



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

**“VERIFICACIÓN DEL CUMPLIMIENTO DE LOS REQUISITOS
SEGÚN NORMA INEN NTE INEN 2395:2011 Y NTE INEN
2564:2011 EN YOGURES Y BEBIDAS LÁCTEAS ENVASADOS EN
FUNDAS DE POLIETILENO DE BAJA DENSIDAD,
COMERCIALIZADOS EN BARES ESCOLARES DE LAS
UNIDADES EDUCATIVAS PÚBLICAS DE LA CIUDAD DE
RIOBAMBA”**

TRABAJO DE TITULACIÓN

TIPO: PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

Presentado para optar al grado académico de:

BIOQUÍMICA FARMACÉUTICA

AUTORA: ANA LIZBETH AGUIRRE NARANJO

TUTORA: Ing. PAOLA ARGUELLO HERNÁNDEZ, M.Sc.

Riobamba-Ecuador

2018

©2018, Ana Lizbeth Aguirre Naranjo

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento, siempre y cuando se reconozca el Derecho de Autor.

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

El Tribunal de Trabajo de Titulación certifica que el trabajo de investigación: “VERIFICACIÓN DEL CUMPLIMIENTO DE LOS REQUISITOS SEGÚN NORMA INEN NTE INEN 2395:2011 Y NTE INEN 2564:2011 EN YOGURES Y BEBIDAS LÁCTEAS ENVASADOS EN FUNDAS DE POLIETILENO DE BAJA DENSIDAD, COMERCIALIZADOS EN BARES ESCOLARES DE LAS UNIDADES EDUCATIVAS PÚBLICAS DE LA CIUDAD DE RIOBAMBA”, de responsabilidad de la señorita, Ana Lizbeth Aguirre Naranjo, ha sido minuciosamente revisado por los Miembros del Tribunal de titulación, quedando autorizada su presentación.

FIRMA

FECHA

Ing. Paola Arguello, MsC.

**DIRECTOR DEL TRABAJO
DE TITULACIÓN**

Ing. Rafaela Pacurucu, MsC.

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

Yo, Ana Lizbeth Aguirre Naranjo declaro que el presente Trabajo de titulación es de mi total autoría, por lo tanto, soy responsable de las ideas, doctrinas y resultados expuestos en el mismo, y el patrimonio intelectual del Trabajo de titulación pertenece a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

Como autora, asumo la responsabilidad legal y académica de los contenidos de este trabajo de titulación.

Ana Lizbeth Aguirre Naranjo

180442118-6

DEDICATORIA

A Dios y a mi amada familia, mi razón e inspiración de alcanzar el éxito.

Lizabeth

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, agradezco a Dios, por la vida y por la bendición de tener a los mejores padres, quienes con su esfuerzo, sacrificio y apoyo han hecho posible, que culmine esta etapa en mi formación profesional, al tiempo que han inculcado en mí, valores humanos invaluable para el desenvolvimiento en cualquier ámbito.

A todos quienes me brindaron su apoyo moral y económico a lo largo de mi carrera universitaria, por creer a mí, e incentivar a continuar.

Mi profundo agradecimiento y gratitud a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, a la Escuela de Bioquímica y Farmacia, por abrirme las puertas para estudiar la carrera que tanto anhelaba.

A mis profesores, Rafa y Paola quienes han contribuido con mi formación; y a mis amigos con quienes he reído y he llorado, que han sido parte de mi vida por todos estos años.

A todas las personas que, tienen fe en mí y que de alguna forma han colaborado para hacer esto posible.

Lizbeth

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

UE	Unión Europea
INEN	Servicio Ecuatoriano de Normalización
AOAC	Official Methods of Analysis
FAO	Organización de Naciones Unidas para la Agricultura y a Alimentación
OMS	Organización Mundial de la Salud
ISO	International Organization for Standardization
NOM	Normativa Oficial Mexicana
SAE	Servicio de Acreditación Ecuatoriano
SAGID	Grupo de Investigación de Desarrollo y Seguridad alimentaria
BAL	Bacterias ácido lácticas
BPM	Buenas Prácticas de Manufactura
ETA	Enfermedad transmitida por alimentos
MRS	Medio de cultivo de Man Rogosa Sharpe
UFC	Unidades formadoras de colonias
UHT	Tratamiento a altas temperaturas

TABLA DE CONTENIDOS

RESUMEN	xiv
SUMARY	xvi
INTRODUCCIÓN	xv
OBJETIVOS	3
 CAPÍTULO I	
1. MARCO TEÓRICO REFERENCIAL	4
1.1 Fundamentación teórica y conceptual	4
1.1.1 <i>Leche</i>	4
1.2 Leches fermentadas	4
1.2.1 <i>Clasificación de leches fermentadas</i>	4
1.2.1.1 <i>Kéfir</i>	5
1.2.1.2 <i>Kumis</i>	5
1.2.1.3 <i>Leche cultivada, o acidificada</i>	5
1.2.1.4 <i>Leche fermentada con ingredientes</i>	5
1.2.1.5 <i>Leche fermentada concentrada</i>	6
1.2.1.6 <i>Leche fermentada adicionada con microorganismos probióticos</i>	6
1.2.2 <i>Importancia nutricional del yogur</i>	6
1.2.2.1 <i>Carbohidratos disponibles</i>	7
1.2.2.2 <i>Proteínas</i>	7
1.2.2.3 <i>Lípidos</i>	7
1.2.2.4 <i>Vitaminas y minerales</i>	7
1.3 Bebidas lácteas	8
1.3.1 <i>Clasificación de bebidas lácteas</i>	8
1.3.1.1 <i>Bebida láctea con suero de leche</i>	8
1.3.1.2 <i>Bebida láctea compuesta</i>	8
1.4 Microbiología de las leches fermentadas y bebidas lácteas	8
1.4.1 <i>Microorganismos patógenos</i>	10
1.4.1.1 <i>Coliformes totales</i>	10

