasos se utilizan algunos de estos componentes y métodos:

- a) Adición de leche en polvo
- b) Adición de suero de leche en polvo
- c) Adición de caseína en polvo
- d) Concentración por evaporación
- e) Concentración por filtración de membranas

Alcázar (2002) indica que para la estandarización de sólidos totales mediante la adición de leche en polvo descremada se debe de conocer el porcentaje de sólidos totales de la leche entera, para luego realizar los cálculos con las siguientes ecuaciones:

$$\%LDP = \%STD - \%STL \quad (2)$$

$$CLDP = CLE * (\%LPD/100) * 1000 \quad (3)$$

Dónde:

%LDP: Porcentaje de leche descremada en polvo que se necesitan.

%STD: Porcentaje de sólidos totales deseados en leche.

%STL: Porcentaje de sólidos totales de leche entera.

CLDP: Cantidad de leche descremada en polvo a añadir (g).

CLE: Cantidad de leche entera (Litros o mililitros).

### 2.2.5. Tratamiento térmico de la leche

El tratamiento térmico permite mejorar la leche como medio de crecimiento para las bacterias lácticas y cambia el complejo de proteínas, mejorando sustancialmente la estabilidad y consistencia de los productos. La leche debe someterse a un tratamiento térmico de 90-95°C durante 5 minutos o a 85°C por 30 minutos, esto permitirá reducir y eliminar bacterias patógenas en la leche, así mismo reduce el contenido de oxígeno disuelto e incrementar la cantidad de aminoácidos y péptidos, los cuales mejoran la leche como sustrato para el crecimiento de bacterias lácticas (Gómez, 1999).

### 2.3. PRODUCTOS LÁCTEOS FERMENTADOS

La leche fermentada es un producto lácteo obtenido por medio de la fermentación de la leche, que puede haber sido elaborado a partir de productos obtenidos de la leche con o sin modificaciones en la composición, por medio de la acción de microorganismos adecuados y teniendo como resultado la reducción del pH con o sin coagulación (precipitación isoeléctrica). Estos cultivos de microorganismos serán viables, activos y abundantes en el producto hasta la fecha de duración mínima. Si el producto es tratado térmicamente luego de la fermentación, no se aplica el requisito de microorganismos viables (CODEX STAN 243-2003).

**Tabla 2.** Composición de los productos lácteos fermentados

	<b>Leche fermentada</b>	<b>Yogur, en base a cultivos alternativos y leche acidófila</b>	<b>kéfir</b>	<b>kumis</b>
Proteína láctea (% p/p)	mín. 2,7%	mín. 2,7%	mín. 2,7%	menos del 10%
Grasa láctea (% p/p)	menos del 10%	menos del 15%	menos del 10%	mín. 0,7%
Acidez valorable, expresada como % de ácido láctico (% p/p)	mín. 0,3%	mín. 0,6%	mín. 0,6%	mín. 0,5%
Suma de microorganismos (ufc/g, en total)	mín. $10^7$	mín. $10^7$	mín. $10^7$	mín. $10^7$
Levaduras (ufc/g)			mín. $10^4$	mín. $10^4$

Fuente: CODEX STAN 243-2003

En las fermentaciones tipo lácticas, el principal sustrato es la lactosa, que se transforma en ácido láctico. En la mayor parte de estas fermentaciones solamente el 20% del sustrato sufre esta conversión. La flora láctica se añade en forma de cultivos puros o mixtos obtenidos en un medio preparado con leche desnatada, la acidificación puede llegar a producir la coagulación del producto si el pH desciende hasta el punto isoeléctrico de las caseínas. La actividad proteolítica de la flora y la producción de metabolitos secundarios dan a los productos fermentados sus peculiares características organolépticas y texturales (Amiot, 1991).

## **2.4. BACTERIAS ACIDOLÁCTICAS DEL YOGUR**

Los microorganismos que debe contener el cultivo de yogur son bacterias termófilas de las especies: *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* (Tamime y Robinson, 1991).

### **2.4.1. Principales características del *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus***

Gómez (1999), describe las siguientes características:

#### **A. Características morfológicas**

Su crecimiento es a partir de la agrupación de pares (diplococos) o cadenas medianamente largas. Son células esféricas u ovoides con un diámetro entre 0.7 a 0.9  $\mu$ . La morfología de *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus* está influida por el medio nutritivo y la temperatura. Así, se tiene que a temperaturas de 45°C forma cadenas cortas; y con un rico medio nutritivo son más largas, y a 30°C se agrupan como diplococos.

#### **B. Características fisiológicas**

La temperatura óptima de crecimiento y desarrollo de *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus* está entre a 40°C y 45°C con un mínimo de 20°C y un máximo de

50°C, deteniéndose a 53°C. En medios con 2.0% de NaCl, el *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus* no crece, asimismo es bastante sensible a antibióticos como la penicilina, a concentraciones de 5 µg de estreptomina por mililitro de leche.

### C. Características fermentativas

El *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus*, tiene la capacidad de fermentar azúcares como la lactosa, pero no tiene la capacidad de fermentar la maltosa, a diferencia de *Lactococcus lactis*.

### D. Características bioquímicas

El *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus*, es una bacteria láctica del grupo homofermentativo, que tiene la capacidad de tolerar y producir de 0.7 a 0.8% de ácido láctico en la leche, como producto principal y otros secundarios. Niveles más altos de ácido láctico inhiben el crecimiento de *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus*.

La producción de compuestos secundarios depende de las condiciones y propiedades del cultivo. El *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus* en la leche, produce ácidos volátiles como fórmico, acético, propiónico, butírico, isovalérico, caproico, acetoína y pequeñas cantidades de acetaldehído y acetona, etanol y butanona-2, en ocasiones algunos cultivos producen diacetilo.

#### 2.4.2. Principales características del *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*

Gómez (1999), describe las siguientes características:

### A. Características morfológicas

El *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*, se presenta en forma de bastones relativamente largos de 0.2 a 0.4  $\mu$  de ancho y con la tendencia de formar cintas. Las células se presentan simples o en pares.

El medio de cultivo y la temperatura influyen en la morfología de *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*. A una temperatura de 22°C. El crecimiento es en forma de filamentos largos.

El *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*, presenta mayor resistencia que *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus* a la presencia de antibióticos, inhibiéndose a 15 a 30  $\mu$ g de penicilina por ml de leche, y no es capaz de crecer en medios con 2% de NaCl.

### B. Características fisiológicas

La temperatura óptima de desarrollo de *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* es entre 40 a 45°C con un mínimo de 22°C y máximo 52°C aunque esta bacteria no es considerada como termodúrica, algunos cultivos son capaces de sobrevivir a un calentamiento de 75°C por 20-30 minutos.

### C. Características fermentativas

El *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*, tiene la capacidad de fermentar azúcares como la glucosa, fructosa, galactosa y lactosa.

### D. Características bioquímicas

Es una bacteria láctica que pertenece al grupo homofermentativo, capaz de tolerar y producir arriba del 1.7% de ácido láctico D (-) en la leche.

Como productos secundarios el *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*, produce compuestos carbonilos como el acetaldehído, que es el más importante, por la cantidad producida, seguido por la acetona, butanona-2 y trazas de acetoína.

*Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*, tiene una actividad proteolítica media y una alta acumulación de todos los aminoácidos libres, además gran actividad de lipasas en la leche que generan ácidos grasos libres. Los ácidos grasos más importantes producidos son propiónico, butírico, isovalérico, caproico, caprílico y cáprico.

## 2.5. SIMBIOSIS DE LAS BACTERIAS ACIDOLÁCTICAS DEL YOGUR

Cuando las bacterias *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* se inoculan en la leche de manera individual, el tiempo de coagulación se alarga de 8 a 10 horas; sin embargo cuando se hace en forma asociada a temperatura de 40-45°C, el tiempo de coagulación se reduce de 3 - 4 horas (Radke, 1986).

Courtin *et al.*, (2002) indica que el *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus* en condiciones de anaerobiosis estimula el crecimiento de *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* con la producción de ácido fórmico, aumentando este último la velocidad de crecimiento.

En esta asociación, el *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* estimula el desarrollo y crecimiento de *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus* liberando aminoácidos esenciales (valina, histidina y glicina) de la caseína, provocando que el tiempo de generación sea más corto.

El *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus*, tiene un desarrollo más rápido al inicio de la fermentación y en esta primera etapa inicia con la producción de ácido láctico; en una segunda etapa de la fermentación el *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus*

es inhibido por efecto del ácido láctico y la producción de ácido en yogur es continuada y finalizada por *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*.

La velocidad de crecimiento del *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus* a inicio de la fermentación es mayor que la del *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*, siendo de una relación de 3 o 4:1 después de la primera hora de incubación. Posteriormente en la última etapa la relación es aproximadamente de 1:1 (Radke, 1986).

Tamime y Robinson (1991) indica que se ha desarrollado cultivos starter deshidratado de yogur que permiten mantener diferentes relaciones entre *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* en el cultivo conservado. Para la producción de yogures de flavor ácido se pueden utilizar cultivos deshidratados con una relación 40:60 (conseguida gracias a una elevada concentración de *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*) mientras que para obtener un yogur más suave se utiliza una relación de 60:40.

Los cultivos liofilizados del yogur presentan largas fases de latencia, siendo precisos resembrarlos como mínimo 2 veces para lograr cultivos líquidos activos. Pero han aparecido cultivos concentrados liofilizados, fácilmente utilizables para la inoculación directa a la leche en el caso de fabricación de yogur a pequeña escala (Tamime y Robinson, 1991).

## **2.6. FERMENTACIÓN DE LA LECHE POR BACTERIAS ACIDOLÁCTICAS DEL YOGUR**

La fermentación de la leche a partir de bacterias ácido lácticas del yogur, dan las características organolépticas (sabor y aroma) en el producto final. Estas características se dan a partir del metabolismo de las bacterias y a una buena selección del cultivo, que es el

responsable de la producción de ácido láctico, la coagulación de las proteínas de la leche y la producción de varios compuestos. Además, estas características también dependen de variables como la temperatura, pH, presencia de oxígeno y la composición de la leche (Tamime y Robinson, 1991).

En este proceso el ácido láctico producido disminuye el pH que desestabiliza la micela de la caseína a través de la solubilización del complejo micelar calcio-fosfato. A un pH de 4,6 a 4,7 la estructura de la caseína precipita, causando su coagulación y la formación del gel (Bylund, 2003).

## **2.7. PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS RELACIONADAS CON EL YOGUR**

### **2.7.1. pH**

Los valores de pH de un yogur están en un rango de 4,0 a 4,5 (Méndez, 2000), pero Meyer y Marcos (1982) mencionan que el pH de un yogur debe ser de 3,7 a 4,5 momento en el cual se produce el acetaldehído, sustancia que le confiere al yogur su sabor característico.

### **2.7.2. Acidez**

La acidez en productos lácteos es expresada como porcentaje de ácido láctico, según Puhan (1986), el porcentaje de ácido láctico presente en el yogur oscila entre 0.8 a 1.8% de ácido láctico.

La formación de ácido láctico hasta alcanzar concentraciones más o menos superiores a las que determinan la coagulación, se controla en función al tipo de yogur, este debe tener un mínimo de 0,7 g de ácido láctico por cada 100g de yogur, por tanto la determinación de acidez es un parámetro importante para su producción (Gómez, 1999).

La actividad metabólica de los microorganismos del yogur está dada por la velocidad de crecimiento y el desarrollo de la acidez, de ahí la importancia de determinar y dar seguimiento a la acidez desarrollada durante la elaboración del yogur. La acidez puede expresarse en distintos grados, pero el más común es el grado Dornic (°D); cada grado Dornic equivale a un decigramo de ácido láctico por litro; es decir si una leche tuviera 17 grados Dornic, su acidez será de 1.7 gramos de ácido láctico por litro (Gómez, 1999).

## **2.8. TEMPERATURA DE INCUBACIÓN DE LAS BACTERIAS ACIDOLÁCTICAS DEL YOGUR**

Así mismo La temperatura determina la cinética de la acidificación e influye sobre los cambios de pH y otros cambios que se producen como consecuencia de la presencia de oxígeno, de la concentración de otros componentes, de reacciones químicas y de cambios físicos (Skriver, 1997).

La temperatura debe elegirse próxima a la temperatura óptima de desarrollo del *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus*, es decir, 42 a 45°C, más que a una temperatura próxima a la óptima del *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* (47 a 50°C) ya que es preferible que los *Streptococcus* aseguren el comienzo de la fermentación láctica. Esta temperatura próxima de 42 a 45°C es por otra parte la temperatura simbiótica óptima (Luquet, 1991).

## **2.9. MICROBIOLOGÍA PREDICTIVA**

La microbiología predictiva de alimentos, de gran crecimiento en los últimos años, constituye un enfoque interdisciplinario en el que se conjugan la microbiología, la matemática, la estadística y la tecnología de alimentos, con el objeto de describir, por medio de ecuaciones matemáticas, el comportamiento de los microorganismos frente a

combinaciones de condiciones ambientales definidas y controladas. De esta capacidad de describir, surge la posibilidad de predecir la respuesta fisiológica de los microorganismos sobre la base de parámetros físico-químicos relevantes (Cayré *et al.*, 2004).

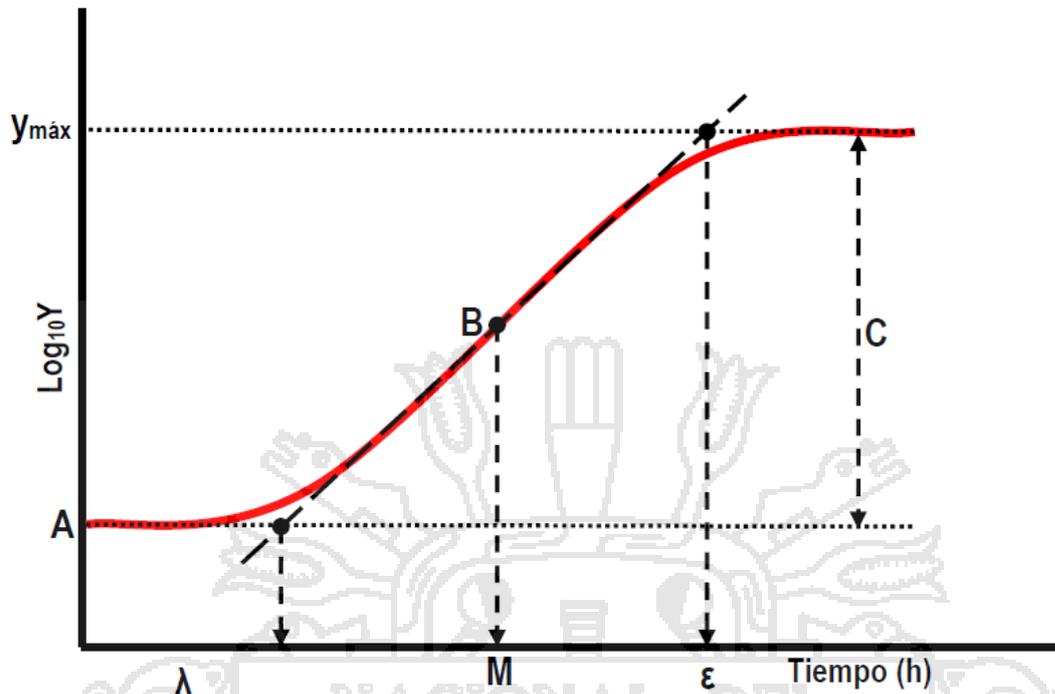
La microbiología predictiva está relacionada con la compleja dinámica del comportamiento de la población microbiana, tal como fue observado por Monod (1949), “El crecimiento de los cultivos bacterianos, a pesar de la inmensa complejidad del fenómeno, generalmente obedece a leyes relativamente sencillas, las cuales hacen posible definir ciertas características cuantitativas del ciclo del crecimiento, esencialmente las tres constantes del crecimiento: crecimiento total, tasa del crecimiento exponencial y crecimiento latente. Estas definiciones no son puramente arbitrarias y corresponden a elementos fisiológicamente distintos del ciclo de crecimiento” (McMeekin y Ross, 2002).

### **2.9.1. Modelo matemático predictivo**

Una de las herramientas más interesantes que actualmente disponemos para analizar y predecir el comportamiento de un sistema biológico es la construcción y posterior simulación de un modelo matemático. Debemos de destacar, en primer lugar, el mejor conocimiento de los procesos biológicos, y en segundo lugar, el espectacular avance de los ordenadores y el software matemático.

#### **2.9.1.1. Modelo de Gompertz Modificado**

La ecuación de Gompertz fue originalmente desarrollada para describir la mortalidad humana como una función de la edad. Gibson *et al.*, (1987) fueron los primeros en utilizar la ecuación de Gompertz para ajustar las curvas de crecimiento microbiano y encontraron que la ecuación podía describir con precisión la fase exponencial y estacionaria de las curvas sigmoides de crecimiento microbiano, pero no era eficaz para la fase de latencia.



**Figura 1:** Representación gráfica del modelo de Gompertz (Cabeza, 2013)

Para solventar este problema, Gibson *et al.*, (1987) propusieron el modelo modificado de Gompertz, el cual fue considerado como el mejor modelo sigmoide para curvas de crecimiento (Gibson *et al.*, 1987; Zwietering *et al.*, 1990; McMeekin *et al.*, 1993). Con la adopción de este modelo por el consorcio Food MicroModel en el Reino Unido y el grupo Pathogen Modelling Program (PMP) del USDA, este modelo ha sido ampliamente usado en Microbiología Predictiva. El modelo modificado de Gompertz se expresa en la siguiente ecuación:

$$Y_{(t)} = A + Ce^{[-e^{-B[t-M]}]} \quad (4)$$

Según Zwietering *et al.*, (1992) en el modelo anterior podemos deducir que:

$Y_{(t)}$  = Conteo de la población al tiempo  $t$  ( $\log_{10}$  población).

A = Logaritmo de la población al tiempo  $-\infty$ , lo que equivale a la densidad de población al tiempo inicial ( $Y_{\min} = Y_0$ ).

C = Incremento final en el número de bacterias ( $\log_{10}$ ), equivalente a  $Y_{\max} - Y_{\min}$ .

M = Tiempo en el cual el cultivo alcanza su máxima velocidad de crecimiento (h)

B = Velocidad máxima de crecimiento al tiempo M (1/h), equivalente a la pendiente en el punto de inflexión.

t = tiempo (h).

Si tomamos la ecuación modificada de Gompertz en una curva de crecimiento, los parámetros del modelo pueden representarse gráficamente como se muestra en la figura 1:

A partir de la ecuación anterior, pueden calcularse diversos parámetros del crecimiento tales como:

$$\text{Fase de latencia: } \lambda = M - \frac{1}{B} \text{ (horas)} \quad (5)$$

$$\text{Tiempo de generación: } T_g = \log 2 \frac{e}{BC} \text{ (horas)} \quad (6)$$

$$\text{Velocidad máxima de crecimiento: } \mu_{\max} = \frac{BC}{e} \text{ (log UFC/ml)/hora} \quad (7)$$

### 2.9.2. Construcción de modelo

Agatangelo (2007) indica que para la elaboración de un modelo existen algunos procedimientos básicos que han de ser tenidos en cuenta para la generación de datos. Para ello, es necesario hacer la elección de la cepa microbiana a estudiar, y, a continuación, decidir el método para la generación de datos.

### **2.9.2.1. Selección de cepa de microorganismo**

Existen varios enfoques que pueden utilizarse para elegir que cepa debe ser utilizada con el propósito de la construcción del modelo. Se puede elegir entre una cepa sola o una mezcla de diferentes cepas (Agatangelo, 2007).

Utilizar una cepa que haya sido previamente utilizada en varios estudios, o incluso con el propósito de crear modelos, proporciona el beneficio de los conocimientos previamente acumulados sobre la cepa en particular. Por otro lado, una cepa aislada a partir de un producto alimentario concreto, el cual es el objeto de la aplicación del modelo, proporciona la ventaja al producto (Rasch, 2004).

### **2.9.2.2. Generación de datos**

Para seguir el curso del crecimiento es necesario efectuar mediciones cuantitativas. El crecimiento exponencial es, por lo general, equilibrado, de modo que para poder determinar la velocidad de crecimiento puede utilizarse la medición de cualquier propiedad de la biomasa. Por comodidad, las propiedades habitualmente medidas son la masa celular o el número de células (Stanier *et al.*, 1989).

### **2.9.2.3. Método de recuento total en placa**

La calidad de un alimento depende de sus propiedades físicas, químicas, microbiológicas y sensoriales. La calidad microbiológica puede estimarse en términos generales mediante el análisis microbiológico de recuento total en placa (RTP). En algunos alimentos un RTP elevado indica una pobre calidad, los alimentos pueden tener una apariencia normal pero su RTP puede ser elevado lo que indica que la alteración del producto está muy cercana. El análisis de un alimento para estimar su RTP implica la homogenización de la muestra, la preparación de diluciones seriadas de la muestra

homogeneizada, la siembra en agar para recuento en placa, la incubación de estas aeróbicamente a 35 a 37 °C durante 48 horas, la enumeración de colonias desarrolladas y el cálculo de las UFC/ml o UFC/g de alimento (Yousef y Carlstrom, 2006).

### **2.9.3. Descripción matemática del modelo**

Los datos obtenidos son convenientemente seleccionados y se ajustan a un modelo primario, que explica la evolución del comportamiento microbiano a lo largo del tiempo de análisis. Posteriormente, los parámetros obtenidos del modelo se relacionan con los factores considerados mediante un modelo secundario. El ajuste de las funciones puede emplear métodos de regresión lineal o no lineal dependiendo del tipo de modelo. El ajuste del modelo a los datos observados está basado en el método de mínimos cuadrados, por el cual se intenta minimizar los valores residuales, esto es, la suma de los cuadrados de las diferencias entre los valores observados y predictivos (Mc Meekin *et al.*, 1993).

### **2.10. CRECIMIENTO MICROBIANO**

Los microorganismos crecen o se multiplican cuando se exponen a un ambiente favorable, como el alimento. Su crecimiento se asocia a la descomposición de alimentos, las enfermedades de origen alimentario y el bioprocesamiento de los mismos. El crecimiento también es importante para aislar una cepa microbiana desconocida relacionada con la descomposición de los alimentos, las enfermedades transmitidas por ellos o e bioprocesamiento de los alimentos, en una forma pura, y para estudiar sus características morfológicas, fisiológicas, bioquímicas y genéticas a fin de diseñar métodos para controlar y estimular su crecimiento en los alimentos, destruirlos, o mejorar su composición genética para su mejor uso (Agatangelo, 2007).

En microbiología, la palabra “crecimiento” se define como un incremento en el número de células o de masa celular por unidad de tiempo de una población microbiana (Madigan *et. al.*, 1997). Si un microorganismo es cenocítico, es decir, multinucleado, en el que las divisiones nucleares no se acompañan de divisiones celulares, el crecimiento produce un incremento de tamaño pero no del número de células. El crecimiento ocasiona un aumento del número de células cuando los microorganismos se multiplican por procesos como gemación o fisión binaria. En este caso las células individuales se agrandan y dividen para originar dos células hijas de un tamaño aproximadamente igual (Prescott *et al.*, 1999).

### 2.10.1. Fases de crecimiento microbiano

La curva de crecimiento de un cultivo microbiano puede ser subdividida en cuatro partes distintas denominadas fase de latencia, fase exponencial, fase estacionaria y fase de muerte (Agatangelo, 2007).