1.4.1.2	<i>Escherichia coli</i>	10
1.4.1.3	<i>Staphylococcus aureus</i>	11
1.4.1.4	Mohos y Levaduras	11
1.4.2	Microorganismos beneficiosos.....	11
1.4.2.1	Bacterias acido lácticas	12
1.5.1	Géneros de BAL	13
1.5.1.1	<i>Lactobacillus spp.</i>	13
1.5.1.2	<i>Streptococcus spp.</i>	14
1.5.2	Relación entre estreptococos y lactobacilos que comprenden el cultivo definido del yogur	14
1.5.2.1	Potencial de <i>Streptococcus termophilus</i> y <i>Lactobacillus bulgaricus</i>	15
1.5.2.2	Actividad de <i>Streptococcus termophilus</i> sobre <i>Lactobacillus bulgaricus</i>	16
1.5.3	Probióticos en el yogur	17
1.5.3.1	Potencial Probiótico.....	18
1.5.4	Legislación sobre el yogur	18

CAPÍTULO II

2.	MARCO METODOLÓGICO	20
2.1	Lugar de Investigación	20
2.2.	Factores de Investigación	20
2.2.1	<i>Población de estudio</i>	20
2.2.2	<i>Muestra</i>	20
2.3	Materiales, equipos y reactivos	20
2.4	Técnicas y Métodos	21
2.4.1	<i>Toma y transporte de muestras</i>	21
2.4.2	<i>Muestreo de yogur</i>	21
2.4.3	<i>Muestreo de bebidas lácteas</i>	22
2.5	Análisis microbiológicos	22
2.5.1	<i>Preparación de diluciones</i>	22
2.5.2	<i>Control de calidad</i>	23
2.5.2.1	<i>Recuento de aerobios mesófilos</i>	23
2.5.2.2	<i>Recuento para bacterias indicadoras de calidad, coliformes, Escherichia coli, Staphylococcus aureus, mohos y levaduras</i>	23

2.5.3	<i>Recuento de bacterias ácido lácticas (BAL)</i>	25
2.5.4	<i>Pruebas bioquímicas para comprobación de BAL</i>	25
2.5.4.1	<i>Tinción de Gram</i>	25
2.5.4.2	<i>Prueba de catalasa</i>	26
2.5.4.3	<i>Prueba de oxidasa</i>	26
2.5.5	<i>Evaluación del efecto de bacterias ácido lácticas de yogur, sobre población de Escherichia coli ATCC 25922</i>	26
2.5.5.1	<i>Yogurt</i>	26
2.5.5.2	<i>Preparación de suspensión de Escherichia coli</i>	27
2.5.5.3	<i>Inoculación de bacteria patógena en el yogur</i>	27
2.5.5.4	<i>Medición de bacteria patógena y bacterias ácido lácticas</i>	27
2.5.5.5	<i>Medición de pH</i>	28
2.6	Análisis físico- químicos	28
2.6.1	<i>pH</i>	28
2.6.2	<i>Actividad de agua</i>	28
2.6.3	<i>Porcentaje de humedad por método de desecación en estufa de aire caliente</i>	28
2.6.4	<i>Porcentaje de cenizas</i>	29
2.6.5	<i>Contenido graso</i>	30
2.6.6	<i>Proteínas</i>	30

CAPÍTULO III

3.	MARCO DE RESULTADOS, DISCUSIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS ...	31
3.1	Información de la etiqueta de los productos analizados	31
3.1.1	<i>Etiquetado semafórico e información nutricional</i>	32
3.2	Resultados del análisis microbiológico de leches fermentadas y bebida láctea fermentada	33
3.2.1	<i>Recuento de aerobios mesófilos</i>	33
3.2.2	<i>Recuento de coliformes totales y Escherichia coli</i>	34
3.2.3	<i>Recuento de Staphylococcus aureus</i>	35
3.2.4	<i>Recuento de mohos y levaduras</i>	36
3.3	Resultado de recuento de bacterias ácido lácticas	37
3.4	Resultado de pruebas bioquímicas para comprobación de BAL	39
3.4.1	<i>Resultado de pruebas de tinción Gram, catalasa y oxidasa</i>	39

3.4.2	<i>Resultado de la evaluación del efecto de bacterias ácido lácticas de yogur, sobre población de Escherichia coli ATCC 25922</i>	40
3.4.2.1	<i>Resultado de recuento de Escherichia coli</i>	40
3.4.2.2	<i>Resultado de recuento de medición de pH</i>	41
3.4.2.3	<i>Resultado de recuento de BAL en agar MRS</i>	42
3.4.2.4	<i>Resultado de recuento de BAL en agar M17</i>	44
3.5	Resultados del análisis físico químico de leches fermentadas y bebidas lácteas	45
3.5.1	<i>Resultado de medición de pH</i>	45
3.5.2	<i>Resultado de medición de actividad de agua</i>	46
3.5.3	<i>Resultado de medición de porcentaje de humedad por método de desecación en estufa de aire caliente</i>	47
3.5.4	<i>Resultado de análisis de porcentaje de cenizas</i>	48
3.5.5	<i>Resultado de análisis de contenido graso</i>	49
3.5.6	<i>Resultado de análisis de proteínas</i>	49
	CONCLUSIONES	51
	RECOMENDACIONES	52
	BIBLIOGRAFÍA	
	ANEXOS	

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1-1: Requisitos microbiológicos en leches fermentadas sin tratamiento térmico posterior a la fermentación	9
Tabla 2-1: Requisitos microbiológicos para la bebida láctea pasteurizada	9
Tabla 3-1: Bacterias ácido lácticas usadas en la elaboración de productos lácteos	13
Tabla 1-2: Materiales, equipos, reactivos usados en los análisis microbiológicos	20
Tabla 2-2: Medios de Cultivo	21
Tabla 3-2: Lugares de muestreo y códigos de las muestras de yogur	22
Tabla 4-2: Lugar de muestreo de bebida láctea y su marca	22
Tabla 5-2: Condiciones de crecimiento en placas petrifilm	24
Tabla 6-2: Condiciones de crecimiento microbiano en placas petrifilm	24
Tabla 1-3: Información de la etiqueta de los productos analizados	31
Tabla 2-3: Etiquetado semafórico e información nutricional de los productos analizados...	32
Tabla 3-3: Resultados de recuento de microorganismos aerobios mesófilos de leches fermentadas y bebida láctea.....	33
Tabla 4-3: Resultados del recuento de coliformes y <i>Escherichia coli</i> de leches fermentadas y bebida láctea	34
Tabla 5-3: Resultados del recuento de <i>Staphylococcus aureus</i> de leches fermentadas y bebida láctea.....	36
Tabla 6-3: Resultados del recuento de mohos y levaduras de leches fermentadas y bebidas lácteas.....	37
Tabla 7-3: Recuento de bacterias ácido lácticas en MRS y M17.....	38
Tabla 8-3: Resultado de pruebas de tinción Gram, catalasa y oxidasa	39
Tabla 9-3: Resultado de recuento de <i>Escherichia coli</i> durante el tiempo de vida útil de los productos.....	40

Tabla 10-3: Resultado de medición de pH durante el tiempo de vida útil de los productos.....	41
Tabla 11-3: Resultado de recuento de bacterias ácido lácticas en agar MRS.....	43
Tabla 12-3: Resultado del recuento de bacterias ácido lácticas en agar M17 durante el tiempo de vida útil de cada producto.....	44
Tabla 13-3: Resultado de medición de pH de leches fermentadas y bebida láctea.....	46
Tabla 14-3: Resultado de medición de actividad de agua de leches fermentadas y bebidas lácteas.....	46
Tabla 15-3: Resultado de medición de porcentaje de humedad por método de desecación en estufa de aire caliente de leches fermentadas y bebidas lácteas.....	47
Tabla 16-3: Resultado de análisis de porcentaje de cenizas de leches fermentadas y bebidas lácteas.....	48
Tabla 17-3: Resultado de análisis de contenido graso	49
Tabla 18-3: Resultado de análisis de proteínas.....	49

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1-1: Esquema general de la función de los probióticos	17
Gráfico 1-3: Resultados de recuento de <i>E. coli</i> en el tiempo de vida útil	41
Gráfico 2-3: Resultados de medición de pH durante el tiempo de vida útil de los productos	42
Gráfico 3-3: Recuento de bacterias ácido lácticas en agar MRS durante el tiempo de vida útil de los productos	43
Gráfico 4-3: Resultado del recuento de bacterias ácido lácticas en agar M17 durante el tiempo de vida útil de cada producto	45

RESUMEN

Se realizó la verificación del cumplimiento de los requisitos según norma NTE INEN 2395:2011 y NTE INEN 2564:2011 en yogures y bebidas lácteas envasados en fundas de polietileno de baja densidad, comercializados en bares escolares de las unidades educativas públicas de la ciudad de Riobamba. Las muestras fueron tomadas en las 5 Unidades Educativas con mayor número de estudiantes, analizándose 6 muestras de yogur y 1 muestra de bebida láctea, de 4 marcas. Se realizaron recuentos microbiológicos de indicadores de calidad: coliformes, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, mohos, levaduras y aerobios mesófilos utilizando placas Petrifilm. Se realizó el aislamiento y recuento de bacterias ácido lácticas (BAL) mediante los medios de cultivo selectivos MRS y M17, y la confirmación fue a través de la reacción de catalasa, oxidasa y tinción de Gram, además, se realizaron análisis fisicoquímicos. Según los resultados obtenidos, los yogures y la bebida láctea si cumplen con los requisitos microbiológicos de calidad de las normas correspondientes. El recuento de BAL fueron altos en el yogur de “C1L.F” que declara tener probióticos presentando un recuento alto de BAL, la bebida láctea muestra un número bajo de BAL. Las pruebas confirmativas evidencian bajo porcentaje de bacilos y alto en cocos, adicionalmente se realizó la evaluación progresiva del efecto de las BAL sobre una población de *Escherichia coli* mediante el recuento y mediciones progresivas de pH en el transcurso de 20 días, considerando la vida útil de los productos, concluyendo que las BAL son responsables de la inhibición en el crecimiento de la *E.coli* confirmando su efecto antagónico. Los dos productos cumplen con lo establecido en las normativas, pero no cumplen con la información nutricional que reportan en los etiquetados, se recomienda dar a conocer a los responsables del expendio de estos productos para controlar la publicidad asegurando la salud del consumidor.

PALABRAS CLAVE: <BIOQUÍMICA> MICROBIOLOGÍA <LECHES FERMENTADAS>
<BEBIDA LÁCTEA> <MEDIO DE CULTIVO SELECTIVO> <INDICADORES DE CALIDAD> <BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS> <ANTAGÓNICO>

SUMMARY

The verification of the fulfillment of the requirements according to NTE INEN 2395:2011 and NTE INEN 2564:2011 in yogurts and milk beverages packaged in low-density polyethylene covers, commercialized in school bars of the public educational units of the city of Riobamba was carried out. The samples were taken in the 5 Educational Units with the most significant number of students, analyzing 6 samples of yogurt and 1 sample of milk drink, from 4 brands. Microbiological counts of quality indicators made: coliforms, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, molds, yeasts and mesophilic aerobes using Petrifilm plates. Isolation and counting of lactic acid bacteria (LAB) was carried out through selective culture media MRS and M17, and the confirmation was through the reaction of catalase, oxidase, and Gram stain. Besides, the physicochemical analysis was carried out. According to the results obtained, the yogurts and the milk drink if they meet the microbiological analysis quality requirements of the corresponding standards. The LAB count was high in the yogurt of “C1.L.F” which declares to have prebiotics presenting a high count LAB, the milk drink shows a low number of LAB the confirmatory test show the low percentage of bacilli and high in cocci. Additionally, the continuous evaluation of the effect of the LAB on a population of *Escherichia coli* was made by counting and serial measurements of pH over the course of 20 days, considering the shelf life of the products. Concluding that the LAB are responsible for the inhibition in the growth of the *E. coli* confirming its antagonistic effect. The two products comply with the provisions of the regulations but do not comply with the nutritional information reported in the labeling; it is recommended to inform those responsible for the sale of these products to control advertising ensuring the health of the consumer.