**La fase de latencia**, es el período de ajuste que las células experimentan al ser transferidas de un medio al otro antes de iniciar su crecimiento. **La fase exponencial o logarítmica** es aquella durante la cual los microorganismos crecen y se dividen hasta el nivel máximo posible, en función de su potencial genético, tipo de medio y las condiciones en que crece. En este período hay una relación lineal entre el logaritmo del número de células (o cualquier otra propiedad medible de la población) y el tiempo. Los microorganismos se dividen y duplican en número en intervalos regulares. Como cada célula se divide en un momento ligeramente diferente del resto, la curva de crecimiento aumenta suavemente, en lugar de realizar discretos saltos. **La fase estacionaria** es resultado del agotamiento de los nutrientes disponibles o del efecto de acumulación de productos tóxicos de metabolismo que tienen como consecuencia la disminución de la

velocidad del crecimiento. La transición entre la fase exponencial y la fase estacionaria se caracteriza por un crecimiento desequilibrado, durante el cual los diversos componentes celulares son sintetizados a diferentes velocidades. Y la fase de muerte es consecuencia de diversos factores: uno importante es el agotamiento de las reservas celulares de energía. Al igual que el crecimiento, la muerte también asume una función exponencial que puede ser representada por una disminución lineal del número de las células viables a lo largo del tiempo (Madigan *et al.*, 1997; Prescott *et al.*, 1999).

## **2.10.2. Parámetros cinéticos de crecimiento microbiano**

### **2.10.2.1. Tiempo de adaptación**

El tiempo de adaptación es la duración de la fase de latencia. Un fenómeno inherente a la cinética microbiana es la latencia, la cual es típicamente observada como la respuesta retardada de la población microbiana ante un (repentino) cambio en el ambiente. La fase de latencia puede producirse en ambos procesos, de crecimiento y de inactivación (Swinnen *et al.*, 2004).

En el caso de las condiciones de crecimiento, la fase de latencia es el período de ajuste durante el cual las células bacterianas se modifican por si mismas con el objetivo de sacar ventaja del nuevo ambiente e iniciar el crecimiento exponencial (Buchanan y Klawitter, 1991). Por tanto, durante la fase de latencia las células se adaptan a su nuevo entorno induciendo o reprimiendo la síntesis y actividad de determinadas enzimas, iniciando la replicación de su material genético, y, en el caso de las esporas, diferenciándose en células vegetativas (Montville, 2000).

La fase de latencia del crecimiento microbiano fue definida en 1914 por Penfold como el intervalo entre la inoculación del cultivo bacteriano y el tiempo del comienzo de su

velocidad máxima de crecimiento. Y suele ser convencionalmente medido como el punto en el cuál la pendiente de la fase exponencial de crecimiento (en una gráfica semi-logarítmica) intercepta la línea horizontal trazada desde la concentración celular inicial (Robinson *et al.*, 1998).

Buchanan y Solberg definieron en 1972 la fase de latencia como el tiempo necesario para que la densidad de población se duplique (Robinson *et al.*, 1998).

La duración de la fase de latencia se ve afectada por factores como la identidad y el fenotipo de la bacteria, el tamaño del inóculo, la historia fisiológica de la población, y por los cambios en el medio físico-químico, tales como la temperatura, el pH, la actividad de agua y la disponibilidad de nutrientes (Buchanan y Cygnarowicz, 1990).

#### **2.10.2.2. Tiempo de generación**

El tiempo de generación es el tiempo necesario para duplicar la población bacteriana. Según Stanier *et al.*, (1989) se define como el tiempo requerido para que todos los componentes del cultivo aumenten en un factor de 2.

Durante este período de generación el número de células y la masa celular se duplica. El tiempo de generación varía entre los distintos microorganismos. Muchas bacterias tienen tiempos de generación de 1 a 3 horas, conociéndose pocos microorganismos que crezcan muy rápidamente dividiéndose en menos de 10 minutos. Otras tienen tiempos de generación de varias horas o incluso días. El tiempo de generación es útil como indicador del estado fisiológico de una población celular, y es usado con frecuencia para comprobar el efecto negativo o positivo de un determinado tratamiento sobre un cultivo bacteriano (Madigan *et al.*, 1997).

El tiempo de generación está directamente relacionado con la velocidad de crecimiento exponencial, que se define como la pendiente de la curva de crecimiento logarítmico en la fase de crecimiento exponencial. Generalmente, estos dos parámetros son estimados por el ajuste de los modelos primarios (Delignette - Muller, 1998), tales como la ecuación modificada de Gompertz (Gibson *et al.*, 1988; Zwietering *et al.*, 1990) o el modelo propuesto por (Baranyi y Roberts, 1994).

### 2.10.2.3. Velocidad máxima de crecimiento

El crecimiento se define como un incremento en el número de células microbianas en una población, lo cual también puede ser medido como un incremento en masa microbiana. En este contexto, la velocidad de crecimiento se define como el cambio en número de células o masa celular por unidad de tiempo (Madigan *et al.*, 1999).

Un cultivo microbiano creciendo en equilibrio imita una reacción autocatalítica de primer orden, es decir, la velocidad del aumento de bacterias en un tiempo dado es proporcional al número o masa de bacterias presentes durante ese tiempo (Stanier *et al.*, 1989).

La tasa del crecimiento exponencial se ve influenciada por las condiciones ambientales (temperatura, composición del medio), así como por las características genéticas del microorganismo (Madigan *et al.*, 1997).

Ray y Bhunia (2010) indican que la velocidad máxima de crecimiento varía de acuerdo con los tipos y especies microbianas y el ambiente de crecimiento. Por lo general, es de aproximadamente 0.2 para mohos y levaduras. Una cepa bacteriana de rápido crecimiento bajo condiciones óptimas puede tener una  $\mu_{\text{máx}}$  de 2.5 o más alto. Bajo condiciones de crecimiento no óptimas, la  $\mu_{\text{máx}}$  puede estar entre 0.2 y 0.02.

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. LUGAR DE EJECUCIÓN

El trabajo de investigación se ejecutó en el laboratorio de Microbiología Agroindustrial y en la Planta Piloto de Industrias Lácteas, de la Escuela Profesional de Ingeniería Agroindustrial de la Universidad Nacional del Altiplano Puno ubicado a una altitud de 3827 m.s.n.m. en la ciudad del mismo nombre.

#### 3.2. MATERIAL EXPERIMENTAL

La leche fresca como materia prima se adquirió del Centro de Producción de Lácteos Ecológica y Aromática de la Cooperativa de Servicios San Santiago del Centro Poblado de Caritamaya del distrito de Acora.

Las Bacterias ácidolácticas utilizadas fueron: *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* y *Streptococcus salivarius subsp. termophilus*, YO-MIX™ 883 LYO 50 DCU; 1 sobre de 5.8 g equivalente para 500 litros de leche, procedente de la empresa DANISCO.

Los medios de cultivo utilizados fueron: El M17 Agar para la siembra del *Streptococcus salivarius subsp. termophilus*, proveniente de la empresa OXOID de Inglaterra. El MRS Agar para la siembra de *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*, proveniente de la empresa BRITANIA LAB de Argentina. Y la Lactosa Monohidratada proveniente de HMEDIA LAB de India.

#### 3.3. MATERIALES Y EQUIPOS

##### 3.3.1. Materiales

- Matraces Erlenmeyer, boca angosta graduado de 100, 250 y 500 ml marca pírex
- Probeta graduada, con pie hexagonal y pico de 50, 100 y 250 ml
- Espátulas de acero inoxidable
- Frasco lavador piceta de polietileno boca angosta cap. 500ml
- Gradilla esterilizable sin alambre No-Wire

- Mechero de alcohol
- Placas Petri marca STERIPLAN, en vidrio cal soda de  $\varnothing$  60
- Vasos de precipitado de 50ml marca pírex
- Pipetas volumétricas 0.5, 1, 5, 10 y 20 ml
- Tubo de ensayo de 20 ml
- Vasos precipitado de forma baja, graduado con pico Beaker
- Fiólas de 500 ml marca pírex
- Varillas de agitación

### 3.3.2. Equipos de laboratorio

- Autoclave de mesa 16 Litros AUTBN 30 marca FRAVILL
- Balanza analítica precisión marca SARTORIUS CP3235 Cap. de 0.001 a 320 g
- Cocina eléctrica
- Contador de colonias BIO TECHNOLOGY.
- Estufa Universal e incubadoras marca “MEMMERT”
- pH-metro SevenGo™ de METTLER TOLEDO (0.0 a 14.0)
- Esterilizador
- Refrigeradora
- Termómetros -5 a 120°C marca Boeco.
- Descremadora de leche
- Acidómetro
- Lactoscan LA

### 3.3.3. Reactivos

- Hidróxido de sodio (NaOH 0,1N)
- Solución alcohólica de fenolftaleína al 1%

- Alcohol puro 96°

#### **3.3.4. Medios de cultivo**

- Agar Man Rogosa Sharpe (MRS) marca Britania de Argentina proveído por Biosym E.I.R.L. Peruana.
- M 17 Agar CM 0785 marca OXOID de Inglaterra, proveído por JF Importaciones Lima – Perú.
- Lactosa Monohidratada marca CDH de India, proveído por JF Importaciones Lima – Perú).
- Agua de Peptona marca MAST, proveído por Biosym E.I.R.L. Peruana.
- Agua destilada químicamente pura desmineralizada desionizada DIAMEDSA.

#### **3.4. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL**

El presente trabajo de investigación se ha realizado según el diagrama experimental mostrado en la Figura 2.

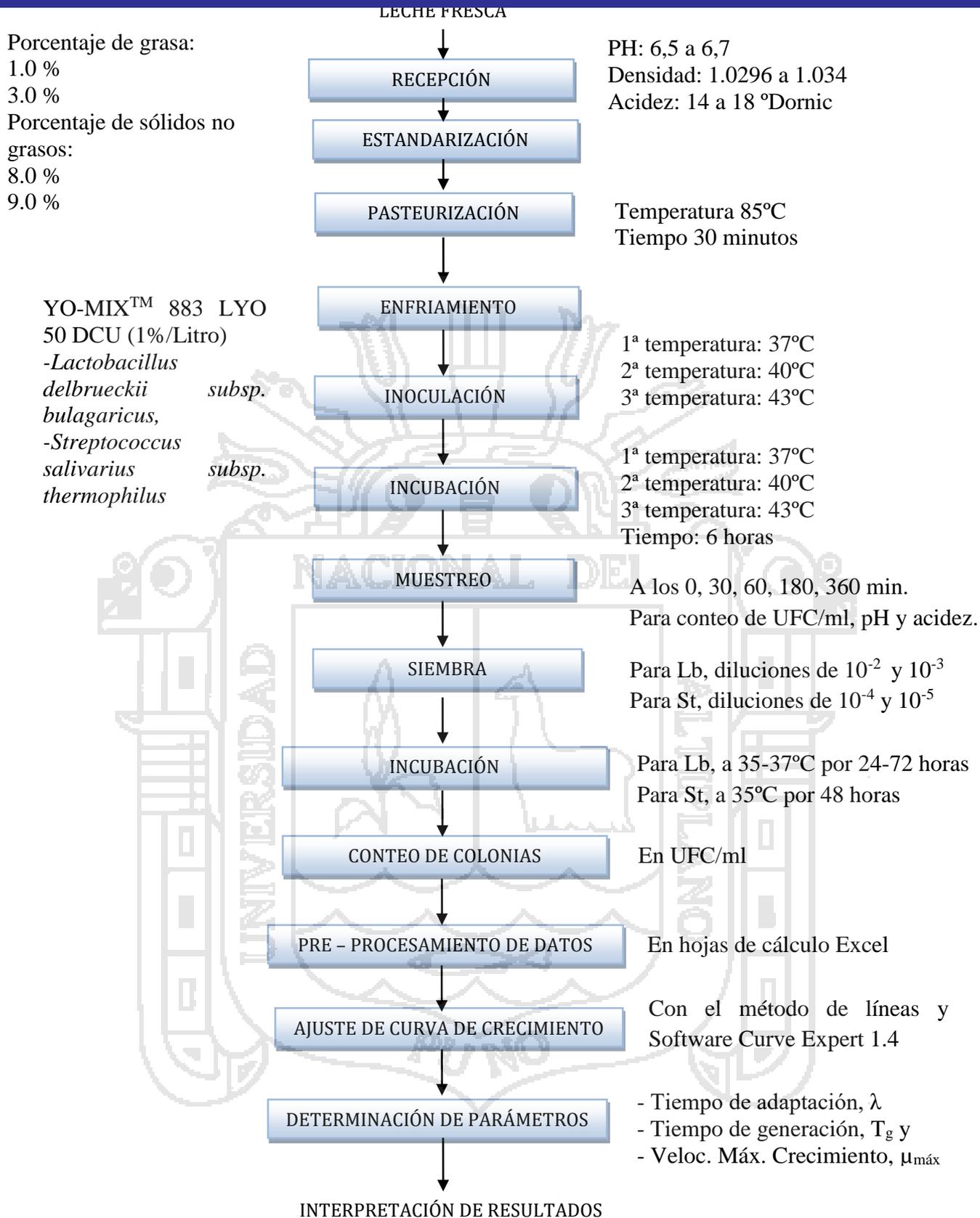


Figura 2. Diagrama de flujo para obtener los parámetros cinéticos de crecimiento del *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* y *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus*.

### **3.4.1. Descripción del proceso experimental**

#### **Recepción de la materia prima**

En esta etapa se realizó la recepción de la leche fresca proveniente del Centro de Producción de Lácteos Ecológica y Aromática de la Cooperativa de Servicios San Santiago del Centro Poblado de Caritamaya del distrito de Acora.

#### **Estandarización**

En esta etapa del proceso de estudio se analizó la leche fresca en el Lactoscan LA, para determinar el porcentaje de sólidos grasos y sólidos no grasos. Para estandarizar la leche a 1% y 3% de sólidos grasos y 8% y 9% de sólidos no grasos se siguió la metodología de Villegas y Santos (2009) y Alcázar (2002).

#### **Pasteurización**

Esta operación se realizó fundamentalmente para destruir bacterias contaminantes (flora bacteriana competente del cultivo láctico). La temperatura adecuada de pasteurización es de 85 °C por 30 minutos (Gómez, 1999).

#### **Enfriamiento**

Después del tratamiento térmico, la leche se enfrió rápidamente a las temperaturas en estudio de 37, 40 y 43 °C; con la finalidad de mantener la leche libre de microorganismos contaminantes; y llegar a una temperatura adecuada para el desarrollo de las bacterias ácidolácticas del yogurt.

### **Inoculación**

Cuando se llegó a las temperaturas en estudio (37°C, 40°C y 43°C) se adicionó el cultivo mixto de yogur YOMIX 883 50DCU, en 1 %, en 1 litro de leche estandarizada y pasteurizada.

### **Muestreo**

En esta etapa de la investigación se sacó muestras de 10 ml de muestra para la siembra de cada una de las bacterias ácidolácticas estudiadas (leche en proceso de fermentación) a los 0, 30, 60, 180 y 360 minutos. Así mismo se ha extraído muestras de 25 ml y 9ml para determinar el pH y la acidez.

### **Siembra**

En esta operación se realizó las diluciones para la siembra de cada bacteria ácido láctica del yogur. Para el *Streptococcus salivarius subsp. termophilus* se sembraron por duplicado las diluciones bajas de  $10^{-4}$  y  $10^{-5}$ ; y para el *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* las diluciones de  $10^{-2}$  y  $10^{-3}$  respectivamente.

### **Incubación**

En las estufas o cámaras incubadoras calibradas a temperatura de 35 a 37 °C para el desarrollo y crecimiento de las bacterias, se colocaron las cajas Petri estériles en forma invertida.

### **Conteo de colonias**

El conteo de las colonias después de haber sido incubadas se realizó en un contador de colonias BYO TECHNOLOGY.

### **Pre procesamiento de datos**

Una vez obtenida los datos de pH, acidez y número de microorganismo, se agruparon los datos en una hoja de cálculo de Excel para expresar la acidez en % de ácido láctico el número de microorganismos en UFC/ml y log UFC/ml.

### **Ajuste de curvas de crecimiento**

Con la ayuda de una hoja de cálculo Excel se graficó el tiempo de incubación (proceso de fermentación) versus el log UFC/ml y por el método de las líneas se determinaron los parámetros experimentales de crecimiento para cada tratamiento, para luego ajustarlos con modelos de regresión no lineal cada uno de los modelos primarios, con el software Curve Expert 1.4.

### **Determinación de parámetros**

Los valores obtenidos en la etapa anterior fueron introducidos a una hoja de cálculo del Excel, para luego reemplazarlos en los modelos matemáticos primarios.

### **Interpretación de resultados**

Finalmente se interpretó los resultados para cada uno de los tratamientos estudiados.

## **3.5. MÉTODO DE ANÁLISIS**

### **3.5.1. Método para el análisis microbiológico de bacterias ácidolácticas del yogur**

#### **3.5.1.1. Preparación de muestras y diluciones**

Para la realización de los análisis microbiológicos, se utilizó la metodología propuesta por Montiel *et al.*, (2010). Utilizando 10 g de muestra, los cuales fueron diluidos en 90 ml de una solución de agua peptonada al 0.1% estéril para el MRS Agar. Para el M17 Agar se siguió la metodología especificada en la ficha técnica del propio Agar.

Posteriormente se realizó las diluciones decimales pertinentes, de las cuales se inoculó 1 mL, en cajas Petri estériles (100 mm x 15 mm).

Preparación de las diluciones: Las diluciones se prepararon a partir de la muestra homogenizada, tomando de ella 1 ml que se depositó en un tubo que contenía 9 ml de agua de peptona estéril al 1%. Después de agitado el tubo, se tomó 1 ml que se añadió a un nuevo tubo con 9 ml de agua de peptona estéril y así sucesivamente, hasta conseguir la dilución deseada.

### **3.5.1.2. Cuantificación de *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus***

Se utilizó Agar MRS (De Man Rogosa Sharpe), el cual se disolvió en agua destilada desionizada, ajustando el pH a 5.4, posteriormente se esterilizó a 121°C durante 15 min. A las cajas Petri estériles se les adicionó de 15 a 20 ml de medio de cultivo entre 40 y 45°C, se dejó solidificar para luego hacer la siembra en superficie de las muestras ( $10^2$  y  $10^3$ ) homogenizadas, luego se incubaron entre 35 y 37°C, durante 72 horas, la cuantificación se realizó contando el número de unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/ml), con la ayuda de un contador de colonias.

### **3.5.1.3. Cuantificación de *Streptococcus salivarius subsp. termophilus***

Se utilizó M17 Agar el cual se disolvió en agua destilada y se le añadió en 10%, solución estéril de lactosa, posteriormente se esterilizó a 121°C durante 15 min. Para la muestra se extrajo  $10 \pm 0,1$  ml de leche fermentada (yogur), para luego mezclarlo con la solución peptona al 0,1% estéril hasta que la muestra y el diluyente sean 50 ml y previamente se realizó las diluciones sucesivas hasta  $10^{-5}$ . Después de la esterilización del medio del cultivo, éste se añadió de 14 – 15 ml a  $43 \pm 1^\circ\text{C}$  en placas Petri, dejándolo solidificar para la siembra en superficie de las diluciones requeridas; luego las placas Petri

se incubaron a 35°C durante 48 horas. La cuantificación se realizó contando el número de unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/ml), con la ayuda de un contador de colonias. Las colonias de *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* no crecieron, ni se desarrollaron el crecimiento fue muy restringido.

### 3.5.2. Método para el análisis fisicoquímico

#### 3.5.2.1. Determinación de pH

La medición del pH fue realizada a los 0, 30, 60, 180 y 360 minutos de incubación (proceso de fermentación) con un pH-metro marca SevenGo™ de METTLER TOLEDO, de acuerdo con el método de Coloma (2009). Se tomó 25 ml de muestra, en un vaso de 50 ml, posteriormente se midió el pH por introducción directa del electrodo en la misma. Cada medición se realizó por triplicado.

#### 3.5.2.2. Determinación de acidez titulable

La determinación de la acidez se realizó por el método propuesto por López-Malo, (2000). Para cada tratamiento en estudio, en todo el proceso de fermentación y formación del coagulo, en los tiempos de estudio establecidos; por titulación con hidróxido de sodio de normalidad conocida (N=0.1), tomando una muestra de 9 ml, empleando como indicador solución alcohólica de fenolftaleína a la concentración de 1%; con la siguiente formula:

$$\% \text{Acido} = \frac{(\text{ml NaOH})(N)(\text{Meq})}{\text{Peso de la muestra}} * 100 \quad (8)$$

Dónde:

ml NaOH: Gasto de NaOH

N: Normalidad del NaOH

Meq: Mili equivalente de ácido predominante en la muestra (Meq = 90/1000 = 0.09)

Cabe indicar que este método de titulación se utilizó para la leche y para las muestras de leche fermentada en el proceso de incubación.

### 3.5.3. Determinación de la curva de crecimiento y parámetros de crecimiento cinético.

Los datos de crecimiento en Log UFC/ml y tiempo, fueron introducidos para cada tratamiento en una hoja de cálculo Excel y determinar los valores de los parámetros (A, B, C y M), para luego ser ajustados con el modelo matemático primario de Gompertz modificado con Software Curve Expert 1.4 y se efectuó el proceso analítico.

#### 3.5.3.1. Modelo de Gompertz Modificado

Para determinar los parámetros de crecimiento cinético: Tiempo de adaptación ( $\lambda$ ), Tiempo de generación ( $T_g$ ) y Velocidad máxima de crecimiento ( $\mu_{\max}$ ), se basó en el modelo de Gompertz modificado, planteado por Gibson *et al.*, (1987).

El modelo utilizado queda expresado de la siguiente forma:

$$\log N = A + C \exp\left(-\exp(-B(t - M))\right) \quad (9)$$

Dónde:

Log N: Es el logaritmo decimal ( $\text{Log}_{10}$ ) del número de microorganismos (Log UFC/ml) al tiempo t.

A: Es el logaritmo decimal del número inicial de microorganismos (Log UFC/ml)

C: Es el incremento en el logaritmo del número de microorganismos cuando el tiempo se incrementa indefinidamente (número de ciclos de crecimiento) (Log UFC/ml)

B: Es la velocidad de crecimiento máxima relativa al tiempo M (Log UFC/ml/hora)

M: Es el tiempo requerido para alcanzar la máxima velocidad de crecimiento (horas)

Los parámetros obtenidos a partir de la ecuación de Gompertz modificado permitieron calcular:

$$\text{Velocidad máxima de crecimiento: } \mu_{\text{máx}} = \frac{BC}{e} (\log \text{ UFC/ml})/\text{hora} \quad (10)$$

$$\text{Fase de latencia: } \lambda = M - \frac{1}{B} (\text{horas}) \quad (11)$$

$$\text{Tiempo de generación: } T_g = \log 2 \frac{e}{BC} (\text{horas}) \quad (12)$$

### 3.6. UNIDADES DE ANÁLISIS Y OBSERVACIONES

#### 3.6.1. Factores en estudio

a. Temperatura (T)

- 37 °C
- 40 °C
- 43 °C

b. Porcentaje de solidos grasos (%SG)

- 1%
- 3%

c. Porcentaje de solidos no grasos (%SNG)

- 8%
- 9%

#### 3.6.2. Factores de respuesta

- Parámetros cinéticos de crecimiento microbiano
- Propiedades fisicoquímicas

### 3.6.3. Indicadores

#### a. Variación de valores de parámetros de crecimiento

- Tiempo de adaptación ( $\lambda$ )
- Velocidad máxima de crecimiento ( $\mu_{\text{máx}}$ )
- Tiempo de generación ( $T_g$ )

#### b. Variación de propiedades fisicoquímicas

- pH
- Acidez titulable (expresado en % ácido láctico)

## 3.7. DISEÑO DE INVESTIGACIÓN

Para procesar los datos obtenidos durante la investigación se aplicó:

Para el primer objetivo se realizó un análisis de regresión lineal múltiple, para estimar los parámetros del modelo de regresión múltiple se utilizó el método de los mínimos cuadrados. Se trabajó con el programa estadístico Statgraphics® Centurion XVI (Statpoint Technologies Inc.).