KEY WORDS: <BIOCHEMISTRY> <MICROBIOLOGY> <FERMENTADED MILK> <MILK DRINK> <SELECTIVE GROWING MEDIUM> <QUALITY INDICATORS> <LACTIC ACID BACTERIA> <ANTAGONISTIC>

INTRODUCCIÓN

La nutrición para niños se basa en los mismos principios que la nutrición para adultos. Todos necesitan los mismos tipos de nutrientes, como vitaminas, minerales, hidratos de carbono, proteínas y grasa. Sin embargo, los niños necesitan diferentes cantidades de nutrientes específicos según las diferentes edades.

En la actualidad el consumo lácteo y sus derivados en la población infantil, es en especial el yogur, es uno de los alimentos con las características de la dieta cotidiana de la población infantil, hacen parte de una alimentación equilibrada, dado que proveen al organismo macro y micro nutrientes que son necesario para el crecimiento y adecuado desarrollo, sin descartar que esta población es doblemente vulnerable a presentar desequilibrios nutricionales, y enfermedades por el consumo de alimentos mal elaborados.

La calidad microbiológica y la seguridad del yogur comienzan con la leche, por su abundancia de nutrientes y pH ácido, la leche sirve como un medio de crecimiento excelente para microorganismos beneficiosos como las bacterias ácido lácticas. Aunque, también permite el desarrollo de microorganismos contaminantes, asociados con el deterioro y defectos, causando enfermedades para los seres humanos.

Hoy en día el yogur y las bebidas lácteas como subproducto de la leche es consumido mayormente por la población infantil, siendo un alimento básico y de excelencia por su composición alta en proteínas, grasas y vitaminas, por la variedad de sabores que existen en el mercado y por su bajo costo. La leche utilizada para la fabricación del yogur, debe cumplir con los requisitos de la Norma NTE INEN 10, y de la misma forma el yogur y las bebidas lácteas deben cumplir con los requisitos NTE INEN 2395 y NTE INEN 2564 respectivamente, y su procesamiento se realizará de acuerdo a los principios del Reglamento de Buenas Prácticas de Manufactura del Ministerio de Salud Pública.

La FAO en el 2010 realza la importancia que posee el consumo de leche, en la población infantil de todo el mundo, como uno de los pilares básicos de una alimentación completa, suficiente y armónica (FAO,2000). En el Ecuador, el Plan Nacional del Buen Vivir, mediante el objetivo número 3 busca “mejorar la calidad de vida de la población”; en concordancia con la FAO, se puede tener una idea, ya que al ser un país en el cual el sector lácteo es muy explotado, crea una necesidad de analizar la calidad de los yogures que son consumidos por la población infantil, considerando que Ecuador es un país en el que el sector lácteo es muy explotado.

El Ministerio de Salud pública del Ecuador indica que según estadísticas registradas existen más de 10000 casos de intoxicaciones producidas por alimentos contando también las enfermedades transmitidas mediante alimentos (ETAS) siendo uno de los principales problemas de salud a nivel mundial y principal causa de reducción en el crecimiento de la seguridad alimentaria; sin embargo es necesario la evaluación periódica de los alimentos mayormente consumidos por la población infantil siendo esta la más vulnerable a tener este tipo de enfermedades, además que en la Ley Orgánica de Régimen de Soberanía Alimentaria (2010) en el Art. 9 establece que “El Estado asegurará y desarrollará la investigación científica y tecnológica en materia agroalimentaria, que tendrá por objeto mejorar la calidad nutricional de los alimentos, la productividad, la sanidad alimentaria, así como proteger y enriquecer la agrobiodiversidad”.

Ecuador es un país con gran diversidad en culturas, climas, etnias que confluyen en un entorno único para la elaboración de muchos productos como el yogur elaborado industrialmente. Por lo cual es importante realizar una evaluación microbiológica comparativa orientada al control de calidad, en base al recuento de microorganismos indicadores. Dentro de la evaluación microbiológica del yogur, también es importante evaluar el contenido de bacterias ácido lácticas por medio del recuento, asilamiento y selección para una posible identificación en base a sus características morfológicas.

OBJETIVOS

Objetivo General

Verificar el nivel de cumplimiento de los requisitos según Norma Inen NTE INEN 2395:2011 y NTE INEN 2564:2011 en yogures y bebidas lácteas envasados en fundas de polietileno de baja densidad, comercializados en bares escolares de las Unidades Educativas públicas de la ciudad de Riobamba

Objetivos Específicos

Realizar el análisis microbiológico de calidad sanitaria de los yogures y bebida láctea comercializados en bares escolares de las Unidades Educativas públicas de la ciudad de Riobamba.

Determinar las características físico químicas del yogur y la bebida láctea. (pH, actividad de agua, %de humedad, %de cenizas, contenido graso y proteínas).

Realizar el recuento de los microorganismos correspondientes al cultivo específico en agar MRS Y M17.

Confirmar las bacterias ácido lácticas por actividad de catalasa, oxidasa y tinción Gram.

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO REFERENCIAL

1.1 Fundamentación teórica y conceptual

1.1.1 Leche

La leche es la materia prima utilizada en la fabricación de todos los productos lácteos y principal ingrediente en la elaboración del yogur, según la norma NTE INEN 010:2012 es aquella que no ha sufrido ningún tipo de tratamiento térmico luego de su ordeño directo de la ubre y la temperatura no ha superado los 40°C (NTE INEN 010 2012).

1.2 Leches fermentadas

Llamamos leche fermentada porque ha sufrido un proceso de fermentación gracias a la acción de los microorganismos adecuados que se adicionan en el proceso de elaboración del producto que hacen que el pH disminuya dándole las características necesarias para ser un yogur. Estos microorganismos que son adicionados en el proceso deben encontrarse en abundancia durante todo el tiempo de vida útil del producto y a la vez ser viables y activos como *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *Sreptococcus salivaris* subsp. *thermophilus*, pudiendo estar acompañadas de otras bacterias benéficas que por su actividad le confieren las características al producto terminado, favoreciendo a la fermentación del producto y a la salud del consumidor (González et al. 2014).

La producción moderna de yogur implica un proceso bien controlado donde se utilizan ingredientes como leche, leche en polvo, azúcar, frutas, esencias, colorantes, estabilizantes y cultivos específicos de bacterias ácido lácticas. En muchos yogures comerciales se regula el contenido de sólidos de 14 a 15 % con la finalidad de incrementar la viscosidad y reducir la separación de suero (Fuentes y Villeda, 2015).

1.2.1 Clasificación de leches fermentadas

Las leches fermentadas se clasifican según su tipo de fermentación o la aplicación del tratamiento térmico después de la fermentación, por ende, en la actualidad existe una gran oferta y variedad de estos productos de distintas marcas, sabores y añadidos.

1.2.1.1 Kéfir

Es un producto lácteo que ha sido fermentado con cultivos ácido lácticos y por un conjunto de levaduras provenientes de granos de kéfir. Los granos de kéfir están compuestos por microorganismos tales como levaduras fermentadoras de lactosa (*Kluyveromyces marxianus*) y levaduras no fermentadoras de lactosa (*Saccharomyces omnisporus*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Saccharomyces exiguus*), *Lactobacillus casei*, *Bifidobacterium* sp y *Streptococcus salivarius* subs. *Thermophilus*, y por *Lactobacillus kéfir*, especies de géneros *Leuconostoc*, *Lactococcus* y *Acetobacter*. El kéfir transforma a la lactosa de la leche en ácido láctico por medio de la reacción alcohólica ya que en este proceso además de ácido láctico también produce dióxido de carbono y alcohol (Madrid, 1990).

1.2.1.2 Kumis

Es una leche fermentada gracias a la acción de *Lactococcus lactis subsp cremoris* y *Lactococcus Lactis subsp lactis* incorporadas en su elaboración, mismos deben ser viables y activos en el producto terminado hasta el final de su vida útil, al igual que el kéfir son productores de ácido láctico, dióxido de carbón o y alcohol por lo que utilizan la vía de reacción alcohólica para su fermentación (Pérez et al. 2014).

1.2.1.3 Leche cultivada, o acidificada

Según la norma NTE INEN 2395: 2011 especifica que las leches acidificadas son un tipo de leche fermentada gracias a la acción de microorganismos fermentadores como *Lactobacillus acidophilus* o *Bifidobacterium* sp que han sido inoculadas en la elaboración del producto , dichos cultivos lácticos deben ser activos durante todo el tiempo de vida útil (NTE INEN 2395 2011).

1.2.1.4 Leche fermentada con ingredientes

Es un producto lácteo al que se le adicionado un producto no lácteo como frutas, vegetales, o verduras, jugos, preparados, conservantes, miel, aromatizantes, frutos secos, especias y

saborizantes mismos que son añadidos antes o después de la fermentación con un cultivo de bacterias ácido lácticas (NTE INEN 2395, 2011).

1.2.1.5 Leche fermentada concentrada

Según el Codex Stan 243-2003 es un yogur en el que su proteína ha sido aumentada en un 5.6%, en la que, si está permitido retirar el suero después de la fermentación y a la vez se le puede incluir productos como Labneh, Ymer e Ylette (Huginin 2011).

1.2.1.6 Leche fermentada adicionada con microorganismos probióticos

Leche fermentada o yogur mismo que ha sido incorporado bacterias vivas probióticas que aumentan el valor terapéutico del mismo a la vez que tiene múltiples beneficios para la salud y microflora intestinal del consumidor (NTE INEN 2395 2011).

1.2.2 Importancia nutricional del yogur

Las leches fermentadas son productos de gran valor nutricional. Su composición, similar en general a la de la leche de partida, difiere de ésta debido a la adición de distintos ingredientes y al proceso fermentativo. El valor nutritivo de la fracción proteica, así como la asimilación de la lactosa mejoran debido a la fermentación, que aumenta su digestibilidad, y la materia grasa, aunque muy influida por la leche de partida, también varía en función de las especies bacterianas fermentativas.

La acción sobre el sistema digestivo convierte al yogur en una auténtica defensa natural contra todo tipo de infecciones y enfermedades. Además, reduce el colesterol y permite absorber las grasas mucho más fácilmente, además de equilibrar el intestino, controlando los posibles casos de diarrea y estreñimiento. También minimiza los efectos negativos de los antibióticos y protege el estómago de la erosión que producen ciertos medicamentos.

El yogur es un alimento apropiado para todas las edades por su valor nutricional. Entre sus principales virtudes destaca su efecto beneficioso sobre nuestra flora intestinal. La buena salud está muy relacionada con la buena digestión. También resulta particularmente beneficioso tras la toma de antibióticos.

1.2.2.1 Carbohidratos disponibles

Son los nutrientes que nuestro cuerpo puede asimilar, los mismos que representan la principal fuente de energía para el ser humano.

El yogur contiene diversos mono y disacáridos, pero al contener lactosa este es el azúcar dominante incluso después de la fermentación, la tolerancia de la lactosa en yogur es mucho mayor, en comparación a la leche, gracias a que sus fermentos lácticos logran transformar la lactosa en ácido láctico, lo que ayuda a mejorar la digestión de la lactosa (Mora et al., 2005).

1.2.2.2 Proteínas

El yogur contiene un alto contenido de proteínas ya que en su elaboración un ingrediente importante es la leche en polvo, dando un elevado valor biológico y tanto las caseínas como las proteínas del lactosuero tienen una concentración alta de aminoácidos esenciales. La caseína en el yogur se presenta de forma descalcificada, formando micelas llegando a un pH de 4,6 siendo las proteínas resistentes al medio gástrico y llegan mejor a los lugares de acción enzimática (Mora et al., 2005).