Para lo cual se planteó el siguiente modelo de regresión lineal múltiple con tres regresores:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \varepsilon \quad (13)$$

Dónde:

$Y$  = Es la variable de respuesta, representa al tiempo de adaptación ( $\lambda$ ) horas, al tiempo de generación ( $T_g$ ) y la velocidad máxima de crecimiento ( $\mu_{\text{máx}}$ ).

$X_1$  = Es la variable en estudio, Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ).

$X_2$  = Es la variable en estudio, Porcentaje de Grasa (%G).

$X_3$  = Es la variable en estudio, Porcentaje de Sólidos no Grasos (%SNG).

$\beta_0, \beta_1, \beta_2, \beta_3$  = Son los parámetros desconocidos que han sido estimados.

$\varepsilon$  = Es el error residual.

Para el segundo objetivo se aplicó el análisis de varianza (ANOVA), con un 95.0% de significancia ( $P < 0.05$ ) para determinar las posibles diferencias entre los tratamientos. Se trabajó con el programa estadístico Statgraphics® Centurion XVI (Statpoint Technologies Inc.).

Se utilizó un experimento factorial de tres factores (Temperatura (T), porcentaje de sólidos grasos (% SG) y porcentaje de sólidos no grasos (% SNG)), donde el factor T tiene tres niveles, el factor % SG tiene 2 niveles y el factor % SNG tiene 2 niveles, las cuales se simbolizó como un experimento factorial de  $3 \times 2 \times 2$ ; y el número de tratamientos, producto de las combinaciones será igual a 12. Todo esto bajo el diseño completo al azar (DCA) con 3 repeticiones, ajustado al siguiente modelo lineal en el diseño completo al azar:

$$Y_{ijkl} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \gamma_k + (\alpha\beta)_{ij} + (\alpha\gamma)_{ik} + (\beta\gamma)_{jk} + (\alpha\beta\gamma)_{ijk} + \varepsilon_{ijkl} \quad (14)$$

$i = 1, 2, 3$  (temperaturas)

$j = 1, 2$  (porcentaje de sólidos grasos)

$k = 1, 2$  (porcentaje de sólidos no grasos)

$l = 1, 2, 3$  (repeticiones)

Dónde:

$Y_{ijkl}$  = Es la variable de respuesta de la  $l$ -ésima observación bajo el  $k$ -ésimo nivel de porcentaje de sólidos no grasos, en el  $j$ -ésimo nivel del porcentaje de sólidos grasos, sujeto al  $i$ -ésimo nivel de temperaturas.

$\mu$  = Constante, media de la población a la cual pertenece las observaciones.

$\alpha_i$  = Efecto del  $i$ -ésimo nivel de temperaturas.

$\beta_j$  = Efecto del  $j$ -ésimo nivel de porcentaje de sólidos grasos.

$\gamma_k$  = Efecto del k-ésimo nivel de porcentaje de solidos no grasos.

$(\alpha\beta)_{ij}$  = Efecto de la interacción del i-ésimo nivel de temperaturas, con el j-ésimo nivel de porcentaje de solidos grasos.

$(\alpha\gamma)_{ik}$  = Efecto de a interacción del i-ésimo nivel de temperaturas, en el k-ésimo nivel de porcentaje de solidos no grasos.

$(\beta\gamma)_{jk}$  = Efecto de la interacción del j-ésimo nivel de porcentaje de solidos grasos, en el k-ésimo nivel de porcentaje de solidos no grasos.

$(\alpha\beta\gamma)_{ijk}$  = Efecto de la interacción del i-ésimo nivel de temperaturas, en el j-ésimo nivel de porcentaje de solidos grasos, sujeto al k-ésimo nivel de porcentaje de solidos no grasos.

$\varepsilon_{ijkl}$  = Efecto del error experimental, que está distribuido como  $\varepsilon_{ijkl} \sim \text{DNI}(0, \sigma_e^2)$

### 3.7.1. Tratamientos o combinaciones de factores

	T	% SG	% SNG
TRAT 1	37 °C	1%	8%
TRAT 2	37 °C	1%	9%
TRAT 3	37 °C	3%	8%
TRAT 4	37 °C	3%	9%
TRAT 5	40 °C	1%	8%
TRAT 6	40 °C	1%	9%
TRAT 7	40 °C	3%	8%
TRAT 8	40 °C	3%	9%
TRAT 9	43 °C	1%	8%
TRAT 10	43 °C	1%	9%
TRAT 11	43 °C	3%	8%
TRAT 12	43 °C	3%	9%

#### IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

##### 4.1. EFECTO DE LA TEMPERATURA, PORCENTAJE DE GRASA Y SÓLIDOS NO GRASOS EN EL CRECIMIENTO CINÉTICO DE *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* y *Streptococcus salivarius subsp. termophilus*

Para el mejor entendimiento de los análisis y mayor precisión de los resultados se ha visto conveniente presentarlos los resultados del estudio en forma independiente, siendo estos, los siguientes:

###### 4.1.1. *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*

###### 4.1.1.1. Efecto de la temperatura, porcentaje de grasa y sólidos no grasos sobre el tiempo de adaptación ( $\lambda$ )

En el anexo 2, se presenta los resultados del tiempo de adaptación, determinada con los valores (M y B) mostrado en el anexo 1, obtenidos por la metodología de ajuste de la curva de crecimiento con el modelo matemático de Gompertz modificado expresado por (Gibson *et al.*, 1987); las curvas de crecimiento ajustadas para los 12 tratamientos se observan en las figuras del anexo 3.

Las curvas de crecimiento del *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* para los 12 tratamientos observadas en el anexo 3 muestran la etapa de fase de latencia o adaptación. Los escasos estudios para el tiempo de adaptación para esta bacteria nos permiten mencionar que el tiempo de adaptación está relacionado con el aumento de la temperatura, como Zarate (2009) menciona que cuanto más alta es la temperatura, menor es el tiempo que se requiere para que se inicie el crecimiento logarítmico. En la presente investigación se observó que a temperatura de 37°C se registró un tiempo de adaptación de

1,113 horas (66,78 min), mientras que a 40°C se registró en promedio 0,864 horas (51,84 min) y a 43°C, 0,501 horas (30,06 min); se observa que a medida que aumenta la temperatura este parámetro es menor, entonces podemos indicar que en este tiempo el microorganismo se adapta a nuevo ambiente y activa la maquinaria metabólica necesaria para utilizar de la mejor forma posible los nutrientes disponibles y acoplarse a las nuevas condiciones de crecimiento. Este intervalo de tiempo definido por Penfold (1914), citado por Robinson *et al.*, (1998), indica el tiempo entre la inoculación del cultivo hasta el comienzo de su velocidad máxima de crecimiento. Para lo cual Montville (2000), indica que en ese tiempo las células de *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* inician la replicación de su material genético.

**Tabla 3.** Análisis de Varianza (ANOVA) para la regresión lineal múltiple sobre el tiempo de adaptación ( $\lambda$ ) del *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*.

F. de V.	gl	S.C.	C.M.	RAZÓN-F	VALOR-P	Significancia
Debido a la regresión	1	1,95229	1,95229	19,56	0,0013	*
Error Residual	10	0,99834	0,099834			
Total	11	2,95063				

En la tabla 3 se presenta el análisis de varianza (ANOVA) observándose que existe una relación estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ) entre la variable independiente temperatura, con un nivel de confianza del 95,0 %. El modelo de regresión múltiple fijado para describir la relación entre el tiempo de adaptación ( $\lambda$ ) y la variable independiente temperatura, se expresó de la siguiente manera:

$$\lambda = 7,2875 - 0,164667 * T \quad (15)$$

El coeficiente de determinación ( $R^2$ ) indica que el modelo así ajustado explica 66,16% de la variabilidad en el tiempo de adaptación ( $\lambda$ ). El coeficiente de determinación ajustada ( $R^2$ ), que es más apropiada para comparar el modelo con diferente número de variables independientes, es 62,78%. Cabe indicar que en este porcentaje el tiempo de adaptación es influido por la temperatura y un 37,21% es influido por otros factores diferentes al porcentaje de sólidos grasos y sólidos no grasos. No obstante Buchanan y Cignarowicz (1990), mencionan que el tiempo de adaptación es influida por factores como el fenotipo de la bacteria, el tamaño del inóculo y por los cambios fisicoquímicos como la temperatura, pH y la disponibilidad de nutrientes.

La ecuación (15) puede utilizarse como modelo para predecir el tiempo de adaptación a diferentes temperaturas comprendidas en el rango de las temperaturas estudiadas 37 a 43°C; además para la temperatura mínima de 22°C mencionada por (Gómez, 1999), hasta un máximo de 44°C.

#### **4.1.1.2. Efecto de la temperatura, porcentaje de grasa y sólidos no grasos sobre el tiempo de generación ( $T_g$ )**

En el anexo 2, se presenta los resultados del tiempo de generación ( $T_g$ ), determinada con los valores (B y C) mostrada en el anexo 1, obtenidos por la metodología de ajuste de la curva de crecimiento con el modelo matemático de Gompertz modificado expresado por (Gibson *et al.*, 1987). Las curvas de crecimiento se muestran en el anexo 3.

Agatangelo (2007) asocia el tiempo de generación ( $T_g$ ) a la fase exponencial, donde los microorganismos se dividen y duplican en número en intervalos regulares, también indica que cada célula se divide en un momento ligeramente diferente al resto, y la curva de crecimiento aumenta suavemente, en vista a ello Chervaux *et al.*, (2000) investigó el

crecimiento del *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* en leche con diferentes concentraciones de lactosa, incubado a 42 °C, indicando que el tiempo de generación ( $T_g$ ) aumenta de 68 min hasta 160 min (2,67 horas), cuando la concentración de lactosa varía de 0,4 a 0,1%. Este valor se aproxima a lo encontrado en el T5 donde el  $T_g$  es de 2,965 horas, esto probablemente debido a que la leche utilizada en el T5 contenía una baja concentración de lactosa. Así mismo Agudelo *et al.*, (2010) menciona que el tiempo de generación ( $T_g$ ) del *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* en la fermentación de vísceras y residuos de pescado a 35°C, fue de 1,28 horas, lo cual indica que es el tiempo necesario para que la población del cultivo duplique su tamaño.

Los tratamientos T2, T4, T6, T7, T8, T9, T10 y T11 reportaron tiempos de generación menores a 0,921 horas (55 min), estos menores tiempos de generación pueden estar atribuidos a lo mencionado por Agatangelo (2007) quien indica que el incremento del pH disminuye el tiempo de generación en las bacterias.

Los tiempos de generación obtenidos en nuestra investigación para los tratamientos T1, T3 Y T9, fue de 1,1 horas, estos valores se asemejan a lo mencionado por Agudelo *et al.*, (2010) quien indica que se encontró un tiempo de generación ( $T_g$ ) de 1,1 horas en un medio de fermentación con almidón. Otros autores reportaron un tiempo de generación ( $T_g$ ) de 1,98 horas para el *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*.

En la tabla 4 se muestra el análisis de varianza (ANOVA) observándose que no existe una relación estadísticamente significativa ( $p \geq 0,05$ ) entre las variables independientes de temperatura, porcentaje de grasa y sólidos no grasos, con un nivel de confianza del 95,0 %. Con un coeficiente de determinación ( $R^2$ ) de 43,30% y ajustada ( $R^2$ ), de 22,05%.

**Tabla 4.** Análisis de Varianza (ANOVA) para la regresión lineal múltiple sobre el tiempo de generación (Tg) del *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*.

F. de V.	gl	S.C.	C.M.	RAZÓN-F	VALOR-P	Significancia
Debido a la regresión	3	2,81581	0,938605	2,04	0,1873	n.s.
Error Residual	8	3,68591	0,460739			
Total	11	6,50172				

Por tal razón las temperaturas de 37, 40, 43°C, las concentraciones de grasa de 1 y 3%, y sólidos no grasos de 8 y 9%; no influyeron en el tiempo de generación del *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*. Este efecto probablemente se deba a lo mencionado por Bhunia y Ray (2010) quienes indican que las células bacterianas en una población tienen índices metabólicos diferentes en condiciones distintas como disponibilidad de nutrientes y factores ambientales.

Así mismo este resultado puede estar afecto a los componentes específicos de las células, como proteínas, RNA o DNA.

#### **4.1.1.3. Efecto de la temperatura, porcentaje de grasa y sólidos no grasos sobre la máxima velocidad de crecimiento ( $\mu_{\text{máx}}$ )**

En el anexo 2, se presenta los resultados la velocidad máxima de crecimiento ( $\mu_{\text{máx}}$ ), determinada con los valores (B y C) mostrada en el anexo 1, estos valores fueron obtenidos por la metodología de ajuste de la curva de crecimiento (anexo 3) con el modelo matemático de Gompertz modificado expresado por (Gibson *et al.*, 1987).

**Tabla 5.** Análisis de Varianza (ANOVA) para la regresión lineal múltiple sobre la velocidad máxima de crecimiento ( $\mu_{\text{máx}}$ ) del *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*.

F. de V.	gl	S.C.	C.M.	RAZÓN-F	VALOR-P	Significancia
Debido a la regresión	1	1,84032	1,84032	5,61	0,0394	*
Error Residual	10	3,27944	0,327944			
Total	11	5,11976				

En la tabla 5 se muestra el análisis de varianza (ANOVA) observándose que existe una relación estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ) entre la variable independiente temperatura, con un nivel de confianza del 95,0 %. El modelo de regresión múltiple fijado para describir la relación entre la velocidad máxima de crecimiento ( $\mu_{\text{máx}}$ ) y la variable independiente temperatura, se expresó de la siguiente forma:

$$\mu_{\text{máx}} = -5,64633 + 0,159875 * T \quad (16)$$

El coeficiente de determinación ( $R^2$ ) indica que el modelo así ajustado explica 35,95% de la variabilidad en la velocidad máxima de crecimiento ( $\mu_{\text{máx}}$ ). El coeficiente de determinación ajustada ( $R^2$ ), que es más apropiada para comparar el modelo con un diferente número de variables independientes, es 29,54%.

Este efecto significativo de la temperatura demuestra la variación de los resultados obtenidos en la presente investigación; donde se observa que a temperatura de 37°C se alcanzó una  $\mu_{\text{máx}}$  promedio de 0,401 Log UFC/ml/hora, para 40 °C una  $\mu_{\text{máx}}$  promedio de 0,486 Log UFC/ml/hora y para 43°C  $\mu_{\text{máx}}$  promedio de 1,360 Log UFC/ml/hora.

Chervaux *et al.*, (2000) menciona que la velocidad máxima de crecimiento del *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* a 42°C de incubación, va desde 0.55 hasta 1

Log UFC/ml/hora, para nuestra investigación los tratamientos T2 y T7 reportaron valores de 0,707 y 0,593 Log UFC/ml/hora, este autor menciona que es debido a las características de crecimiento del *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*, e indicando que esta bacteria ácido láctica contiene diferentes fuentes de carbono, así mismo menciona que a concentraciones de lactosa por debajo de 0,4 % limitan el crecimiento del *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*, debido a que la lactosa es el medio en el cual el crecimiento es más rápido que en glucosa, manosa y fructosa. La velocidad de crecimiento obtenida por este autor, coincide con lo encontrado por Agudelo *et al.*, (2010), quien reportó 0,579 Log UFC/ml/hora en un medio de fermentación de vísceras de pescado con *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*, este valor es próximo a lo encontrado en el T7 en nuestra investigación, este mismo autor indica que en otras investigaciones se alcanza una  $\mu_{\text{máx}}$  de 1 Log UFC/ml/hora. Además menciona que esta  $\mu_{\text{máx}}$  es debido a la concentración de nutrientes donde la  $\mu_{\text{máx}}$  alcanza valores máximos fijados por la cinética intrínseca de las reacciones intracelulares, las cuales están relacionadas con la transcripción del ADN.

En los tratamientos T10, T11 y T12 se encontraron valores de 1,146 Log UFC/ml/hora, 1,615 Log UFC/ml/hora y 2,408 Log UFC/ml/hora, a estas altas velocidades máximas de crecimiento, Agudelo *et al.*, (2010), lo atribuye a que se debe a las óptimas condiciones de crecimiento y dependiendo de variables como la temperatura, pH y la concentración del sustrato. Sin embargo, este parámetro cinético se asocia a la teoría de simbiosis mencionada por Veringa, Galesloot y Davelaar (1968); Bottazi, Battistotti y Vescova (1971) citado por Tamime y Robinson (1991) y Gómez (1991) quienes sostienen que el crecimiento de *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*, es estimulada por la producción de ácido fórmico por el *Streptococcus salivarius subsp. termophilus* durante la incubación aumentando su velocidad de crecimiento, así mismo Tamime y Robinson

(1991), menciona que otros compuestos estimulantes del *Streptococcus salivarius subsp. termophilus* son el ácido pirúvico y el dióxido de carbono.

#### 4.1.2. *Streptococcus salivarius subsp. termophilus*

##### 4.1.2.1. Efecto de la temperatura, porcentaje de grasa y sólidos no grasos sobre el tiempo de adaptación ( $\lambda$ )

En el anexo 5, se presenta los resultados del tiempo de adaptación, determinada con los valores (M y B) mostrada en el anexo 4, obtenidos por la metodología de ajuste de las curvas de crecimiento mostradas en el anexo 6, con el modelo matemático de Gompertz modificado expresado por (Gibson et al., 1987).

En la tabla 6 se presenta el análisis de varianza (ANOVA) observándose que no existe una relación estadísticamente significativa ( $p \geq 0,05$ ) entre las variables independientes de temperatura, porcentaje de grasa y sólidos no grasos, con un nivel de confianza del 95,0 %. Con un coeficiente de determinación ( $R^2$ ) de 50,26% y con un coeficiente de determinación ajustada ( $R^2$ ), de 31,61%.

**Tabla 6.** Análisis de Varianza (ANOVA) para la regresión lineal múltiple sobre el tiempo de adaptación ( $\lambda$ ) *Streptococcus salivarius subsp. termophilus*.

F. de V.	gl	S.C.	C.M.	RAZÓN-F	VALOR-P	Significancia
Debido a la regresión	3	1,85151	0,61717	2,69	0,1166	n.s.
Error Residual	8	1,83206	0,229007			
Total	11	3,68357				

Chervaux *et al.*, (2000) sostiene que a pesar del interés industrial del *Streptococcus salivarius subsp. termophilus* se sabe poco sobre su fisiología y su genética.

En la presente investigación el tiempo de adaptación del *Streptococcus salivarius subsp. termophilus* no es influida significativamente por la temperatura, porcentaje de grasa y sólidos no grasos; como se observa en la tabla 8, el tiempo de adaptación para los tratamientos T2, T5, T10, T12 es 0,6 horas (36 min), en los tratamientos T7 y T8 es 0,9 horas (54 min), en los tratamientos T1, T3 y T4 es de 1,684 ; 1,229 y 1,4 horas y en el T9 es de 0,148 horas (8.88 min), por lo tanto podemos afirmar que los tiempos de adaptación no difieren por el efecto de temperatura, porcentaje de grasa y sólidos no grasos. Esta diferencia puede atenuarse a lo indicado por Aguilar (2008) quien menciona que el *Streptococcus salivarius subsp. termophilus* se desarrolla entre 37 y 40°C. Sin embargo Gómez (1999) sostiene que la temperatura óptima de crecimiento y desarrollo del *Streptococcus salivarius subsp. termophilus* está entre 40 y 45°C. No obstante Courtin *et al.*, (2002) evaluó el tiempo de adaptación del *Streptococcus salivarius subsp. termophilus* en leche descremada a 42°C, encontrando un tiempo de adaptación de 60 a 90 minutos.

El tiempo de adaptación corto se debe a lo mencionado por Gómez (1999) quien indica que el *Streptococcus salivarius subsp. termophilus* tiene un desarrollo más rápido al inicio de la fermentación.

#### **4.1.2.2. Efecto de la temperatura, porcentaje de grasa y sólidos no grasos sobre el tiempo de generación ( $T_g$ )**

En el anexo 5, se presenta los resultados del tiempo de generación ( $T_g$ ), determinada con los valores (B y C) mostrada en el anexo 4, obtenidos por la metodología de ajuste de las curvas de crecimiento mostradas en el anexo 6, con el modelo matemático de Gompertz modificado (Gibson *et al.*, 1987).

**Tabla 7.** Análisis de Varianza (ANOVA) para la regresión lineal múltiple sobre el tiempo de generación (Tg) del *Streptococcus salivarius subsp. termophilus*.

F. de V.	gl	S.C.	C.M.	RAZÓN-F	VALOR-P	Significancia
Debido a la regresión	3	2,2552	0,751734	2,60	0,1244	n.s.
Error Residual	8	2,31237	0,289046			
Total	11	4,56757				

En la tabla 7 se muestra el análisis de varianza (ANOVA) observándose que no existe una relación estadísticamente significativa ( $p \geq 0,05$ ) entre las variables independientes de temperatura, porcentaje de grasa y sólidos no grasos, con un nivel de confianza del 95,0 %. Con un coeficiente de determinación ( $R^2$ ) de 49,37% y un coeficiente de determinación ajustada ( $R^2$ ), de 30,39%.

El tiempo de generación del *Streptococcus salivarius subsp. termophilus* en el tratamiento T1 fue de 1,354 horas, mientras que para los tratamientos T2, T5, T8, fue de 0,3 horas (18 min), para los tratamientos T6 y T7 fue de 0,5 (30 min) horas, para los tratamientos T4 y T9 fue de 0,4 (24min) horas, para los tratamientos T11 y T12 fue de 0,1 horas (6 min), este tiempo de generación corto posiblemente indicaría las condiciones óptimas de crecimiento. Para el T3 fue de 2,398 horas. Esta variación de valores se debe a que la temperatura, el porcentaje de grasa y sólidos no grasos no influyen en el tiempo de generación. La diferencia de los valores de este parámetro podemos atribuirlos a lo mencionado por Yousef y Carlstrom (2006), quienes indican que durante la fase exponencial, el tiempo de generación alcanza valores bajos debido a que la velocidad máxima de crecimiento alcanza valores elevados. Debido a la escasa información sobre esta para este microorganismo nos permite mencionar que el tiempo de generación este

probablemente asociado con las inherentes propiedades fisiológicas del *Streptococcus salivarius subsp. termophilus* y el factor ambiental como la velocidad de aireación, como lo indica (Yousef y Carlstrom, 2006).

#### 4.1.2.3. Efecto de la temperatura, porcentaje de grasa y sólidos no grasos sobre la velocidad máxima de crecimiento ( $\mu_{\text{máx}}$ )

En el anexo 5, se presenta los resultados la velocidad máxima de crecimiento ( $\mu_{\text{máx}}$ ), determinada con los valores (B y C) mostrada en el anexo 4, obtenidos por la metodología de ajuste de las curvas de crecimiento mostradas en el anexo 6, con el modelo matemático de Gompertz modificado expresado por (Gibson *et al.*, 1987).

**Tabla 83.** Análisis de Varianza (ANOVA) para la regresión lineal múltiple sobre la velocidad máxima de crecimiento ( $\mu_{\text{máx}}$ ) del *Streptococcus salivarius subsp. termophilus*.