1.2.2.3 Lípidos

Gracias a los lípidos se logra tener mejor viscosidad, textura y apariencia además que son de gran ayuda para evitar la aparición de sinéresis. Según el Codex Alimentarius especifica un contenido de grasa mínimo de 3% para el producto entero y menor de 0,5% para el yogur descremado. Los lípidos no son grasas malas, si no que ayudan a mantener una dieta equilibrada y son una fuente de energía y protectores de órganos vitales, además que al juntarse con las proteínas forman una membrana celular muy importante para el cerebro (Rodríguez, Alcalá et al. 2011).

1.2.2.4 Vitaminas y minerales

El yogur es una verdadera fuente de vitaminas, entre las que se encuentran la riboflavina (B2) y la cianocobalamina (B12). Es por ello, que el consumo cotidiano de yogur aporta el nivel de ingesta diaria recomendada de vitamina B2 para el organismo del niño. En el proceso de fermentación se produce una alteración de las vitaminas B1 y B2 y una pérdida de vitaminas B12 y C, produciendo la formación de ácido fólico. En este punto de la elaboración, la composición mineral permanece estable. Se ha determinado que el contenido de vitaminas en el yogur relacionado con el contenido de vitaminas de la leche cruda depende mayoritariamente, de los procesos de fortificación y de elaboración (Pérez et al. 2014).

1.3 Bebidas lácteas

Es el producto obtenido a partir de la leche que en su composición tiene de 30% leche en el producto final y está acompañada de otros componentes alimentarios permitidos incluido nutrientes, la proteína que contenta la bebida láctea debe provenir de la leche y suero con la que se elabora, además las bebidas lácteas pueden encontrarse líquida lista para el consumo o en polvo para reconstituirla con agua o un líquido apropiado, antes de ser consumido (García y Pacheco-Delahaye 2010).

1.3.1 Clasificación de bebidas lácteas

Al igual que las leches fermentadas las bebidas lácteas por su composición se clasifican en lo siguiente:

1.3.1.1 Bebida láctea con suero de leche

Es un producto lácteo en el que se ha utilizado la leche como materia prima y a la vez que ha sido reconstituida con adición de suero de la leche en mayor proporción, ya que el mismo presenta un 55% de nutrientes, vitaminas y minerales totales de la leche. El suero es obtenido gracias a la elaboración del queso después de la coagulación de la leche mediante la adición de enzimas del tipo cuajo (NTE INEN 2564 2011).

1.3.1.2 Bebida láctea compuesta

Es un producto lácteo que no ha sido acondicionado suero de la leche, en el cual la leche o sus constituyentes son una parte esencial en el producto final tal como se consume, donde los constituyentes no son derivados lácteos (NTE INEN 2564 2011).

1.4 Microbiología de las leches fermentadas y bebidas lácteas

Una de las ramas de gran importancia para la industria láctea es la microbiología ya que de esta depende netamente la actividad de los microorganismos y su capacidad para alterar la composición y características de un producto o a la vez por microorganismos que puedan causar enfermedades al consumidor, ya que la materia prima que es la leche puede contaminarse por bacterias patógenas o por sus toxinas, pero también existen microorganismos (García et al., 2007).

Requisitos microbiológicos de las leches fermentadas

En la norma NTE INEN 2395 para leches fermentadas se establece requisitos microbiológicos que guardan relación con la calidad del producto cuando no ha recibido tratamiento térmico luego de la fermentación.

Tabla 1-1: Requisitos microbiológicos en leches fermentadas sin tratamiento térmico posterior a la fermentación

Requisito	n	m	M	c	Método de ensayo
Coliformes totales, UFC/g	5	10	100	2	NTE INEN 1529-7
Recuento de <i>E coli</i> , UFC/g	5	<1	-	0	NTE INEN 1592-8
Recuento de mohos y levaduras, UFC/g	5	200	500	2	NTE INEN 1529-10

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

Fuente: (NTE INEN 2395 2011).

Realizado por: Lizbeth Aguirre, 2018

Requisitos microbiológicos de las bebidas lácteas

En la norma NTE INEN 2564 para bebidas lácteas se establece requisitos microbiológicos que guardan relación con la calidad del producto cuando ha sido pasteurizada.

Tabla 2-1: Requisitos microbiológicos para la bebida láctea pasteurizada

Requisito	n	m	M	c	Método de ensayo
Recuento de microorganismos aerobios mesófilos, REP, UFC/cm ³	5	30000	50000	1	NTE INEN 1529-5
Recuento de coliformes, UFC/cm ³	5	<1	10	1	NTE INEN 1529-7
<i>Listeria monocytogenes</i> /25 g	5	ausencia	-	0	ISO11290-1
Recuento de <i>Escherichia coli</i> , UFC/g	5	<1	-	0	NTE INEN 1529-8

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

Fuente: (NTE INEN 2564 2011).

Realizado por: Lizbeth Aguirre, 2018

1.4.1 Microorganismos patógenos

Los microorganismos patógenos son organismos que evalúan el estado microbiológico en la producción de los alimentos y a la vez validan la efectividad de los tratamientos que han sido aplicados para disminuir la carga microbiana (Xanto y Saguescerpta 2014).

1.4.1.1 Coliformes totales

Son enterobacterias gramnegativas, tiene forma de bacilos (bastoncillo), aerobios y anaerobios facultativos, no esporulados, su principal característica es que fermentan lactosa con alta producción de ácido y gas en un periodo de 48 horas a 37°C. Dentro del grupo de coliformes totales se encuentra el subgrupo de coliformes fecales que también fermentan lactosa pero entre los 44 y 45°C (Silva et al. 2004).

La mayoría de estas bacterias se originan principalmente de forma natural en los intestinos de humanos, animales, suelos y agua, pero con mayor proporción en los intestinos de las personas la *E. coli*. En el análisis de bacterias coliformes en alimentos la presencia fuera del límite permisible en la normativa del Ecuador nos muestra que existió fallas en la producción del producto desde la recolección de la materia prima, uso de equipos insuficientemente limpios, errores en el proceso de pasteurización, hasta su envasado causando la contaminación con este tipo de bacterias (Silva et al. 2004).