F. de V.	gl	S.C.	C.M.	RAZÓN-F	VALOR-P	Significancia
Debido a la regresión	3	3,46392	1,15464	3,49	0,0698	n.s.
Error Residual	8	2,64445	0,330557			
Total	11	6,10838				

En la tabla 8 se muestra el análisis de varianza (ANOVA) observándose que no existe una relación estadísticamente significativa ( $p \geq 0,05$ ) entre las variables independientes de temperatura, porcentaje de grasa y sólidos no grasos, con un nivel de confianza del 95,0%. Con un coeficiente de determinación ( $R^2$ ) de 56,71% y un coeficiente de determinación ajustada ( $R^2$ ), de 40,47%.

La velocidad máxima de crecimiento en la presente investigación no refleja diferencias estadísticas entre los tratamientos, a pesar de la diferencia de los valores de la

velocidad máxima de crecimiento en cada tratamiento, es así que los tratamientos T1 y T3 reportaron una  $\mu_{\text{máx}}$  de 0,222 y 0,126 Log UFC/ml/hora, los tratamientos T2, T3, T4, T5, T6, T7, T8, T9 y T10 reportaron una  $\mu_{\text{máx}}$  entre 0,5 a 0,9 Log UFC/ml/hora, mientras que los tratamientos T11 y T12 una  $\mu_{\text{máx}}$  de 2,284 y 2,568 Log UFC/ml/hora, estos dos valores están muy relacionados con el tiempo de generación que son cortos y podemos afirmar que en las condiciones del T11 y T12, el crecimiento del *Streptococcus salivarius subsp. termophilus* es óptimo.

Gómez (1999) sostiene que la velocidad máxima de crecimiento del *Streptococcus salivarius subsp. termophilus* a inicios de la fermentación es mayor que la del *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*, esto posiblemente se deba a lo afirmado por Courtin *et al.*, (2002) quien indica que la disposición de nutrientes suministrados por el medio estimulan el crecimiento rápido del *Streptococcus salivarius subsp. termophilus*. Este mismo autor investigó el crecimiento del *Streptococcus salivarius subsp. termophilus* en leche descremada incubada a 42°C, y en caldo M17, llegando a obtener una  $\mu_{\text{máx}}$  de 0,85 a 0,89 Log UFC/ml/hora, en la presente investigación se observó este mismo valor en el tratamiento T7 ( $\mu_{\text{máx}} = 0,892$  Log UFC/ml/hora).

El crecimiento del *Streptococcus salivarius subsp. termophilus* está asociado al efecto de simbiosis como lo menciona Gómez (1999) y Bautista, Dahiya y Speck (1966) citado por Tamime y Robinson (1991) afirmando que el *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* estimula el crecimiento del *Streptococcus salivarius subsp. termophilus* liberando aminoácidos esenciales como la valina, histidina y glicina de la caseína.

Tamime y Robinson (1991) mencionan que otro factor atribuido al crecimiento del *Streptococcus salivarius subsp. termophilus* es la variación de la composición química de la leche durante el año, sosteniendo que la leche puede ser deficitaria en algunos

aminoácidos, por lo que Pettey y Lokelma (1950) citado por Tamime y Robinson (1991) sugieren que durante la primavera el *Streptococcus salivarius subsp. termophilus* requiere aminoácidos como: leucina, lisina, cisteína, ácido aspártico, histidina y valina, mientras que durante el otoño e invierno los aminoácidos requeridos son: glicina, isoleucina, tirosina, ácido glutámico y metionina, además de los mencionados anteriormente. Entonces podemos afirmar que el nivel de proteína de la leche probablemente influya en el crecimiento del *Streptococcus salivarius subsp. termophilus*.

#### **4.2. DETERMINACIÓN DE LA TEMPERATURA, PORCENTAJE DE GRASA Y SÓLIDOS NO GRASOS QUE PRESENTAN MEJORES VALORES FÍSICOQUÍMICOS EN EL PROCESO DE INCUBACIÓN DE LAS BACTERIAS ACIDOLÁCTICAS**

##### **4.2.1. DETERMINACIÓN DE pH**

Como se observa en la Figura 3, el proceso de fermentación de la leche durante la incubación, comprendida entre las 0 a 360 minutos; se produce un descenso del pH en los 12 tratamientos a temperaturas de 37°C, 40°C y 43°C, con porcentajes de 1 y 3% de grasa y 8 y 9% de sólidos no grasos; resultados mostrados en el Anexo 7.

El pH normal de la leche para los diferentes tratamientos fue de 6,6, valor que también indica Amiot (1991). Este valor ha descendido como lo menciona Gómez (1999) y Díaz *et al.*, (2004) indicando que el pH desciende por acción de la fermentación microbiana de la lactosa, por las bacterias acidolácticas (*Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* y *Streptococcus salivarius subsp. termophilus*).

El descenso del pH de la leche, desestabilizó las micelas de caseína suspendidas en la fase acuosa de la leche, Belaunzarán (2010) explica que la leche a pH 6,6 tiene una

molécula de proteína con carga neta negativa y estas permanecen separadas debido a que poseen la misma carga y se repelen entre sí, si se añaden iones hidrogeno, estos son absorbidos por las moléculas de proteínas, a cierto pH la carga neta de la proteínas es cero, donde las moléculas ya no se repelen entre sí, produciéndose la desestabilización de las mismas. A este pH se le conoce como punto isoeléctrico de la proteína.

El análisis de varianza mostrado en la Tabla 11 muestra que ninguno de los factores e interacciones tiene un efecto estadísticamente significativo ( $p > 0,05$ ) sobre el pH con un 95,0% de nivel de confianza. Es decir que no existe efecto alguno sobre las unidades experimentales, concluyendo que no existe influencia de la temperatura, porcentaje de grasa y sólidos no grasos en el desarrollo del pH, para los 12 tratamientos durante el proceso de fermentación.

**Tabla 9.** Análisis de varianza (ANOVA) para la variación de pH.

F. de V.	gl	SC	CM	Fc	Significancia
A:Temperatura	2	0,0783167	0,0391583	1,14	n.s.
B: Grasa	1	0,081225	0,081225	2,36	n.s.
C:Sólidos no Grasos	1	0,00173611	0,00173611	0,05	n.s.
INTERACCIONES					
AB	2	0,0508167	0,0254083	0,74	n.s.
AC	2	0,0388722	0,0194361	0,56	n.s.
BC	1	0,00513611	0,00513611	0,15	n.s.
ABC	2	0,0977722	0,0488861	1,42	n.s.
Error Exp.	24	0,8264	0,0344333		
TOTAL	35	1,18027			

Por lo que se podría decir que le leche aunque sea incubado a temperaturas de 37, 40 y 43°C con 1 y 3% de grasa, con 8 y 9% de sólidos no grasos, el comportamiento del pH a lo largo de la fermentación no será diferente en cada tratamiento. Para lo cual Spreer (1991) y Díaz *et al.*, (2004) indican que las bacterias ácidolácticas tienen la cantidad

necesaria de sustrato para su crecimiento y formación de ácido láctico, lo que ocasionó una disminución del pH.

Los valores de pH obtenidos en los 12 tratamientos están entre 4,5 y 4,8, estos valores se encuentran dentro del límite citado por Meyer y Marcos (1982) y Méndez (2000), que afirman que el pH de un yogurt debe ser de 3,7 a 4,5 y de 4 a 4,5; momento en el cual se produce el acetaldehído, sustancia que le confiere al yogurt su sabor característico.

Hernández (2004) evaluó un yogurt con 1 y 3% de grasa obteniendo resultados de pH de 4,3 a 4,8 para 1% de grasa y 4,3 a 4,5 para 3% de grasa, indicando que el yogurt con 1% de grasa presentó mayores valores de pH. Así mismo Hardi y Slacanac (2000) mencionan que la disminución de pH en productos lácteos fermentados es influida por la proporción de grasa de la leche y el cultivo iniciador. Por tanto los valores de pH de 4,5 a 4,8, obtenidos en la presente investigación coinciden con los resultados reportados por Hernández (2004).

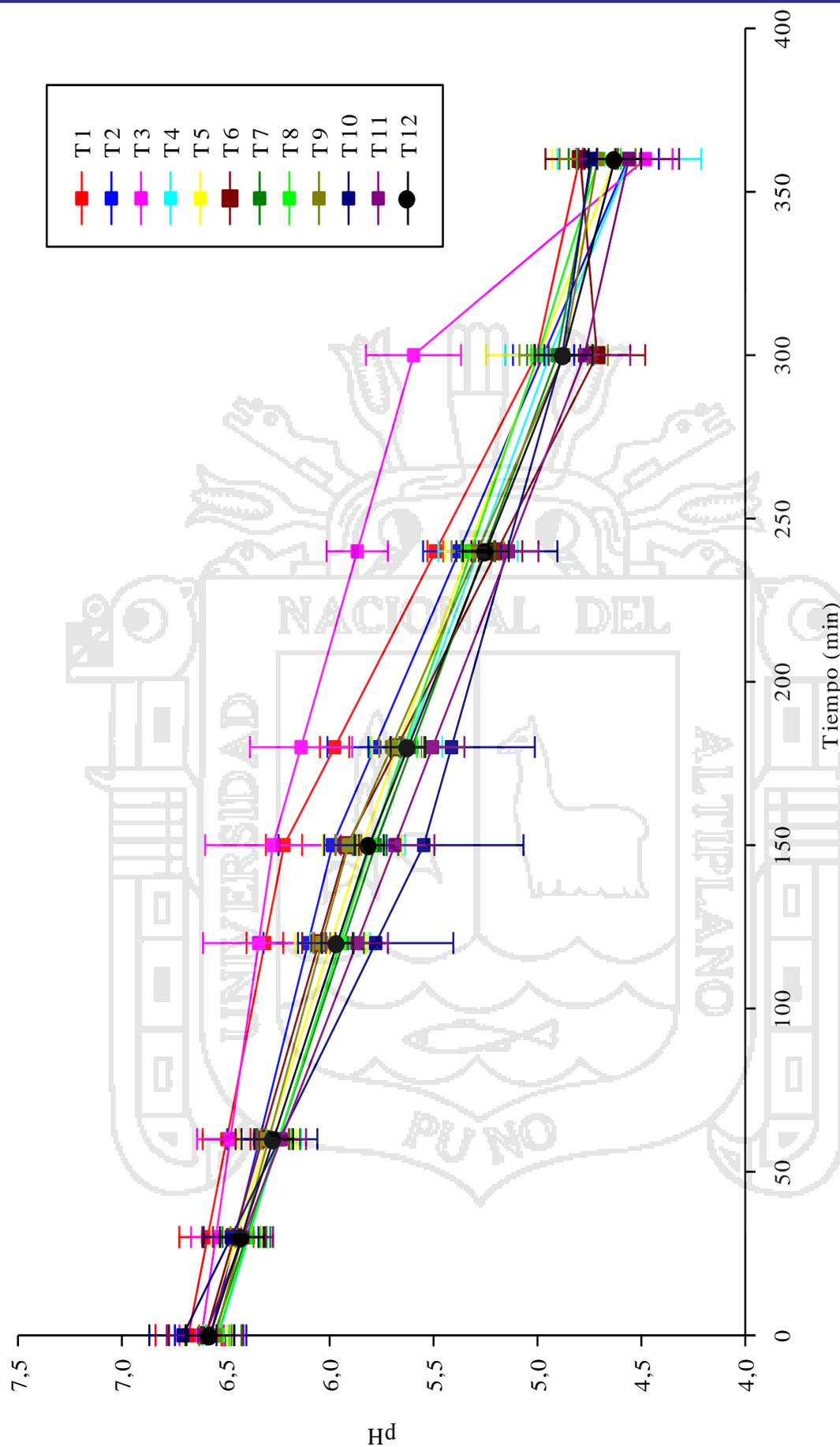


Figura 3. Descenso del pH para los 12 tratamientos

#### 4.2.2. DETERMINACIÓN DE ACIDEZ

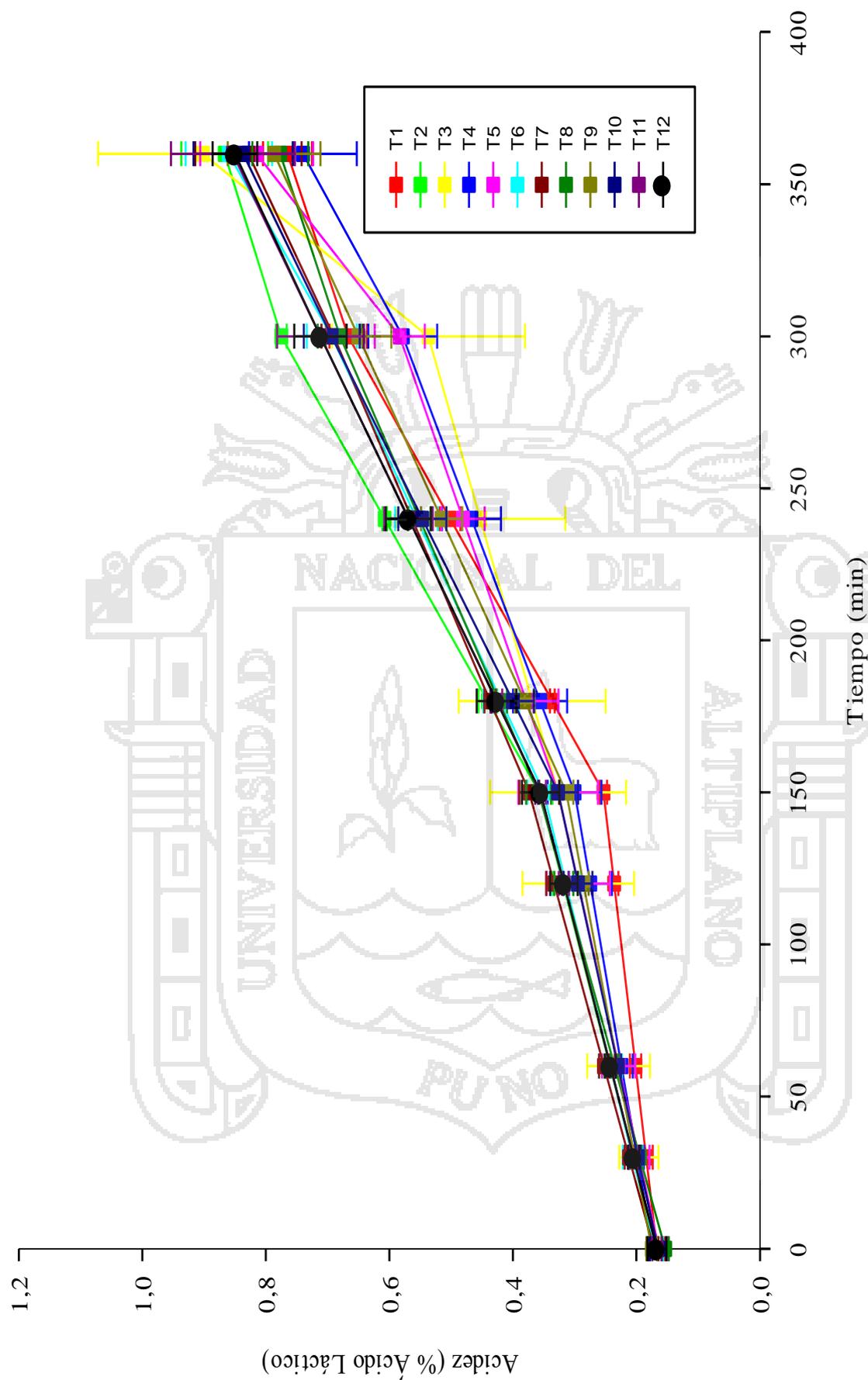
En la figura 4, se muestra la variación de la acidez expresado en % de ácido láctico, durante el proceso de fermentación desde las 0 a 6 horas (360 minutos). Los resultados para los diferentes tratamientos se muestran en el anexo 8.

La acidez desarrollada en los 12 tratamientos aumenta de forma exponencial, a este efecto Alcázar (1999) y Díaz *et al.*, (2004) mencionan que el incremento se debe a la acción del *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* y *Streptococcus salivarius subsp. termophilus* sobre la lactosa. Los 12 tratamientos estudiados reportaron valores entre 0,7 a 0,9. Esto valores se encuentran dentro de lo indicado por Puhan (1986) que es 0,8 a 1,8.

El porcentaje de ácido láctico alcanzado en estos tratamientos probablemente se deba a lo mencionado por Gómez (1999) indicando que el desarrollo rápido del *Streptococcus salivarius subsp. termophilus* al inicio de la fermentación, hace que se inicie la producción de ácido láctico, pero luego el *Streptococcus salivarius subsp. termophilus* es inhibido por efecto del ácido láctico y la producción de ácido láctico es continuada por el *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*.

**Tabla 40.** Análisis de varianza (ANOVA) para la variación de acidez.

F. de V.	GL	SC	CM	Fc	Significancia
A:Temperatura	2	0,00110556	0,000552778	0,07	n.s.
B:Solidos Grasos	1	0,0001	0,0001	0,01	n.s.
C:Solidos no Grasos	1	0,000177778	0,000177778	0,02	n.s.
INTERACCIONES					
AB	2	0,00845	0,004225	0,56	n.s.
AC	2	0,00453889	0,00226944	0,30	n.s.
BC	1	0,0427111	0,0427111	5,71	*
ABC	2	0,0184389	0,00921944	1,23	n.s.
Error Exp.	24	0,179533	0,00748056		
TOTAL	35	0,255056			



**Figura 4.** Desarrollo de la acidez (% ácido láctico) para los 12 tratamientos

Mediante el Análisis de varianza mostrado en la tabla 12, realizado para los 12 tratamientos, se estableció que existen diferencias significativas de la interacción de Grasa-Solidos no Grasos sobre el porcentaje de ácido láctico con un 95,0% de nivel de confianza, cuando el valor ( $p < 0,05$ ).

El efecto significativo del porcentaje de grasa y solidos no grasos es sustentada por lo mencionado por Acevedo *et al.*, (2010) quien evaluó el desarrollo de acidez a 10.6% de solidos totales y a temperatura de 37°C en suero con BAL, concluyendo que los sólidos totales disminuyen la velocidad de acidificación, mientras que la temperatura afecta significativamente la viabilidad de las BAL, puesto que en vuestra investigación la temperatura no influye en el desarrollo de la acidez, mas sí el porcentaje de grasa y solidos no grasos que forman los sólidos totales. No obstante Hernández (2004) menciona que la leche para yogur con 1% de grasa y 1 g de linaza, incubada a 42°C mostró valores de 0,5 a 1,2% de ácido láctico, atribuyendo los valores menores de acidez al efecto amortiguador del calcio sobre las BAL, también indica que el calcio se asocia con las micelas de caseína y provoca que las BAL produzcan una acidez muy baja. Concluyendo que a menor porcentaje de grasa, se desarrolló una mayor acidez.

Así mismo Accolas (1977) citado por Beal *et al.*, (1999) encontró que la acidez titulable era más alta en yogures que eran fermentados entre 43 y 45°C, comparados con los que se fermentaban a 35 y 38°C. Sin embargo Cho-Ah-Ying *et al.*, (1990), observaron que la temperatura de incubación (38 y 43°C) no afecta la acidez. Estas observaciones diferentes pueden atribuirse a los comportamientos específicos de los microorganismos usados y a la temperatura de fermentación.

Por otro lado, Jenness y Patton, (1959) citado por Valdez *et al.*, (2005) indican que el incremento del contenido de lactosa, a través de la adición de LPD (leche en polvo

descremada) se ve acompañado de un aumento de la acidez de la leche, lo cual puede conducir a una disminución del tiempo de coagulación. Esta misma teoría ha sido mantenida por Humphreys y Plunkett (1969), Haverbeck y Jofre (1980), Tamime y Deeth (1980), Puhan (1986) y Tamime *et al.*, (1984) citado por Valdez *et al.*, (2005), quienes mencionan que al aumentar el nivel de sólidos totales se afecta la acidez titulable, debido a que aumenta el contenido de lactosa en la mezcla y el poder tampón (buffer) de las proteínas, fosfatos, citratos, lactatos y otros componentes de la leche.



## V. CONCLUSIONES

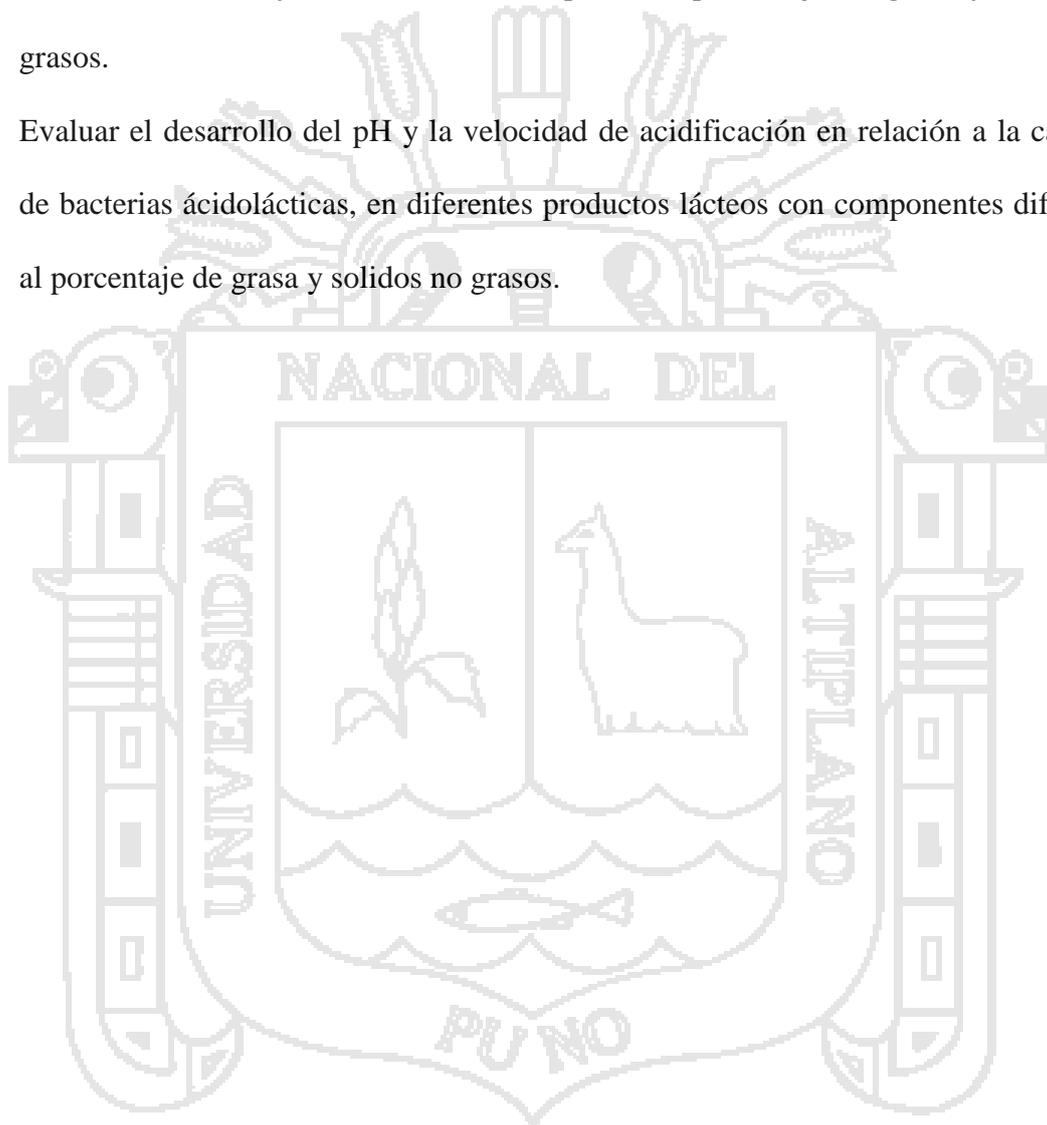
Se llegó a las siguientes conclusiones:

1. Los parámetros cinéticos de crecimiento del *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* que fueron influidos por la temperatura son el tiempo de adaptación ( $\lambda$ ) y la velocidad máxima de crecimiento ( $\mu_{\text{máx}}$ ), sin embargo; la temperatura, porcentaje de grasa y sólidos no grasos no mostraron efecto alguno sobre el tiempo de generación ( $T_g$ ).  
Los parámetros cinéticos de crecimiento del *Streptococcus salivarius subsp. termophilus* no fueron influidos por la temperatura, porcentaje de grasa y sólidos no grasos.
2. Los valores de pH obtenidos no fueron influidos por la temperatura, porcentaje de grasa y sólidos no grasos. En tanto el desarrollo de acidez (% ácido láctico), nos permite aseverar que tanto el porcentaje de grasa y los sólidos no grasos influyen en el desarrollo de la acidez, presentando mayor y mejor valor el tratamiento con 3% de grasa y 8 % de solidos no grasos.