1.4.1.2 Escherichia coli

Escherichia coli es una bacteria Gram negativa en forma de bacilo (bastoncillo), móvil, perteneciente a la familia de las enterobacterias, usual en el intestino del ser humano y de animales, donde algunas de sus cepas pueden causar una grave enfermedad de transmisión alimentaria, que generalmente es transmitida por consumo de agua o alimentos contaminados, como productos cárnicos poco cocidos y leche cruda (OMS 2010).

El ingreso de este microorganismo es desde la recolección de la leche, incluso ingresa en la leche ya pasteurizada y productos terminados por su gran capacidad de reproductividad y fácil transmisión, causando una infección que puede llegar a ser letal y está frecuentemente asociada a los más importantes y mejor documentados casos de enfermedades de transmisión alimentaria alrededor de todo el mundo, por esta razón en la normativa el número de *E. coli* debe ser menor a 1, sin embargo hay productos que no cumplen con lo que establece la norma indicando que el producto ha tenido algún tipo de contaminación (Reuben et al. 2003).

1.4.1.3 Staphylococcus aureus

S. aureus microorganismo Gram positivo, presenta forma de cocos y su reacción de catalasa es positiva, por producir enterotoxinas es el principal agente causante de enfermedades transmitidas por alimentos e intoxicaciones alimentarias, este se da por contaminaciones en el procesamiento de los productos alimenticios después de la pasteurización, la presencia elevada de este microorganismo también indica la mala manipulación o desinfección; sin embargo, no es evidencia suficiente para incriminar a un alimentos como la causa de la intoxicación alimentaria (Benkerroum, Oubel y Ben Mimoun 2002).

1.4.1.4 Mohos y Levaduras

Los mohos son hongos microscópicos que viven gracias a la descomposición de materia orgánica muerta y a la vez la causa importante en la alteración de los alimentos por la formación de micotoxinas que se generan debido a los hongos toxicogénicos, por otro lado las levaduras descomponen a los alimentos por medio de la fermentación y no causan un malestar en el humano (Curtis et al. 2000).

Los microorganismos necesitan presencia de agua para la mayoría de los procesos metabólicos, sin embargo debido a la excesiva humedad de la leche algunos mohos y levaduras se les dificulta la multiplicación de allí que sean considerados de mayor importancia en productos lácteos deshidratados que en leche fluida, es por ello que no tienen importancia en leche fluida, sino más bien en los quesos ya que causan el deterioro del producto y la presencia de olores desagradables y la destrucción de los empaques que los contienen (Ancasi et al. 2006).

Los mohos y levaduras pueden desarrollarse en las leches fermentadas a pesar su pH ácido y a su temperatura de refrigeración pero en muy baja proporción, la presencia de ellos que superen lo máximo permisible en la normativa indicarían deficiencias sanitarias en los procesos de fabricación y envasado (Curtis et al. 2000).

1.4.2 Microorganismos beneficiosos

Los microorganismos que están presentes en las leches fermentadas pueden ser añadidos al comienzo de la fabricación o pueden presentarse de forma natural desde la leche, estas son las bacterias ácido lácticas responsables de la fermentación de la leche, que utilizan la lactosa como

fuerza de energía y liberan ácido láctico dando como resultado el incremento de la acidez de tal modo que las proteínas de la leche precipiten y formen el yogur (Calderón et al. 2007).

1.4.2.1 Bacterias ácido lácticas

Las bacterias ácido lácticas (BAL) son un grupo de bacterias relacionadas y su principal metabolito es el ácido láctico, resaltan un papel importante en la fermentación de algunos derivados lácteos y en la industria alimentaria ya que tienen la capacidad de acidificar y conservar los alimentos preservándoles de las esporas y de otros microorganismos contaminantes, comprenden microorganismos de los géneros *Aerococcus*, *Alloicoccus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Weissella*. Dentro del phylum *Actinobacteria*, el género *Bifidobacterium* es el más importante (Ramírez, Ulloa y Velázquez 2011).

Las BAL se caracterizan por ser Gram positivas, catalasa negativa, anaerobias facultativas, no esporulantes, no móviles, ácido tolerantes y son capaces de fermentar azúcares en ácido láctico, por su heterogeneidad se presentan como cocos, cocobacilos, bacilos, en células individuales, parejas, tétradas, cadenas cortas o largas, son bacterias ácido tolerantes ya que soportan des pH de 3,2 hasta incluso pH de 9,6 y la mayoría crece a pH 4,5 (Vinderola 2014).

Las BAL por su acción conservadora inhiben un alto número de microorganismos patógenos que pueden causar un daño al producto y al consumidor, esta acción conservadora es por el ácido láctico y otros ácidos orgánicos producidos por estas bacterias, que reducen el pH del ambiente donde se encuentran y así causan un efecto inhibitorio en bacterias Gram positivas y Gram negativas, por ende la forma no disociada del ácido láctico penetra la pared microbiana donde el pH ácido del contenido celular promueve la disociación e interfiriendo en el metabolismo interrumpiendo el crecimiento celular (Morales, et al. 2009).

Las bacterias ácido lácticas tienen una gran capacidad de adaptarse a diversas condiciones por su metabolismo y hacen posible una adecuada fermentación en los alimentos, estas tienen distintas formas de realizar su fermentación como heterofermentativa facultativa, heterofermentativa obligada y homofermentativa obligada, siendo la última la esencial en la producción del ácido láctico mientras que las heterofermentativas obligadas y facultativas producen ácido acético, ácido fórmico, etanol y dióxido de carbono, utilizando la ruta de la pentosa fosfato (Tobía et al. 2003).

1.5.1 Géneros de BAL

Son varias las especies de bacterias ácido lácticas que se pueden encontrar en los productos lácteos siendo los más comunes *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium bifidum*.