## VI. RECOMENDACIONES

Se recomienda lo siguiente:

1. Realizar estudios de otras bacterias ácidolácticas que se encuentran en diferentes productos lácteos, utilizando otras técnicas para el conteo de colonias, teniendo en cuenta factores muy diferentes a la temperatura, porcentaje de grasa y sólidos no grasos.
2. Evaluar el desarrollo del pH y la velocidad de acidificación en relación a la cantidad de bacterias ácidolácticas, en diferentes productos lácteos con componentes diferentes al porcentaje de grasa y sólidos no grasos.



## VII. BIBLIOGRAFÍA

- Acevedo, D.; Rodríguez, A. y Fernández, A. (2010). Efecto de las variables de proceso sobre la cinética de acidificación, la viabilidad y la sinéresis del suero costeño colombiano. *Información tecnológica*. Vol. 21, N° 2: 29 – 36.
- Agatangelo, D.S.E. (2007). Estudio del Comportamiento Cinético de Microorganismos de Interés en Seguridad Alimentaria con Modelos Matemáticos. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona. España.
- Agudelo, C.; Ortega, R. y J. L. Hoyos (2010). Determinación de parámetros cinéticos de dos inóculos lácticos: *Lactobacillus plantarum* A6 y bacterias ácido lácticas del yogur. Vol. 8, N° 2. 8-16.
- Aguilar, M. M. (2008). Viabilidad y propiedades fisicoquímicas de leche fermentada probiótica. Tesis de grado para optar el título de maestría en ciencia de alimentos. Universidad de las Américas. Puebla, México.
- Alcázar, J., (2002). *Diccionario Técnico de Industrias Alimentarias*. Impreso en Cusco Perú.
- Alcázar, J., (2002). *Manual de Industrias Alimentarias*. Impreso en Cusco Perú.
- Amiot, J., (1991). *Ciencia y Tecnología de la leche*. Editorial Acribia. Zaragoza España.
- Baranyi, J.; Pin, C.; Ross, T. (1999). Validating and comparing predictive models. *International Journal of Food Microbiology* 48: 159 – 166.
- Baranyi, J.; Roberts, T. A. (1994). A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. *International Journal of Food Microbiology* 23: 277 – 294.

- Beal, C.; Skokanova, J.; Latrille, E.; Martin, N. y Corriev, G. (1999). Combined effects of culture conditions and storage time on acidification and viscosity of stirred yogurt. *Journal Dairy Science*. Vol.82, N° 4: 673 – 681.
- Belaunzarán, M. J. (2010). Desarrollo y caracterización de yogurt firme elaborado con leche ovina. Tesis para optar la licenciatura en tecnología de los alimentos. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional del Centro. Buenos Aires, Tandil.
- Buchanan, R. L.; Cygnarowicz, M. L. (1990). A mathematical approach toward defining and calculating the duration of the lag phase. *Food Microbiology* 7: 237 – 240.
- Buchanan, R. L.; Klawitter, L. A. (1991). Effect of temperature history on the growth of *Listeria monocytogenes* Scott A at refrigeration temperatures. *International Journal of Food Microbiology* 12:235 – 246.
- Bylund, G. (2003). Manual de industrias Lácteas. Editorial Madrid. España.
- Cabeza, H. E. A. (2009). DMFit wed edition. Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias Básicas, Universidad de Pamplona. Campus Universitario, Km. 1, vía a Bucaramanga. Pamplona, Colombia.
- Cabeza, H. E. A. (2013). Desarrollo de un modelo matemático para evaluar el efecto de la temperatura sobre el crecimiento de *s. aureus* en caldo BHI. *Fundamentos de Microbiología Predictiva: aplicaciones teóricas y prácticas*. FMP V. 01. Pp. 1-18. Universidad de Pamplona-Colombia.
- Cabeza, H. E. A. (2013). El Modelo Modificado de Gompertz, Logístico y Modificado Logístico para el ajuste de datos de crecimiento microbiano. Universidad de Pamplona. Colombia: 2-13.

- Carr, F. J.; Chill, D.; Maida, N. (2002). The lactic acid bacteria: A literature survey. *Critical Reviews in Microbiology*. 28(4):281-370.
- Castro, G.; Valbuena, E.; Sánchez, E.; Briñez, W.; Vera, H.; Leal, M. (2008). Comparación de modelos sigmoidales aplicados al crecimiento de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *Revista Científica FCV-LUZ*. XVIII: pp. 582-588.
- Cayré, M. E.; Vignolo, G.; Garro, O. (2004). Modelo dinámico para el crecimiento de bacterias lácticas sobre emulsiones cárnicas. Universidad Nacional del Nordeste. Tucuman, Argentina.
- Cayré, M.E.; Vignolo, G.M.; Garro, O.A. (2007). Selección de un modelo primario para describir la curva de crecimiento de bacterias lácticas y *Brochetrix thermosphacta* sobre emulsiones cárnicas cocidas. *Información Tecnológica* 18(3): 23-29.
- Cho-Ah-Ying, F.; Duitschaever, C. L. y Buteau, C. (1990). Influence of temperature of incubation on the physico-chemical and sensory quality of yoghurt. *Cultures Dairy Prod. Journal*.8: 11 - 14.
- CODEX STAN 243-2003. (2010). Leche y Productos Lácteos – Norma del Codex para Leches Fermentadas. 2ª Edición. Roma-Italia.
- Coloma, A. (2009). *Métodos de Análisis Agroindustrial: Manual de prácticas de laboratorio*. Universidad Nacional del Altiplano. Puno – Perú.
- Courtin, P.; Monet, V. y Rul F. (2002). Cell – wall proteinases PrtS and PrtB have a different role in *Streptococcus thermophilus*/*Lactobacillus bulgaricus* mixed cultures in milk. *Microbiology*, 148; 3413 – 3421. Great Britain.

- Courtin, V.; Monet, V.; Rul, F. (2002). Cell-wall Proteinases PrtS and PrtB have a different role in *Streptococcus thermophilus*/*Lactobacillus bulgaricus* mixed cultures milk. *Microbiology* 148, 3413-3421.
- Delignette-Muller, M. L. (1998). Relation between the generation time and the lag time of bacterial growth kinetics. *International Journal of Food Microbiology* 43: 97 – 104.
- Diaz, J.; Sosa, M. E.; Vélez, J. F. (2004). Efecto de la adición de fibra y disminución de grasa en las propiedades fisicoquímicas del yogur. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. Vol. 3. 287 – 305.
- DMFit. (2009). Software de modelamiento dinámico edición on-line. Disponible en: <http://ifrsvwwwdev.ifrn.bbsrc.ac.uk/CombasePMP/GP/DMFit.aspx>.
- Espinoza, M. y Zapata, C. (2010). Estudio de yogur. Evaluación de calidad e información nutricional. Odecu. Chile.
- Fennema, O. R. (2000). *Química de los alimentos*. 2ª edición. Editorial Acribia. Zaragoza (España).
- García, M. Revah, S.; Gómez, L. (1998). Productos lácteos. En *Biología Alimentaria*, Limusa Noriega Editores. García Garibay M. Quintero Ramírez Rodolfo, Agustín López-Munguía Canales. Compiladores. Pp. 163 - 178. México D.F.
- Geeraerd, A. H.; Valdramidis, V. P.; Devlieghere, F.; Bernaert, H.; Debevere, J.; Van Impe, J. F (2004). Development of a novel approach for secondary modelling in predictive microbiology: incorporation of microbiological knowledge in black box polynomial modelling. *International Journal of Food Microbiology* 91:229 – 244.

- Gibson, A. M.; Bratchell, N.; Roberts, A. (1988). Predicting microbial growth: growth responses of salmonellae in laboratory medium as affected by pH, sodium chloride and storage temperature. *International Journal of Food Microbiology* 6:155 –178.
- Gibson, A.M.; Bratchell, N.; Roberts, T.A. (1987). The effect of sodium chloride and temperature on rate and extent of growth of *Clostridium botulinum* type A in pasteurized pork slurry. *J. Appl. Bacteriol.* 62: 479-490.
- Gómez, J. C., (1999). Tesis. Métodos de Control de Acidez en el yogur. DIA. Universidad Autónoma de Chapingo. México.
- González, A. J. I.; Romero, C.; Jiménez, S. (1994) Control de la Calidad en la Fabricación del Yogur. *Alimentación, equipos y tecnología* 13 (6):77-81.
- Hardi, J., y Slacanac, V. (2000). Examination of coagulation kinetics and rheological properties of fermented milk products: the influence of starter culture, milk fat content and addition of inulin. *Mijekarstvo.* 50(3): 217 – 226.
- Hernández, P. (2004). Evaluación de las propiedades fisicoquímicas y reológicas del yogurt, bajo en grasa enriquecido con fibra y calcio. Tesis profesional para optar el título de Maestría en Ciencia de Alimentos. Universidad de las Américas. Puebla, México.
- INDECOPI, NTP 202.001, (2003). Leche y productos lácteos. Leche cruda. Requisitos. 4ª edición. Lima-Perú.
- López, Malo A. (2000). Manual de prácticas de análisis de los alimentos. Universidad de las Américas, Puebla, México, inédito.

- Ludeña, U.; Chirinos, G., (2000). Guía de elaboración de productos lácteos, Universidad Agraria la Molina. Lima – Perú.
- Luquet, F. (1991) Leche y productos lácteos. Editorial Acribia S.A. España.
- Madigan, M. T.; Martinko, J. M.; Parker, J. (1997). Brock Biology of Microorganisms. Ed. Prentice Hall International, Inc. pp. 149 – 177.
- Madigan, M. T.; Martinko, J. M.; Parker, J. (1999). Brock Biología de los Microorganismos. Ed. Prentice Hall Iberia. 8ª Ed. Revisada, Inc. pp. 149 – 177.
- Madrid, V. A. (1999). Tecnología Quesera. 2ª edición. Ediciones Mundi Prensa. Madrid España.
- Madrid, V. A.; Madrid C. J. (2001). Nuevo Manual de Industrias Alimentarias. 3ª Edición. Ediciones Mundi Prensa. Madrid España.
- McMeekin, T. A.; Ross, T. (2002). Predictive microbiology: providing a knowledge-based framework for change management. International Journal of Food Microbiology 78: 133 – 153.
- McMeekin, T.A.; J.N. Olley; T. Ross y D.A. Ratkowsky (1993) Predictive Microbiology: Theory and Application, 61-70. Research Studies Press Ltd., Tounton, Inglaterra.
- Méndez, D. J. (2000). Yogurt. Instituto de Productos Lácteos. Universidad de Santiago de Compostela. España.
- Meyer, I.; Marcos, R. (1982). Control de calidad de los Productos Agropecuarios. 2ª edición. Editorial trillas. España.

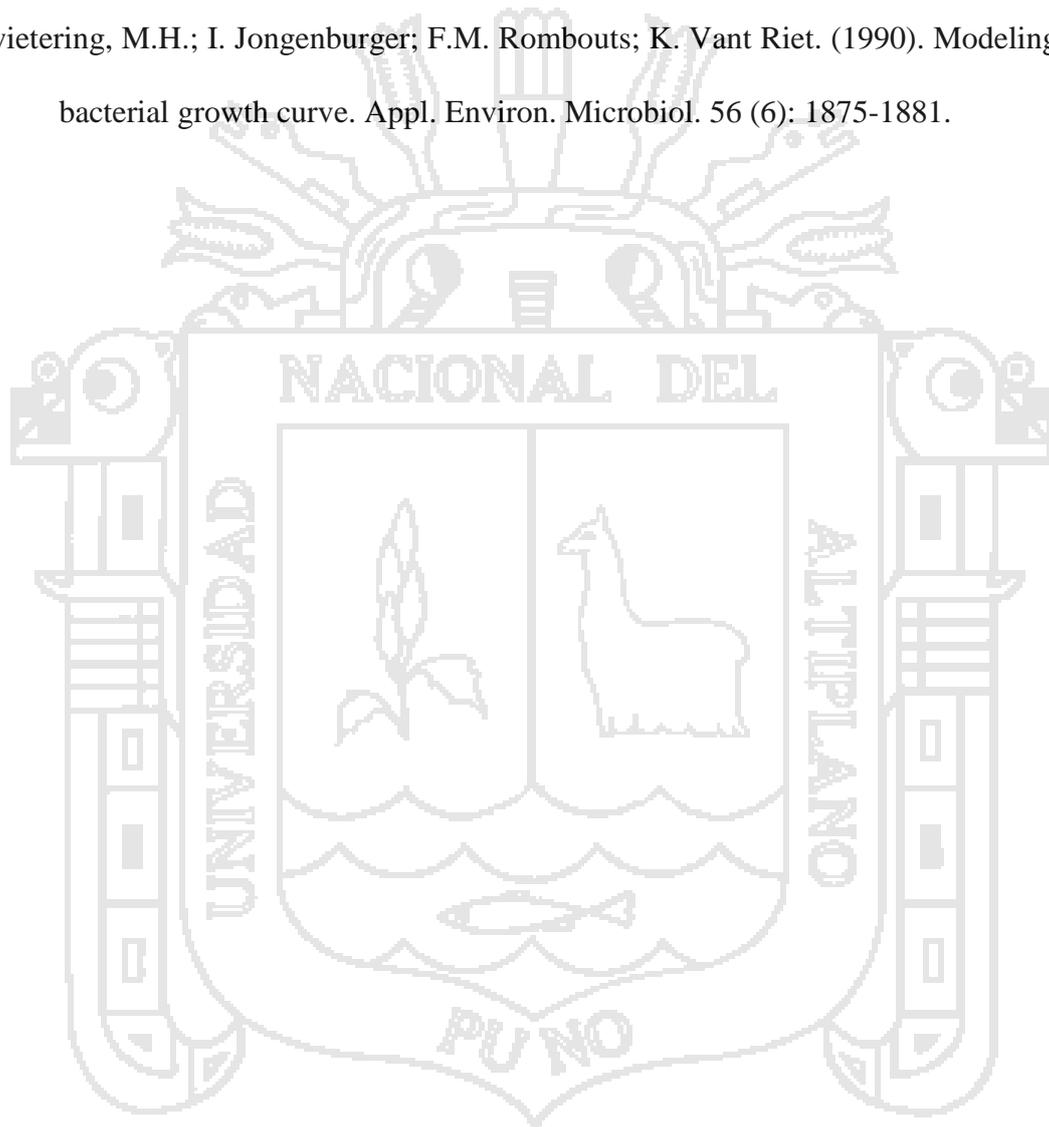
- Monod, J. (1949). The growth of bacterial cultures. *Annual Review of Microbiology* 3: 371 – 394.
- Montiel, L.; Delgado, C. H.; Gonzales, D. J.; Montiel, R. G., (2010). Viabilidad de cepas probióticas en leche fermentada almacenada en refrigeración. XII Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos. LA 81-LA89.
- Montville, T. J. (2000). Principios que influyen en el crecimiento, la supervivencia y la muerte microbiana en los alimentos. In: Doyle, M. P.; Beuchat, L.R.; and Montville, T. J. (2000). *Microbiología de los Alimentos. Fundamentos and Fronteras*. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza (España).13 – 30.
- Prescott, L. M.; Harley, J. P.; Klein, D. A. (1999). *Microbiología*. 4ª Edición., McGraw-Hill. Interamericana. 114 – 136.
- Puhan, Z. (1986). Introduction In: *Fermented Milk/Science and Technology-Ch. I. Bulletin IDF 227/1988*.
- Radke, L. (1986). Influence of temperature on associative growth of *S. thermophilus* and *L. bulgaricus*. *Journal of Dairy Science*. Vol. 69, No. 10, 1986.
- Rasch, M. (2004). Experimental design and data collection. In: R. C. McKellar and X. Lu (Ed.). *Modelling microbial responses in food. CRC Series in Contemporary Food Science*. CRC Press. 1 – 14.
- Ray, B.; Bhunia, A. (2010). *Fundamentos de Microbiología de los Alimentos*. 4ª Edición., Ed. McGraw-Hill. Interamericana. 33 – 44.

- Robinson, T. P.; Ocio, M. J.; Kaloti, A.; Mackey, B. M. (1998). The effect of growth environment on the lag phase of *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology* 44: 83 – 92.
- Sánchez, M. A., (1992). Tesis. Evaluación de diferentes *Lactobacillus* en la elaboración de un producto tipo yoghurt. FESC. UNAM. México, D.F.
- Skriver, M. J., (1997) Caracterización de la textura del yogurt elaborado con diferentes concentraciones de cultivo Vicenza: IDF Simposio.
- Spreer, E. (1991). *Lactología Industrial*. Editorial Acribia. Zaragoza España.
- Stanier, R. Y.; Ingraham, J. L.; Wheelis, M. L.; Painter, P. R. (1989). *Microbiología*. 2ª Edición. Editorial Reverté. pp. 195 – 209.
- Swinnen, I. A. M.; Bernaerts, K.; Dens, E. J. J.; Geeraerd, A. H.; Van Impe, J. F. (2004). Predictive modelling on the microbial lag phase: a review. *International Journal of Food Microbiology* 94: 137 – 159.
- Tamime, A. y Robinson, R. (1991). *Yogurt Ciencia y Tecnología*. Editorial Acribia, Zaragoza – España.
- Valdes, A. J.; Ludeña, U. F. y Idrogo, G. (2005). Efecto del tiempo de almacenamiento de la leche cruda y la adición de cloruro de calcio en la viscosidad del yogurt batido. *Editorial Agraria. Anales científicos*. Vol. 61. 151 – 172. Lima, Perú.
- Vázquez, S.M.; Suárez, H.; Zapata, S. (2009). Utilización de sustancias antimicrobianas producidas por bacterias ácido lácticas en la conservación de la carne. *Revista Chilena de Nutrición*. 36(1):64-71.
- Weisseyre, R. (1980). *Lactología técnica*. Editorial Acribia. Zaragoza, España.

Villegas, A.; Santos, A. (2009). Manual Básico Para Elaborar productos Lácteos. Editorial Trillas S.A. México.

Yousef, A. E.; Carlstrom C., (2006). Microbiología de los alimentos, manual de laboratorio. Editorial Acribia. Zaragoza, España.

Zwietering, M.H.; I. Jongenburger; F.M. Rombouts; K. Vant Riet. (1990). Modeling of the bacterial growth curve. Appl. Environ. Microbiol. 56 (6): 1875-1881.





**ANEXO 1.** Parámetros ajustados por el Modelo de Gompertz modificado para *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*.

TRATAMIENTO	A		B		C		M horas	R <sup>2</sup>
	Log UFC/ml	Log UFC/ml/hora	Log UFC/ml	Log UFC/ml/hora	Log UFC/ml	Log UFC/ml/hora		
T 1 (37°C, 1%SG, 8%SNG)	4,744	1,326	0,556	2,228	0,998			
T 2 (37°C, 1%SG, 9%SNG)	4,452	0,829	2,317	2,199	0,997			
T 3 (37°C, 3%SG, 8%SNG)	2,334	0,349	2,309	3,759	0,993			
T 4 (37°C, 3%SG, 9%SNG)	3,855	0,749	1,187	2,425	0,997			
T 5 (40°C, 1%SG, 8%SNG)	6,125	0,916	0,301	2,099	0,996			
T 6 (40°C, 1%SG, 9%SNG)	4,482	0,516	1,875	2,422	0,994			
T 7 (40°C, 3%SG, 8%SNG)	4,449	1,300	1,241	1,746	0,999			
T 8 (40°C, 3%SG, 9%SNG)	2,735	0,976	2,483	2,011	0,999			
T 9 (43°C, 1%SG, 8%SNG)	4,740	0,607	1,207	1,964	0,997			
T 10 (43°C, 1%SG, 9%SNG)	4,470	0,961	3,241	0,990	0,989			
T 11 (43°C, 3%SG, 8%SNG)	2,293	0,681	6,449	1,147	0,990			
T 12 (43°C, 3%SG, 9%SNG)	3,444	1,281	5,108	1,338	0,998			

**ANEXO 2.** Parámetros de crecimiento cinético del *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*.

TRATAMIENTO	$\lambda$ (horas)	$\mu_{\text{máx}}$ Log UFC/ml/hora	$T_g$ (horas)
T 1 (37°C, 1%SG, 8%SNG)	1,474	0,271	1,109
T 2 (37°C, 1%SG, 9%SNG)	0,993	0,707	0,426
T 3 (37°C, 3%SG, 8%SNG)	0,896	0,297	1,015
T 4 (37°C, 3%SG, 9%SNG)	1,090	0,327	0,921
T 5 (40°C, 1%SG, 8%SNG)	1,007	0,102	2,965
T 6 (40°C, 1%SG, 9%SNG)	0,485	0,356	0,845
T 7 (40°C, 3%SG, 8%SNG)	0,977	0,593	0,507
T 8 (40°C, 3%SG, 9%SNG)	0,987	0,892	0,338
T 9 (43°C, 1%SG, 8%SNG)	0,317	0,270	1,116
T 10 (43°C, 1%SG, 9%SNG)	<b>-0,051</b>	1,146	0,263
T 11 (43°C, 3%SG, 8%SNG)	<b>-0,322</b>	1,615	0,186
T 12 (43°C, 3%SG, 9%SNG)	0,557	2,408	0,125

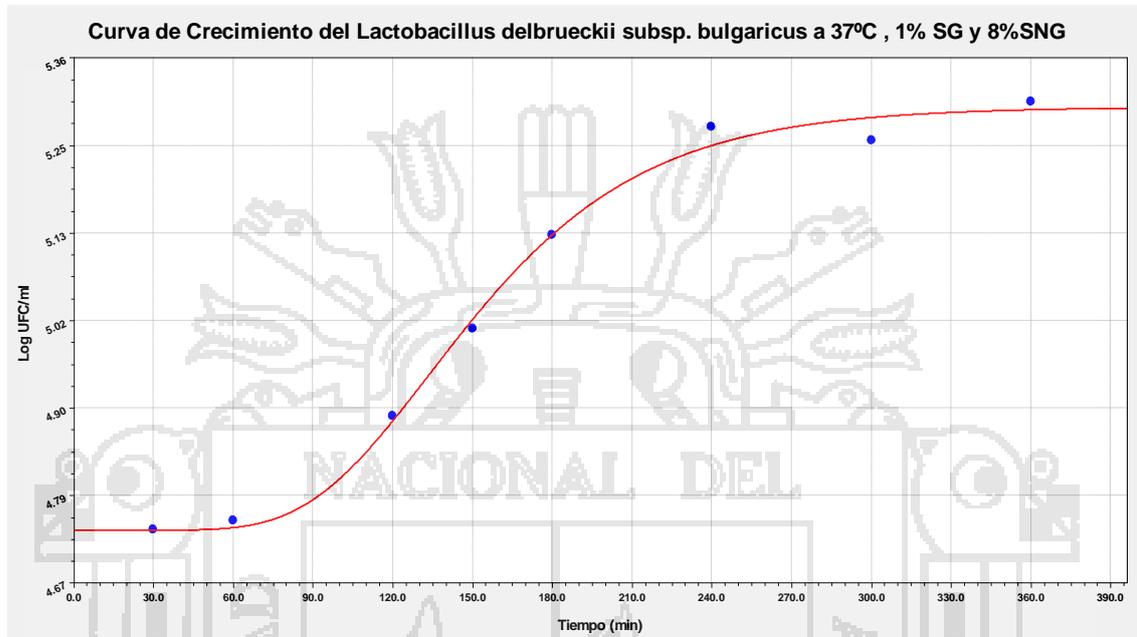
$\lambda$ : Tiempo de adaptación

$\mu_{\text{máx}}$ : Velocidad máxima de crecimiento

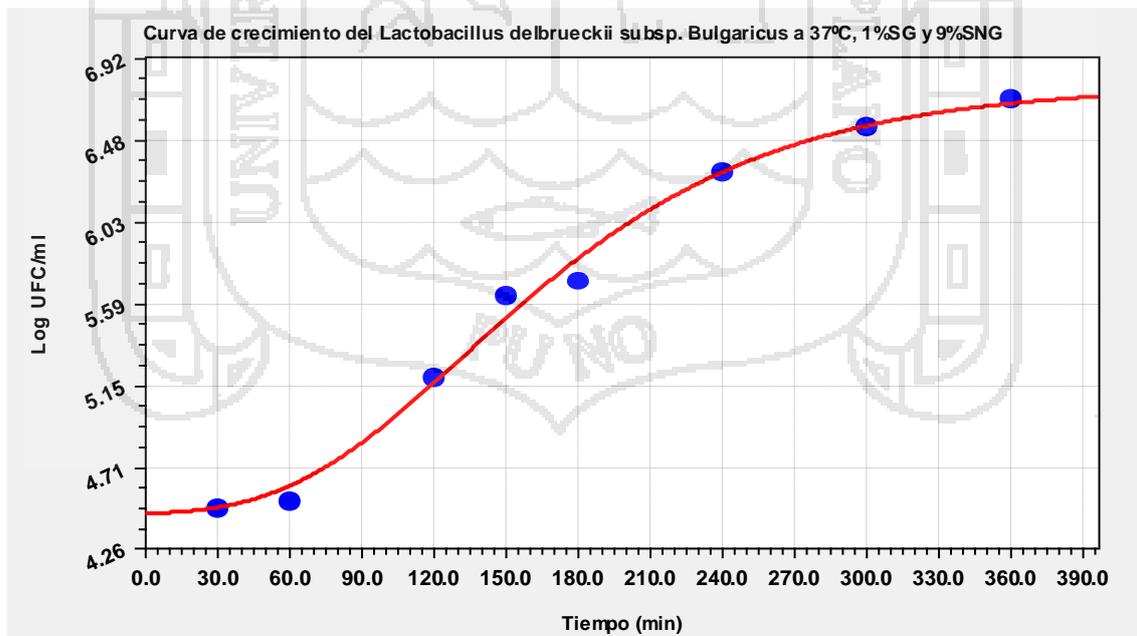
$T_g$ : Tiempo de generación

**ANEXO 3.** Curvas de crecimiento del *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* ajustadas por el Modelo de Gompertz modificado.

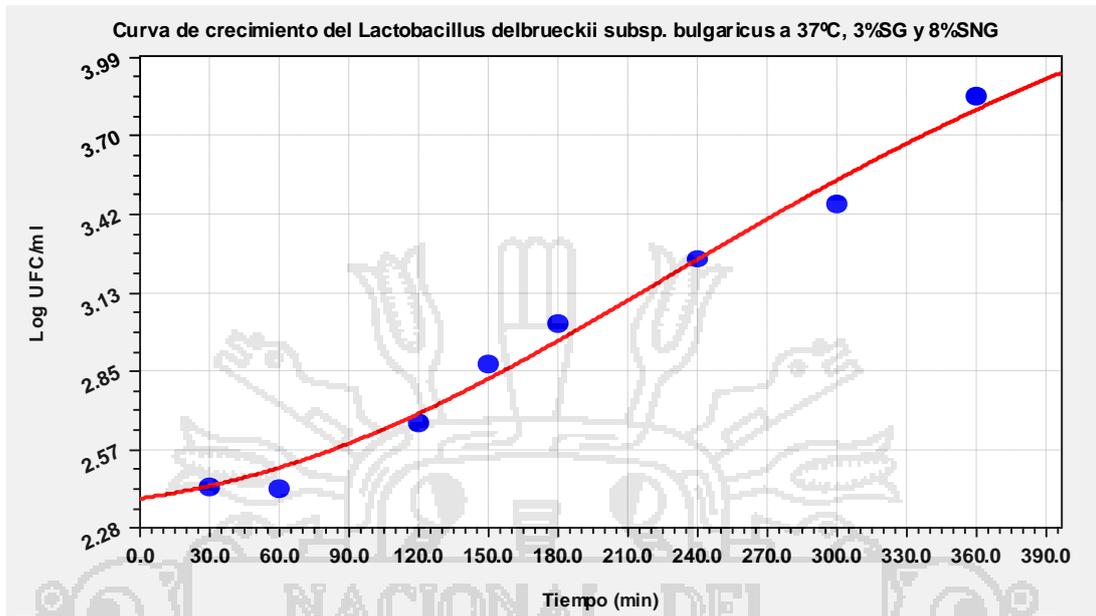
**Anexo 3. 1.** Curva de crecimiento del Lb para el T1



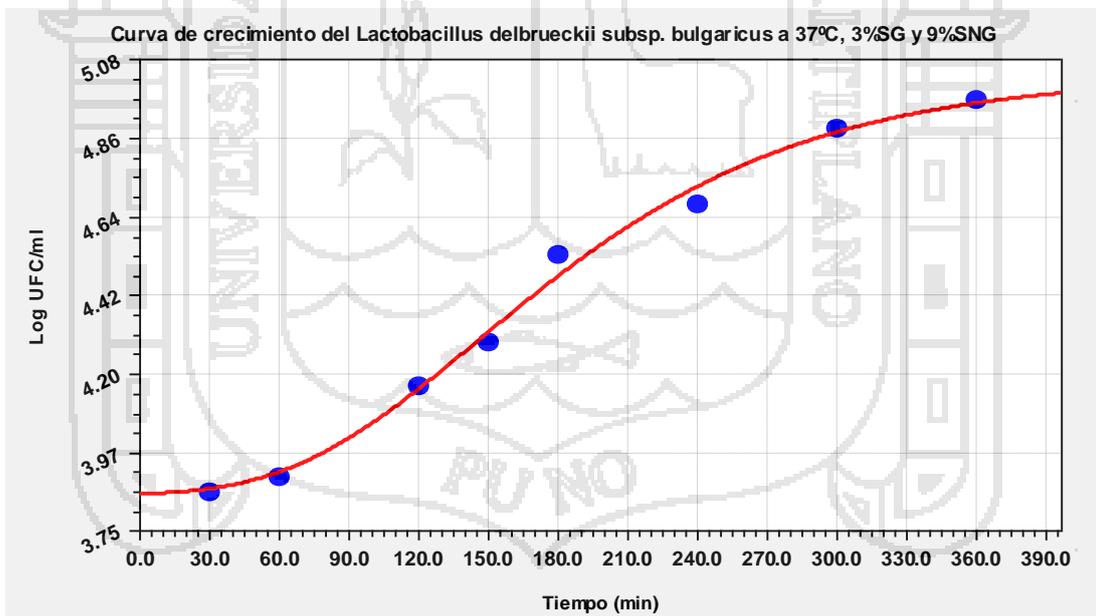
**Anexo 3. 2.** Curva de crecimiento de Lb para T2



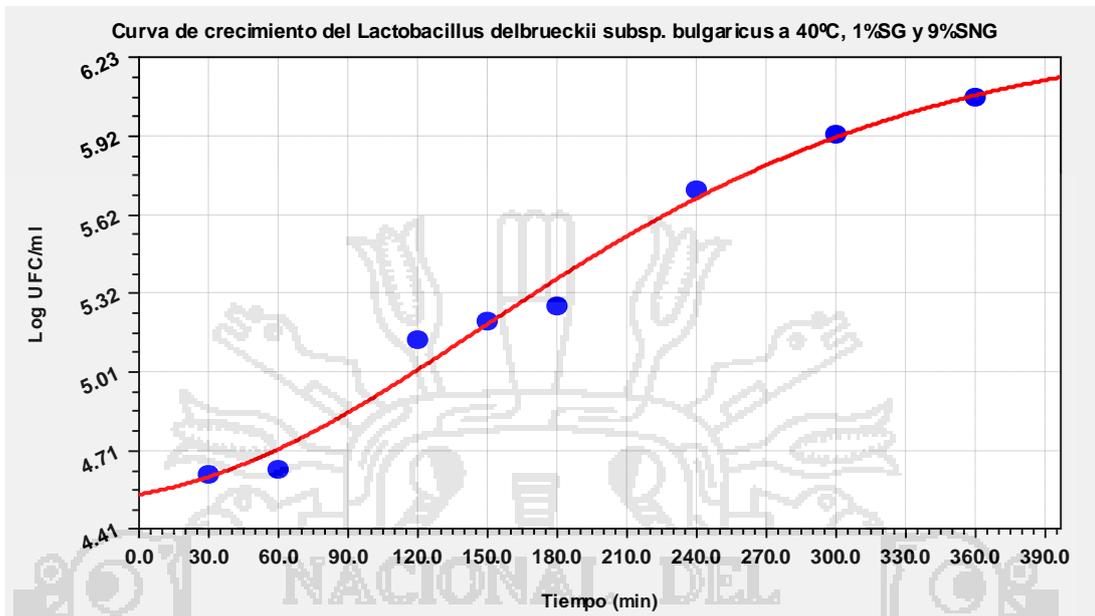
Anexo 3.3. Curva de crecimiento de Lb para el T3



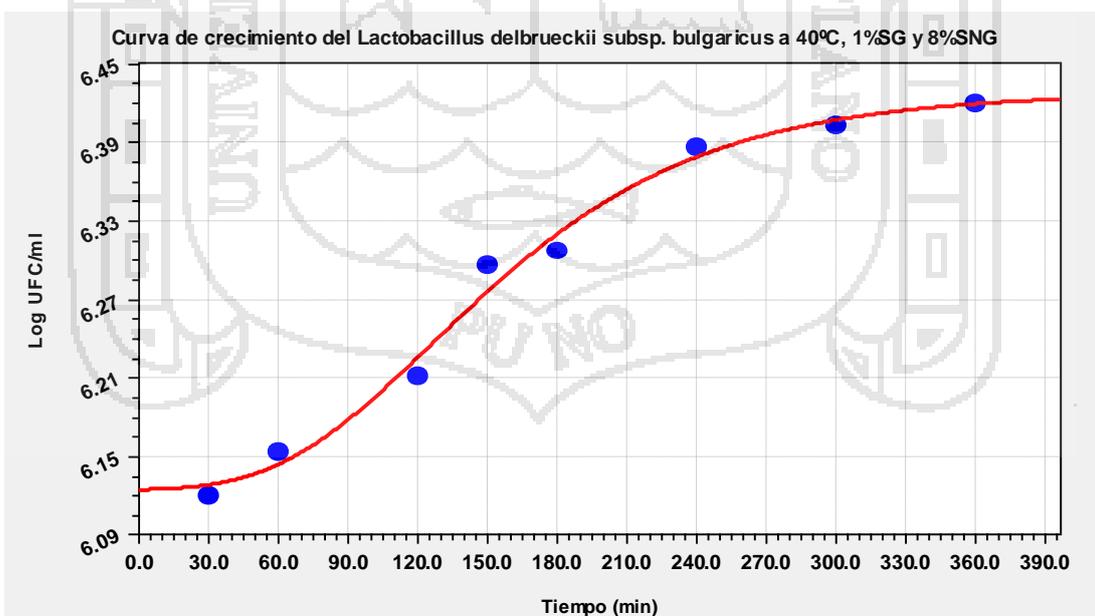
Anexo 3.4. Curva de crecimiento de Lb para el T4.



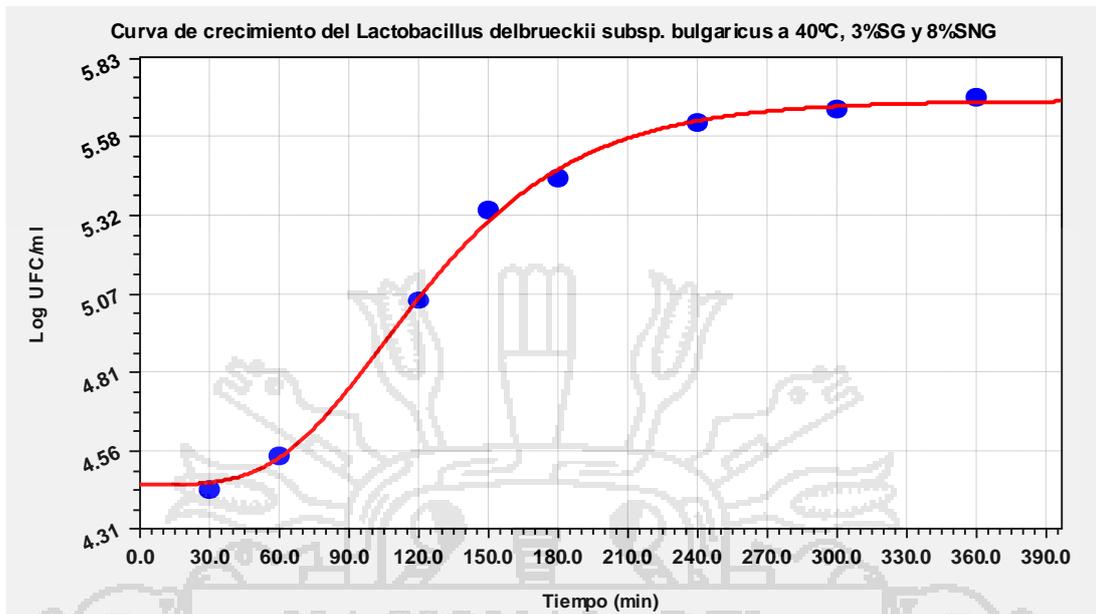
**Anexo 3. 5.** Curva de crecimiento de Lb para el T5



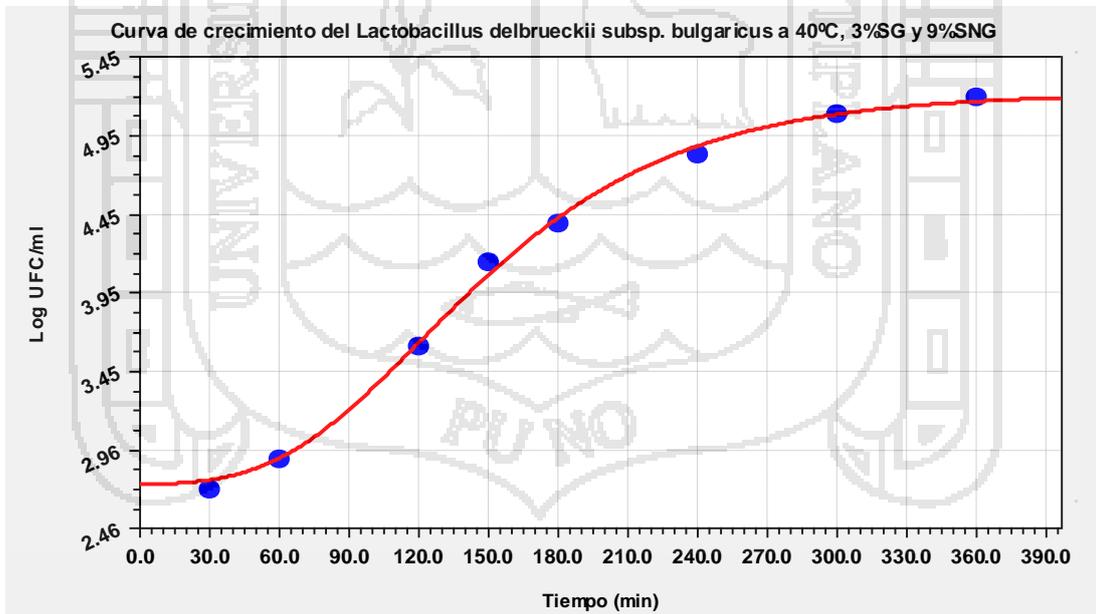
**Anexo 3. 6.** Curva de crecimiento de Lb para el T6



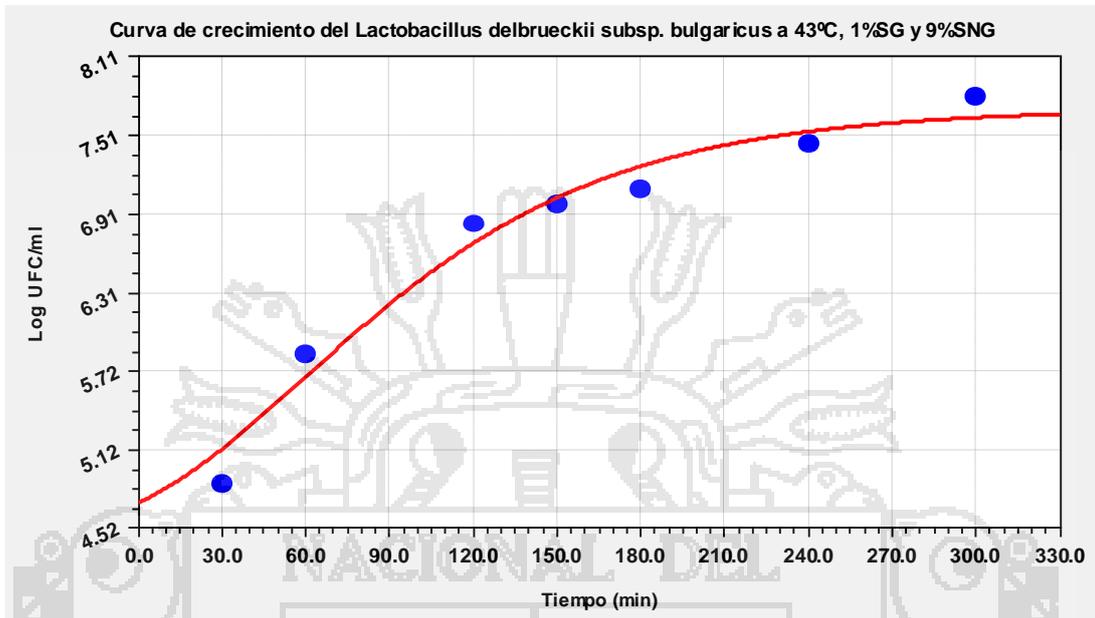
Anexo 3. 7. Curva de crecimiento de Lb para el T7



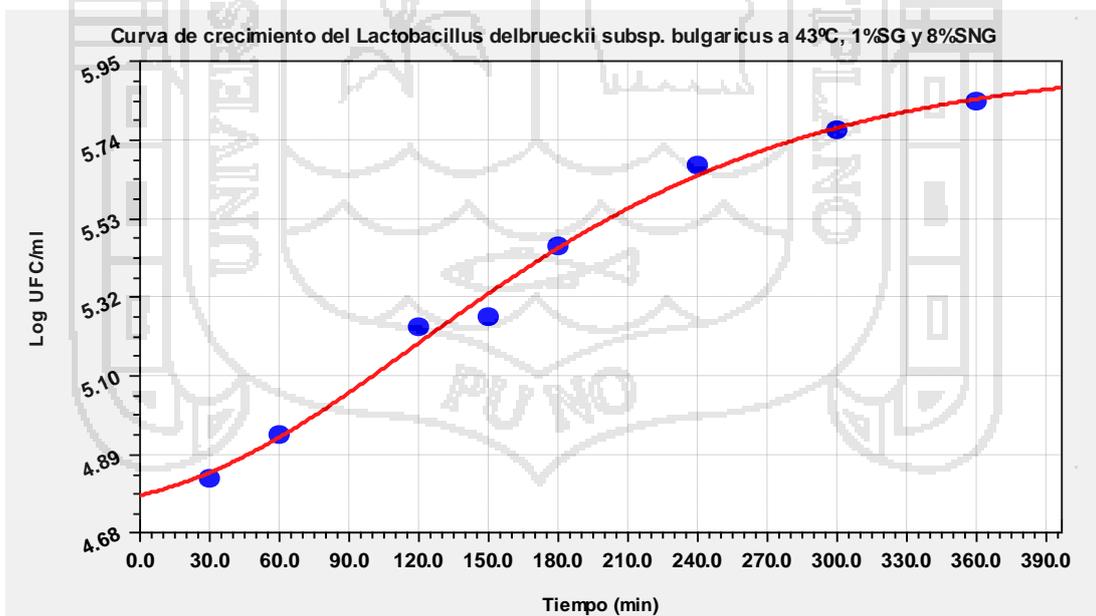
Anexo 3. 8. Curva de crecimiento de Lb para el T8



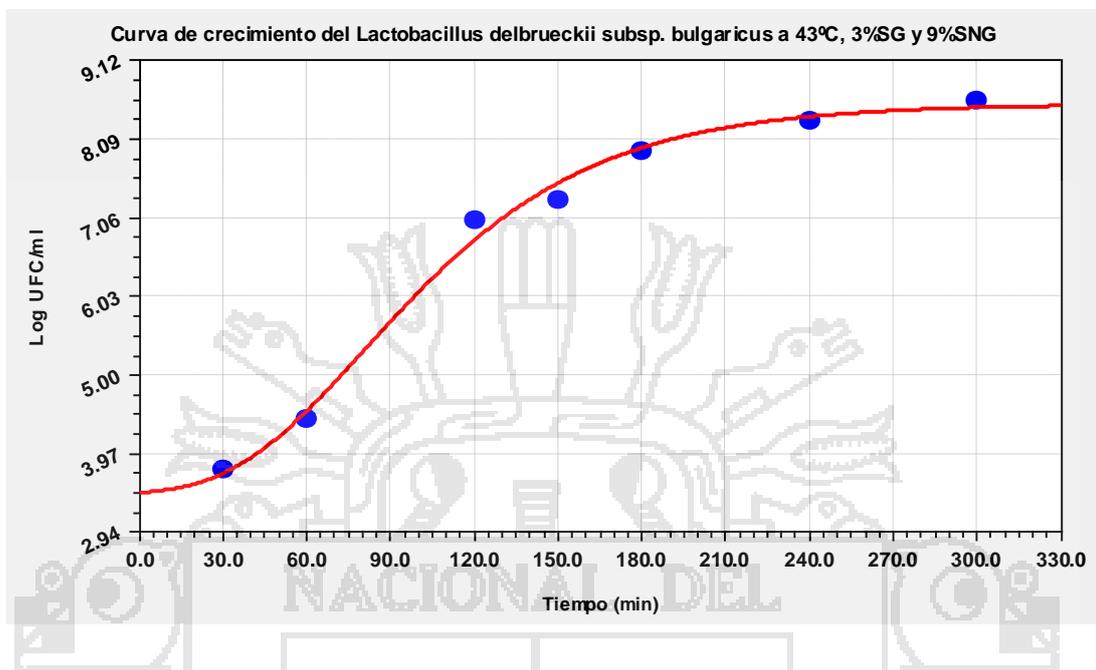
**Anexo 3. 9.** Curva de crecimiento de Lb para el T9



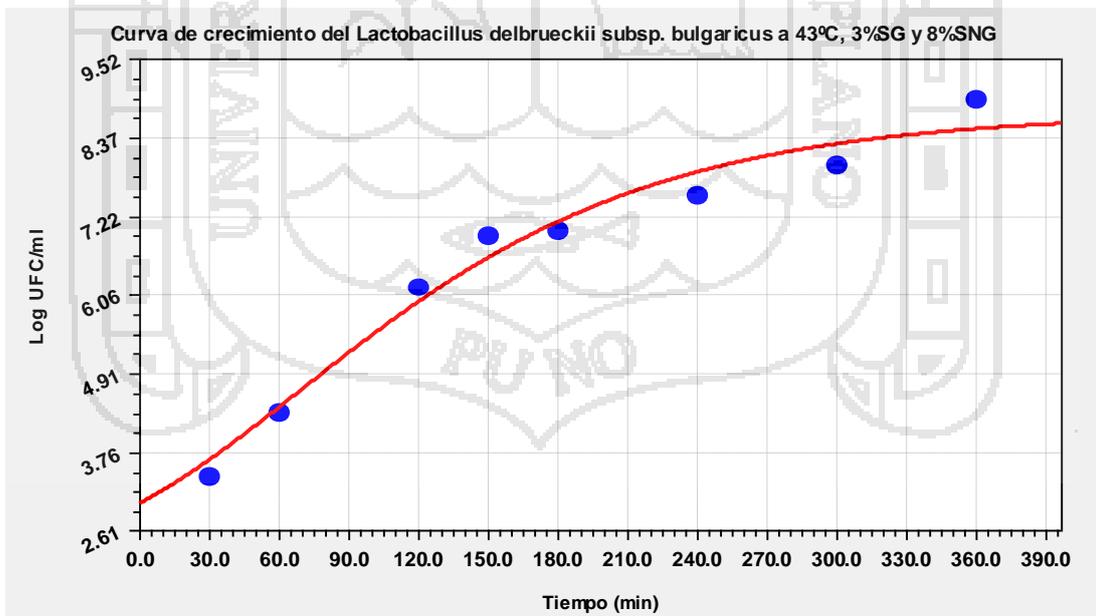
**Anexo 3. 10.** Curva de crecimiento de Lb para el T10



Anexo 3. 11. Curva de crecimiento de Lb para el T12



Anexo 3. 12. Curva de crecimiento de Lb para el T11



**ANEXO 4.** Parámetros ajustados por el Modelo de Gompertz modificado para *Streptococcus salivarius subsp. termophilus*.

TRATAMIENTO	A		B		C		M horas	R <sup>2</sup>
	Log UFC/ml	Log UFC/ml/hora	Log UFC/ml	Log UFC/ml	Log UFC/ml	Log UFC/ml		
T 1 (37°C, 1%SG, 8%SNG)	6,401	0,543	0,556	3,527	0,998			
T 2 (37°C, 1%SG, 9%SNG)	5,493	0,579	2,317	2,418	0,997			
T 3 (37°C, 3%SG, 8%SNG)	6,850	0,844	2,309	2,413	0,993			
T 4 (37°C, 3%SG, 9%SNG)	5,622	0,521	1,187	3,319	0,997			
T 5 (40°C, 1%SG, 8%SNG)	6,443	0,853	0,301	1,866	0,996			
T 6 (40°C, 1%SG, 9%SNG)	5,673	0,341	1,875	2,428	0,994			
T 7 (40°C, 3%SG, 8%SNG)	4,449	1,300	1,241	1,746	0,999			
T 8 (40°C, 3%SG, 9%SNG)	2,735	0,976	2,483	2,011	0,999			
T 9 (43°C, 1%SG, 8%SNG)	5,764	0,948	1,207	1,203	0,997			
T 10 (43°C, 1%SG, 9%SNG)	6,234	1,139	3,241	1,510	0,989			
T 11 (43°C, 3%SG, 8%SNG)	3,766	1,075	6,449	1,389	0,990			
T 12 (43°C, 3%SG, 9%SNG)	4,058	1,294	5,108	1,375	0,998			

**ANEXO 5.** Parámetros de crecimiento cinético del *Streptococcus salivarius subsp. termophilus*.

TRATAMIENTO	$\lambda$ (horas)	$\mu_{\text{máx}}$ Log UFC/ml/hora	$T_g$ (horas)
T 1 (37°C, 1%SG, 8%SNG)	1,684	0,222	1,354
T 2 (37°C, 1%SG, 9%SNG)	0,692	0,949	0,317
T 3 (37°C, 3%SG, 8%SNG)	1,229	0,126	2,398
T 4 (37°C, 3%SG, 9%SNG)	1,400	0,646	0,466
T 5 (40°C, 1%SG, 8%SNG)	0,693	0,761	0,396
T 6 (40°C, 1%SG, 9%SNG)	<b>-0,500</b>	0,535	0,563
T 7 (40°C, 3%SG, 8%SNG)	0,976	0,593	0,507
T 8 (40°C, 3%SG, 9%SNG)	0,987	0,892	0,338
T 9 (43°C, 1%SG, 8%SNG)	0,148	0,915	0,329
T 10 (43°C, 1%SG, 9%SNG)	0,632	0,678	0,444
T 11 (43°C, 3%SG, 8%SNG)	0,459	2,284	0,132
T 12 (43°C, 3%SG, 9%SNG)	0,602	2,568	0,117

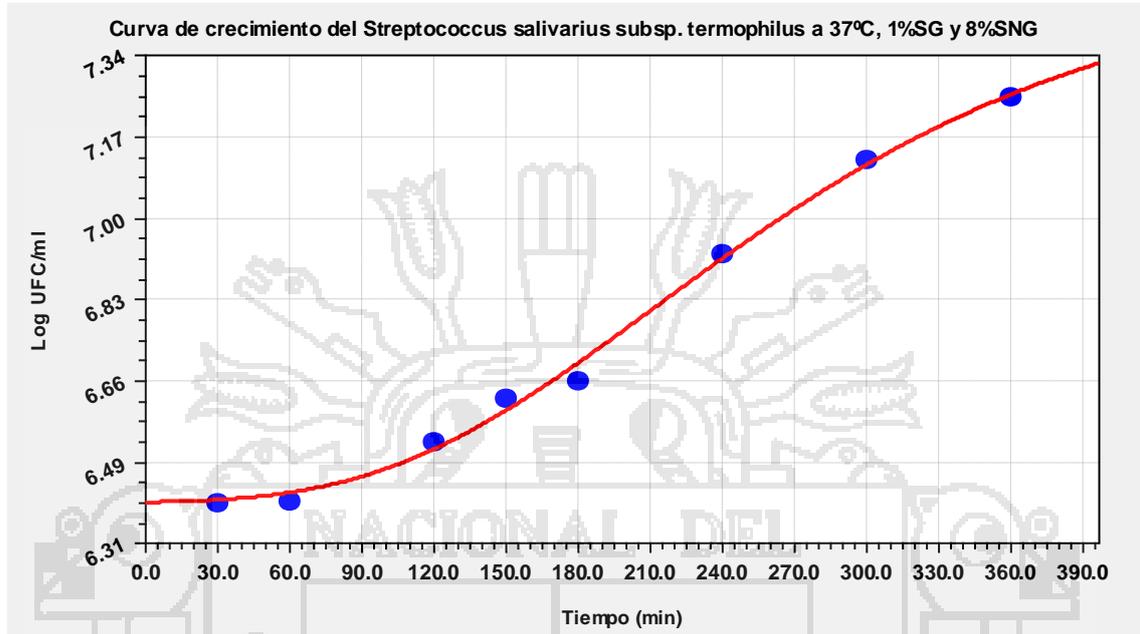
$\lambda$ : Tiempo de adaptación

$\mu_{\text{máx}}$ : Velocidad máxima de crecimiento

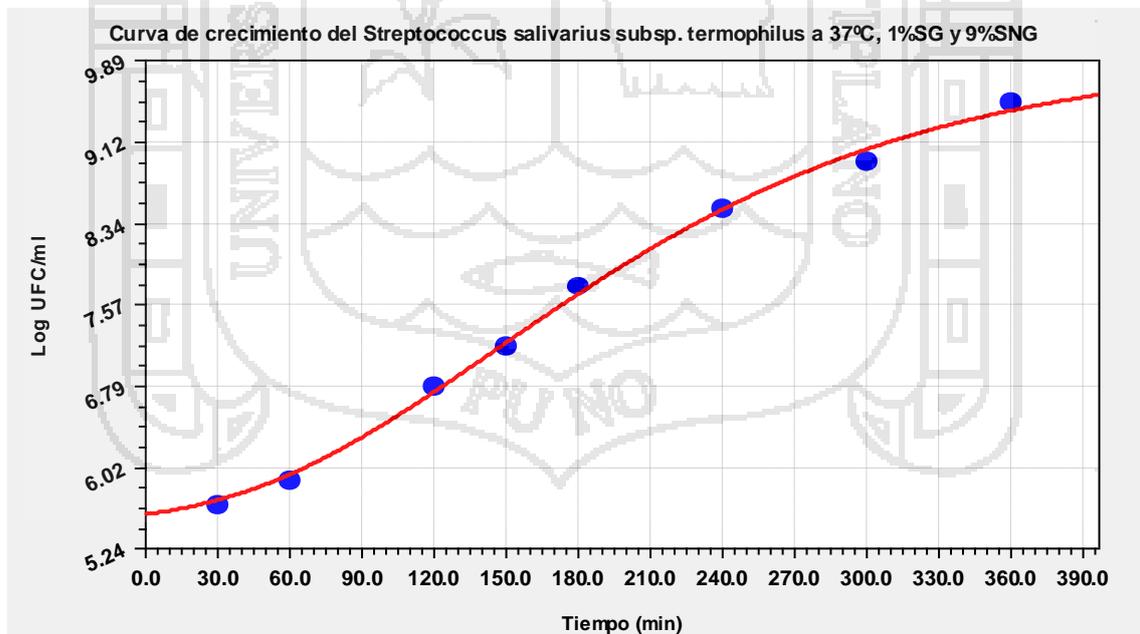
$T_g$ : Tiempo de generación

**ANEXO 6.** Curvas de crecimiento del *Streptococcus salivarius subsp. termophilus* ajustadas por el Modelo de Gompertz modificado.

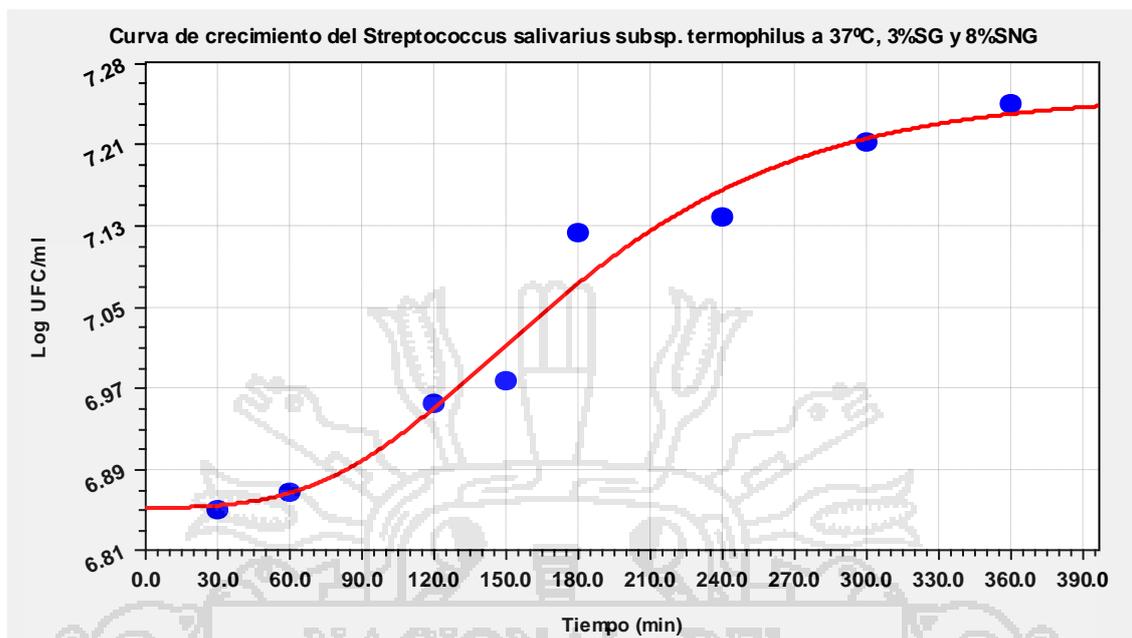
**Anexo 6. 1.** Curva de crecimiento del St T1



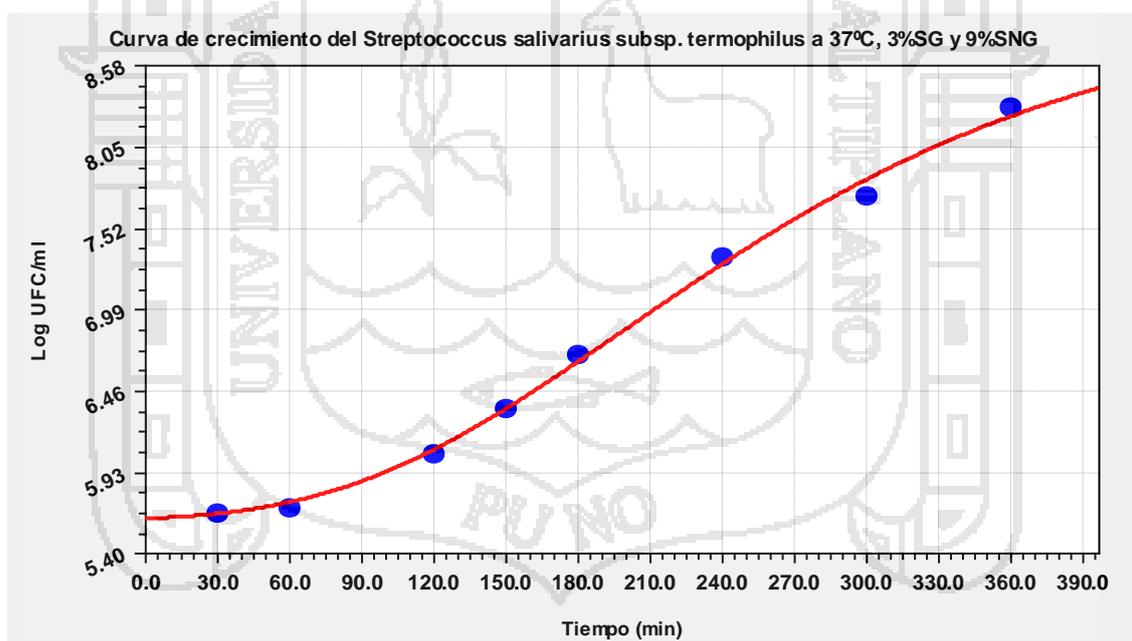
**Anexo 6. 2.** Curva de crecimiento del St T2



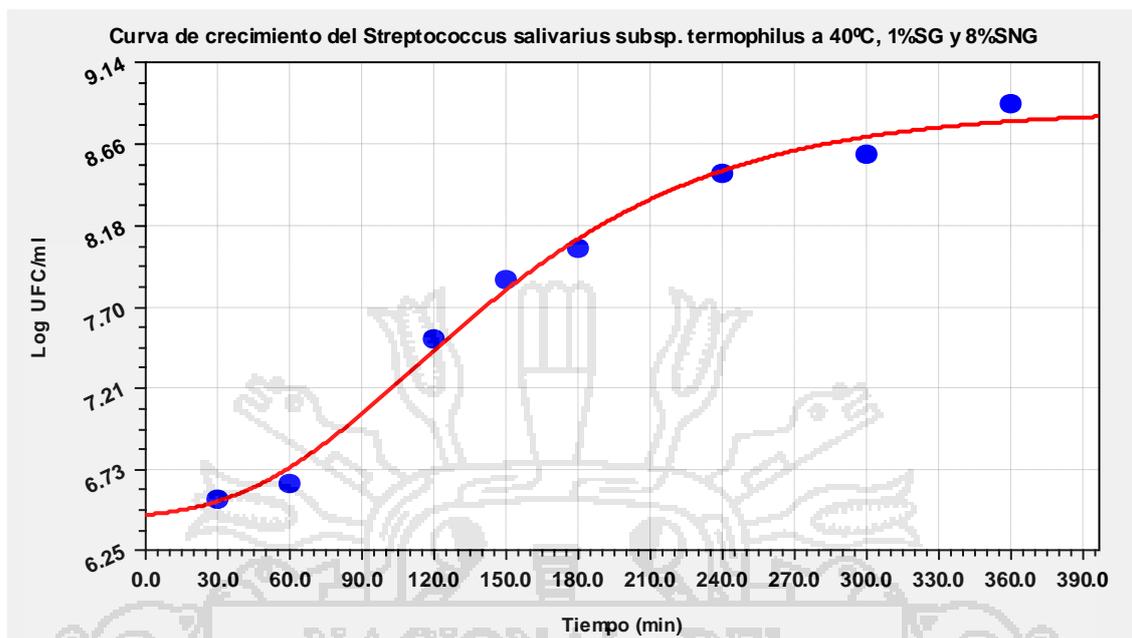
Anexo 6. 3. Curva de crecimiento del St T3



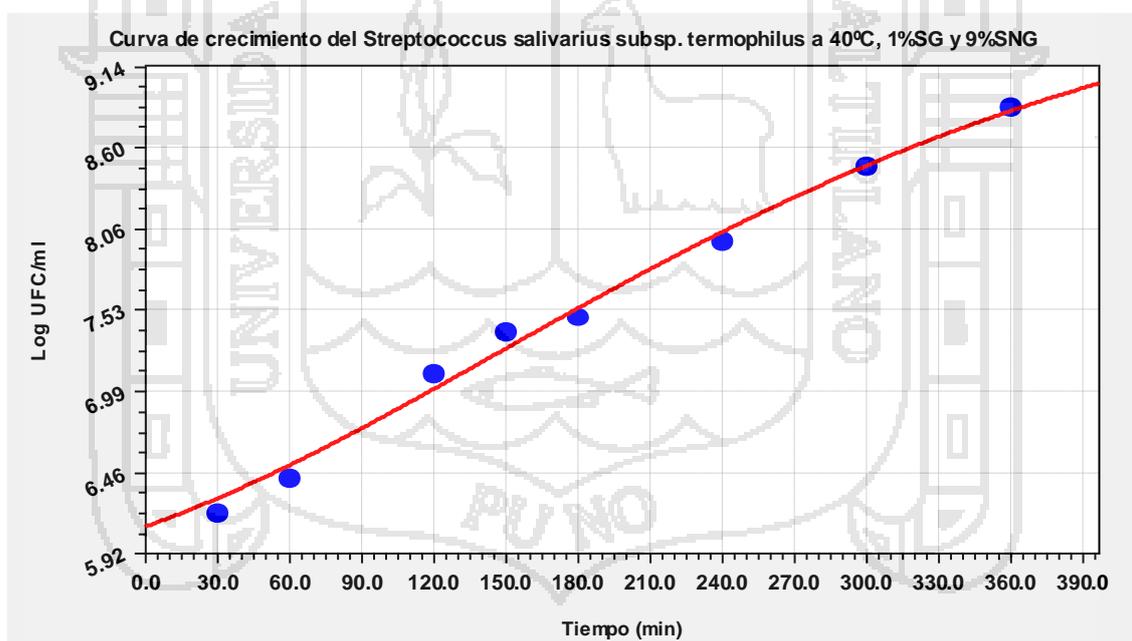
Anexo 6. 4. Curva de crecimiento del St T4



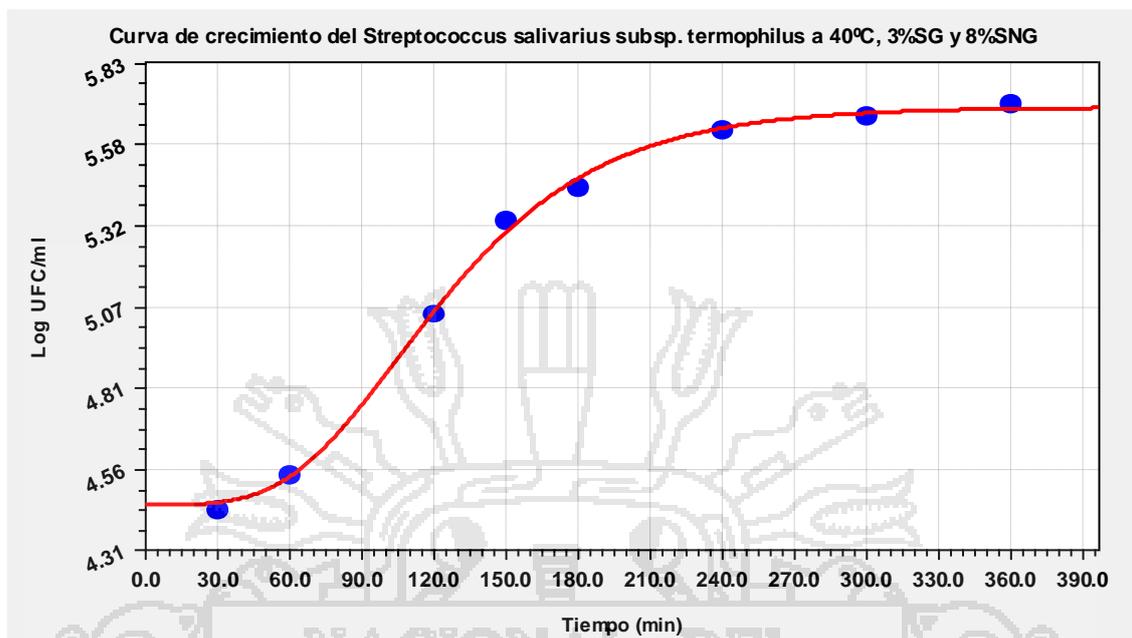
Anexo 6. 5. Curva de crecimiento del St T5



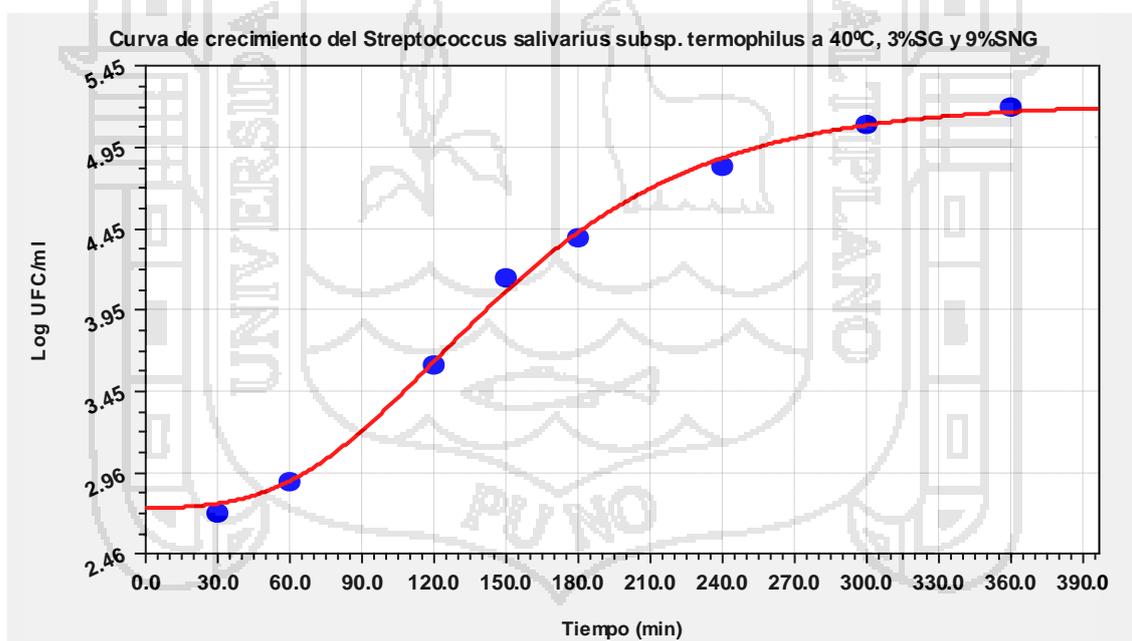
Anexo 6. 6. Curva de crecimiento del St T6



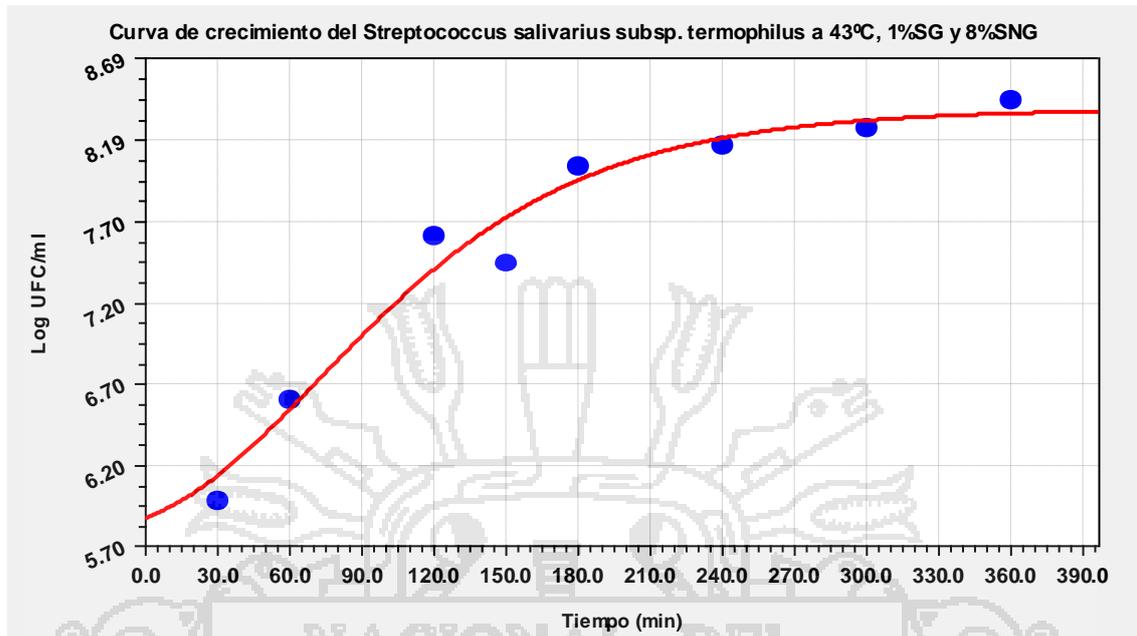
Anexo 6. 7. Curva de crecimiento del St T7



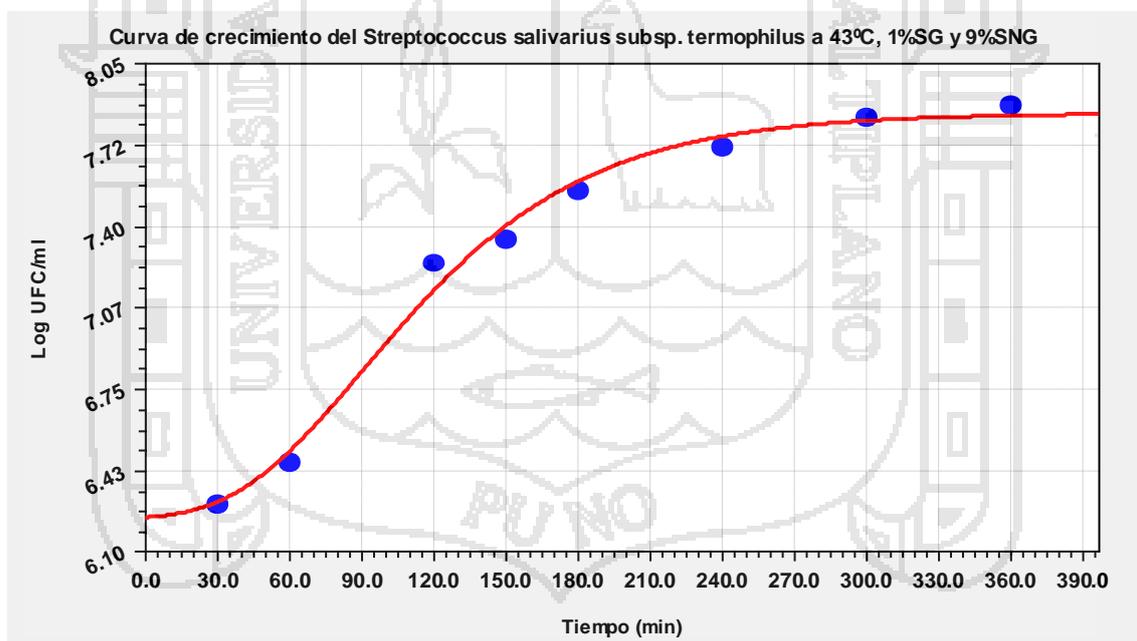
Anexo 6. 8. Curva de crecimiento del St T8



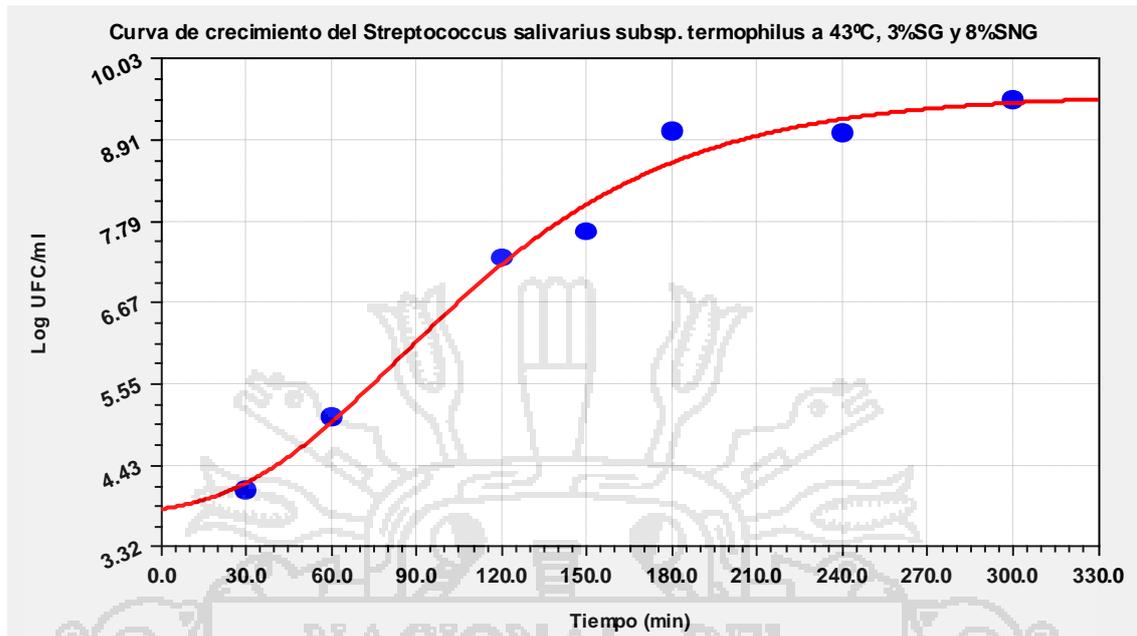
Anexo 6. 9. Curva de crecimiento del St T9



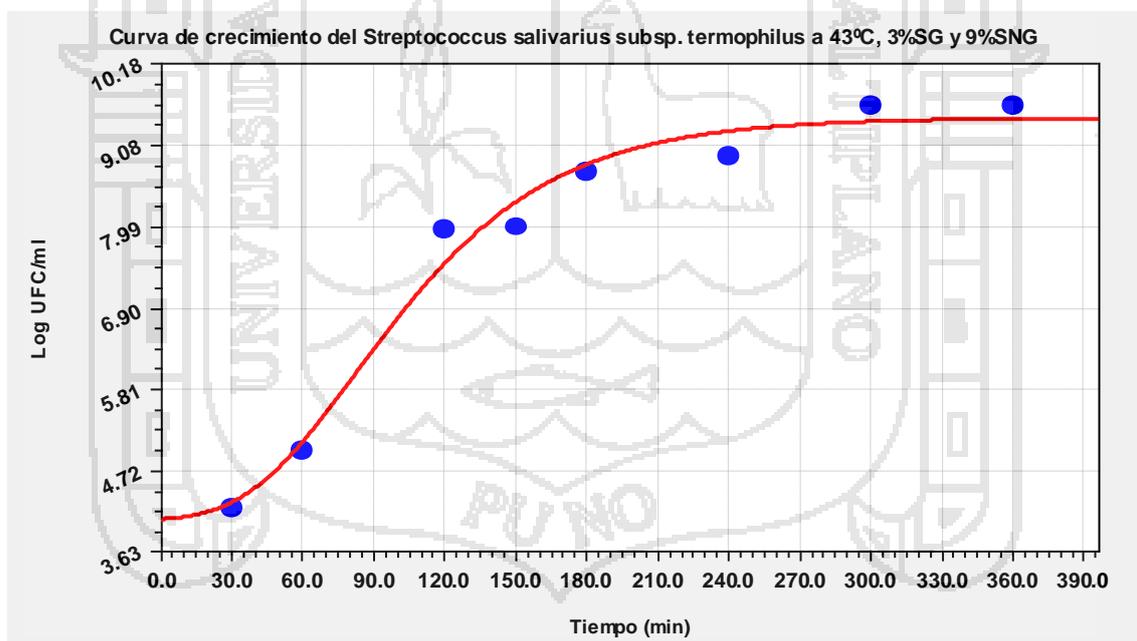
Anexo 6. 10. Curva de crecimiento del St T10



Anexo 6. 11. Curva de crecimiento del St T11



Anexo 6. 12. Curva de crecimiento del St T12



ANEXO 7. Resultados de la evolución del pH obtenidos en cada tratamiento

Tiempo (min)	TRAT 1			TRAT 2			TRAT 3			TRAT 4			TRAT 5			TRAT 6									
	R1	R2	R3																						
0	6,50	6,80	6,7	6,68	6,45	6,50	6,8	6,57	6,52	6,7	6,60	6,62	6,57	6,6	6,5	6,54	6,48	6,7	6,7	6,60	6,49	6,80	6,50	6,60	
30	6,43	6,68	6,66	6,59	6,31	6,45	6,61	6,46	6,50	6,68	6,46	6,55	6,45	6,43	6,29	6,39	6,31	6,52	6,52	6,45	6,37	6,64	6,38	6,46	6,46
60	6,36	6,55	6,57	6,50	6,16	6,40	6,45	6,34	6,48	6,64	6,32	6,48	6,33	6,27	6,13	6,24	6,14	6,36	6,39	6,30	6,24	6,47	6,26	6,32	6,32
120	6,23	6,30	6,40	6,31	5,87	6,30	6,14	6,10	6,44	6,55	6,04	6,34	6,10	5,94	5,81	5,95	5,80	6,05	6,13	5,99	5,99	6,14	6,02	6,05	6,05
150	6,16	6,2	6,3	6,22	5,73	6,3	6	5,99	6,42	6,50	5,90	6,27	5,98	5,8	5,7	5,80	5,63	5,90	6,0	5,84	5,87	6	5,90	5,92	5,92
180	5,93	5,94	6,06	5,98	5,55	6,00	5,80	5,78	6,29	6,27	5,85	6,14	5,81	5,63	5,46	5,63	5,53	5,75	5,74	5,67	5,69	5,70	5,64	5,68	5,68
240	5,47	5,47	5,53	5,49	5,18	5,50	5,45	5,38	6,04	5,80	5,76	5,87	5,46	5,32	5,08	5,29	5,34	5,44	5,22	5,33	5,34	5,13	5,12	5,19	5,19
300	5,01	5	5	5,00	4,81	5,00	5,10	4,97	5,78	5,3	5,7	5,60	5,11	5	4,70	4,94	5,14	5,1	4,70	4,99	4,98	4,6	4,6	4,71	4,71
360	4,81	4,8	4,80	4,80	4,69	4,60	4,40	4,56	4,34	4,50	4,60	4,48	4,95	4,30	4,4	4,56	4,97	4,50	4,40	4,62	4,89	4,60	4,9	4,79	4,79

Tiempo (min)	TRAT 7			TRAT 8			TRAT 9			TRAT 10			TRAT 11			TRAT 12									
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3							
0	6,44	6,70	6,5	6,56	6,53	6,5	6,60	6,54	6,51	6,6	6,50	6,55	6,52	6,80	6,80	6,71	6,39	6,7	6,7	6,60	6,49	6,7	6,5	6,58	
30	6,29	6,52	6,40	6,40	6,39	6,34	6,45	6,39	6,38	6,49	6,40	6,42	6,36	6,62	6,44	6,47	6,26	6,55	6,44	6,42	6,35	6,54	6,37	6,42	6,42
60	6,13	6,33	6,27	6,25	6,24	6,19	6,31	6,25	6,26	6,33	6,29	6,29	6,21	6,44	6,08	6,24	6,14	6,37	6,20	6,23	6,22	6,38	6,21	6,27	6,27
120	5,82	5,96	6,02	5,94	5,95	5,88	6,02	5,95	6,01	6,02	6,08	6,04	5,90	6,08	5,36	5,78	5,89	6,01	5,71	5,87	5,95	6,05	5,90	5,96	5,96
150	5,67	5,8	5,9	5,78	5,81	5,7	5,9	5,80	5,88	5,9	6	5,91	5,74	5,90	5,00	5,55	5,76	5,8	5,5	5,69	5,81	5,9	5,7	5,81	5,81
180	5,54	5,61	5,66	5,60	5,65	5,58	5,70	5,64	5,73	5,64	5,75	5,70	5,58	5,71	4,96	5,41	5,61	5,58	5,33	5,50	5,63	5,70	5,54	5,62	5,62
240	5,28	5,28	5,20	5,25	5,34	5,27	5,35	5,32	5,42	5,17	5,28	5,29	5,25	5,32	4,87	5,15	5,30	5,07	5,04	5,14	5,27	5,35	5,13	5,25	5,25
300	5,02	5	4,7	4,90	5,02	5	5	5,00	5,11	4,70	4,8	4,87	4,93	4,9	4,8	4,88	5,00	4,6	4,8	4,77	4,91	5	4,7	4,87	4,87
360	4,81	4,60	4,8	4,73	4,81	4,70	4,60	4,70	4,83	4,50	4,80	4,71	4,76	4,7	4,8	4,74	4,78	4,30	4,60	4,56	4,74	4,7	4,5	4,63	4,63



ANEXO 8. Resultados de la evolución de la acidez obtenidos en cada tratamiento

Tiempo (min)	TRAT 1			P <sub>om</sub>	TRAT 2			P <sub>om</sub>	TRAT 3			P <sub>om</sub>	TRAT 4			P <sub>om</sub>	TRAT 5			P <sub>om</sub>	TRAT 6			
	R1	R2	R3		R1	R2	R3		R1	R2	R3		R1	R2	R3		R1	R2	R3		R1	R2	R3	
0	0,18	0,16	0,16	0,17	0,17	0,18	0,16	0,17	0,16	0,15	0,18	0,16	0,18	0,18	0,17	0,17	0,16	0,15	0,18	0,16	0,18	0,16	0,18	0,17
30	0,20	0,18	0,18	0,18	0,21	0,21	0,20	0,20	0,17	0,18	0,23	0,20	0,20	0,21	0,19	0,20	0,21	0,18	0,20	0,20	0,22	0,19	0,21	0,21
60	0,21	0,20	0,20	0,20	0,25	0,25	0,23	0,24	0,18	0,22	0,28	0,23	0,22	0,25	0,21	0,22	0,26	0,20	0,23	0,23	0,26	0,22	0,25	0,24
120	0,24	0,23	0,23	0,24	0,34	0,32	0,30	0,32	0,21	0,29	0,39	0,29	0,25	0,32	0,26	0,27	0,35	0,25	0,28	0,29	0,33	0,29	0,32	0,31
150	0,26	0,25	0,25	0,25	0,38	0,35	0,34	0,36	0,22	0,32	0,44	0,33	0,27	0,35	0,28	0,30	0,40	0,28	0,30	0,33	0,37	0,32	0,36	0,35
180	0,34	0,34	0,33	0,34	0,46	0,44	0,43	0,44	0,25	0,37	0,49	0,37	0,32	0,40	0,34	0,36	0,44	0,35	0,35	0,38	0,44	0,39	0,43	0,42
240	0,49	0,52	0,50	0,50	0,61	0,61	0,60	0,61	0,31	0,46	0,58	0,45	0,42	0,51	0,47	0,47	0,51	0,48	0,44	0,48	0,59	0,52	0,56	0,56
300	0,64	0,70	0,66	0,67	0,77	0,78	0,78	0,78	0,37	0,56	0,68	0,54	0,52	0,62	0,60	0,58	0,59	0,62	0,54	0,58	0,73	0,65	0,70	0,69
360	0,80	0,72	0,78	0,77	0,80	0,94	0,86	0,87	1,09	0,86	0,76	0,90	0,64	0,80	0,78	0,74	0,71	0,86	0,88	0,82	0,79	0,93	0,86	0,86

Tiempo (min)	TRAT 7			P <sub>om</sub>	TRAT 8			P <sub>om</sub>	TRAT 9			P <sub>om</sub>	TRAT 10			P <sub>om</sub>	TRAT 11			P <sub>om</sub>	TRAT 12			
	R1	R2	R3		R1	R2	R3		R1	R2	R3		R1	R2	R3		R1	R2	R3		R1	R2	R3	
0	0,17	0,18	0,17	0,17	0,15	0,15	0,16	0,15	0,18	0,18	0,17	0,18	0,16	0,16	0,18	0,17	0,16	0,17	0,18	0,17	0,17	0,18	0,15	0,17
30	0,21	0,22	0,21	0,21	0,19	0,20	0,20	0,19	0,21	0,20	0,20	0,20	0,19	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,21	0,20	0,21	0,21	0,19	0,20
60	0,25	0,26	0,24	0,25	0,23	0,24	0,23	0,24	0,24	0,23	0,23	0,23	0,23	0,23	0,22	0,23	0,24	0,24	0,25	0,24	0,25	0,24	0,24	0,24
120	0,34	0,34	0,32	0,33	0,31	0,33	0,30	0,32	0,29	0,28	0,29	0,29	0,31	0,30	0,27	0,29	0,31	0,31	0,33	0,32	0,33	0,29	0,33	0,32
150	0,39	0,38	0,36	0,37	0,36	0,38	0,34	0,36	0,32	0,30	0,32	0,31	0,35	0,34	0,29	0,33	0,35	0,35	0,37	0,36	0,38	0,32	0,37	0,36
180	0,44	0,44	0,43	0,44	0,41	0,44	0,42	0,42	0,38	0,37	0,40	0,38	0,43	0,41	0,36	0,40	0,42	0,44	0,42	0,43	0,45	0,39	0,44	0,43
240	0,56	0,57	0,57	0,56	0,53	0,55	0,57	0,55	0,49	0,50	0,55	0,52	0,58	0,55	0,51	0,55	0,56	0,61	0,53	0,57	0,60	0,53	0,57	0,57
300	0,67	0,69	0,71	0,69	0,65	0,67	0,72	0,68	0,61	0,63	0,71	0,65	0,74	0,69	0,65	0,69	0,71	0,79	0,65	0,71	0,76	0,67	0,71	0,71
360	0,76	0,80	0,93	0,83	0,73	0,82	0,78	0,78	0,71	0,79	0,86	0,79	0,92	0,83	0,76	0,84	0,74	0,89	0,93	0,85	0,81	0,88	0,86	0,85

**ANEXO 9. Panel Fotográfico**



Foto 1. Análisis fisicoquímico de leche fresca entera en LACTOSCAN.



Foto 2. Realizando el descremado de leche entera fresca para el estandarizado.



Foto 3. Preparando los medios de cultivo para la esterilización en autoclave.



Foto 4. Vertido de Agar M17 en placas Petri.



Foto 5. Vertido de Agar MRS en placas Petri.



Foto 6. Preparando la primera dilución para el sembrado de las bacterias.



Foto 7. Agitando la dilución para homogenizar la muestra a sembrar.



Foto 8. Incubación de la muestra para el muestreo a diferentes tiempos.



Foto 9. Control de temperatura en el proceso de incubación de muestra.



Foto 10. Toma de muestra para el sembrado en placas Petri.



Foto 11. Dilución de muestra tomada para el sembrado.



Foto 12. Control de temperatura y tiempo en la incubación de bacterias en placas Petri.



Foto 13. Conteo de colonias de bacterias ácidolácticas.

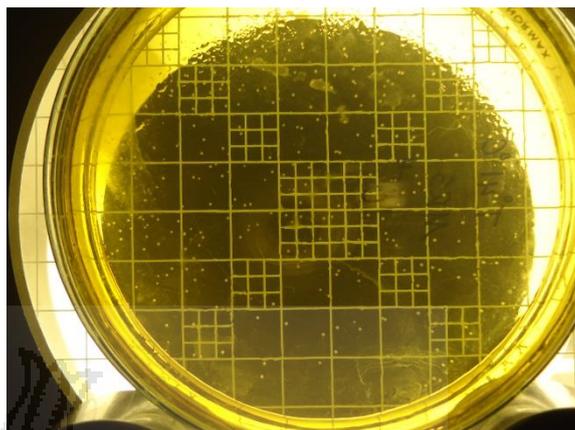


Foto 14. Colonias de *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*.

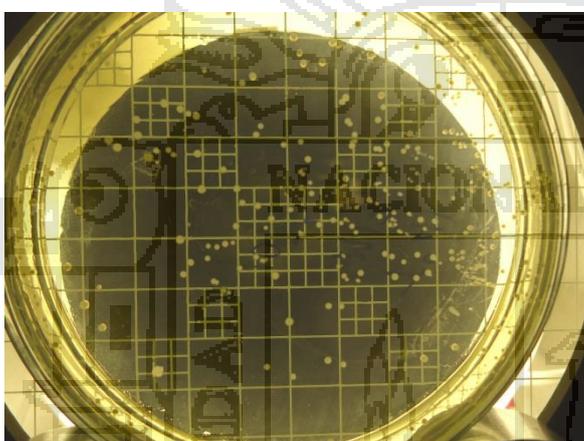


Foto 15. Colonias de *Streptococcus salivarius subsp. termophilus*.



Foto 16. Colonias de *Streptococcus salivarius subsp. termophilus*.



Foto 17. Determinando pH.



Foto 18. Determinando acidez.