Tabla 3-1: Bacterias ácido lácticas usadas en la elaboración de productos lácteos

Productos	Bacterias principales	Usos
Yogurt	<i>Lactobacillus bulgaricus</i> , <i>Lactobacillus casei</i> , <i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i> ,	Provee sabor, gusto suave y delicado y promueve la cuajada, mejora la digestión, absorción, contribuye a promover la salud
Bebidas fermentadas a base de leche	<i>Streptococcus lactis</i> , <i>Streptococcus cremoris</i> , <i>Lactobacillus hereticus</i>	Adiciona sabor, contribuye a promover la salud
Quesos	<i>Streptococcus lactis</i> , <i>Streptococcus diacetylactis</i>	Promueve el cuajado, provee aroma y sabor
Mantequilla madurada	<i>Lactobacillus lactis</i> , <i>Streptococcus diacetylactis</i>	Promueve moderado sabor agrio y aroma
Crema ácida	<i>Streptococcus lactis</i> , <i>Streptococcus cremoris</i> <i>Leuconostoc cremoris</i> <i>Streptococcus lactis ssp. diacetylactis</i>	Promover sabor característico (pequeñas cantidades de acetaldehído y grandes cantidades de diacetilo)
Yakult	<i>Lactobacillus casei</i>	Promueve moderado sabor agrio y aroma. Contribuye a promover la salud

Fuente: (Ramirez J. 2011)

Realizado por: Lizbeth Aguirre, 2018

1.5.1.1 *Lactobacillus*

Los *Lactobacillus* como su nombre lo indica se presentan en forma de bacilo y también pueden encontrarse como cocobacilos y se las observa de una forma organizada en cadenas, son tolerantes al oxígeno, pero crecen en condiciones anaeróbicas a una temperatura óptima entre los 30 y 40°C, aunque la temperatura de crecimiento general puede oscilar entre 2 y 53°C y a la vez crecen a un pH de entre 3 y 8. En la industria del yogur los principales *Lactobacillus* que se utilizan para la fermentación son *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus bulgaricus* (Glavina et al. 2012).

Lactobacillus acidophilus

Se puede encontrar formando parte de la flora normal de las mucosas corporales. Ésta especie es capaz de vivir en ambientes muy ácidos, hecho que le hace responsable de las etapas finales de la fermentación ya que a otros BAL no pueden soportar estas condiciones. Respecto a su metabolismo produce exclusivamente ácido láctico a partir de la lactosa (Glavina et al. 2012).

Lactobacillus bulgaricus

Fermenta la leche para producir acetaldehído provocando una bajada del pH que coagula la leche mediante la desnaturalización de sus proteínas y creando así el aroma característico de yogur. Estas bacterias crecen mejor en ambientes ácidos. Son utilizadas para producir diferentes tipos de yogur (Glavina et al. 2012).

1.5.1.2 *Streptococcus*

Los estreptococos se caracterizan por ser esféricas u ovoides, crecen en condiciones aeróbicas facultativas, algunas requieren dióxido de carbono adicional para el crecimiento. Son homofermentativos, por lo tanto, no producen dióxido de carbono a partir de la glucosa. La temperatura óptima de crecimiento es generalmente de alrededor de 37 °C, pero las temperaturas mínima y máxima de crecimiento pueden variar entre las especies. La especie representativa de este género a nivel industrial es *Streptococcus thermophilus*, que es usado como cultivo iniciador, además produce exopolisacáridos y compuestos que contribuyen al sabor. Se ha demostrado que *Streptococcus thermophilus* produce bacteriocinas (termofilinas), que son activas contra ciertos microbios de deterioro de lácteos (Mater et al. 2005).

Streptococcus thermophilus

Se encuentran en el aparato gastrointestinal humano y puede soportar altas temperaturas, ésta característica es una ventaja para la producción de yogur puesto que los procesos requieren llevar la leche a altas temperaturas. Entre las dos especies de bacterias del ácido láctico *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus* se establecen dos tipos de interacciones: protocoperación y antibiosis. *L. bulgaricus* libera péptidos y aminoácidos, mayormente valina, que sirven para mejorar el crecimiento de *S. thermophilus*, y este último mejora el crecimiento de *L. bulgaricus* con la formación de ácido fórmico a partir de ácido pirúvico en condiciones anaeróbicas (Mater et al. 2005).

1.5.2 **Relación entre estreptococos y lactobacilos que comprenden el cultivo definido del yogur**

La flora del yogurt está constituida por las bacterias lácticas termófilas *Streptococcus termophilus* y *Lactobacillus bulgaricus*. Para que el flavor se desarrolle satisfactoriamente, las dos bacterias deben encontrarse en un número aproximadamente igual. Entre ellas se establece un fenómeno de mutua estimulación del crecimiento (protocooperación). Las bacterias proteolíticas favorecen

el crecimiento de los estreptococos por formación de péptidos pequeños y aminoácidos, principalmente valina. La leche contiene muy poca cantidad de estos aminoácidos y los cocos que son muy poco proteolíticos, producen ácido muy lentamente. Los cocos potencian el desarrollo de los bacilos produciendo ácido fórmico a partir del ácido pirúvico en condiciones anaeróbicas y formando rápidamente CO₂ (Estrada 2007).

En el yogurt también hay un proceso de antibiosis, ya que los cocos no pueden seguir desarrollándose a partir del momento en que se alcanza una determinada acidez. Tanto los estreptococos como los lactobacillus tienen una importante contribución en la determinación de las propiedades del yogurt. Es preciso evaluar las características de las cepas bacterianas utilizadas, ya que no todas las combinaciones son compatibles (Glavina et al. 2012).

Además, ambas especies deben encontrarse en gran número en el producto y por lo tanto en el cultivo iniciador. La relación normalmente es de 1:1 esta relación se mantiene en el producto final. La proporción entre los dos microorganismos va cambiando inicialmente, los cocos crecen más deprisa debido a que los bacilos sintetizan factores de crecimiento y también como consecuencia de la adición de estos compuestos con el inóculo. Después el desarrollo de los cocos se hace más lento por el efecto del ácido producido mientras tanto los bacilos han empezado a crecer más rápidamente estimulados por los factores de crecimiento (CO₂ y ácido fórmico) producidos por los cocos (Mater et al. 2005).

Como resultado vuelve a establecerse la relación inicial y en ese momento el yogurt debería haber alcanzado la acidez deseada. Si la incubación se prolonga o el yogurt no se refrigera correctamente, los lactobacilos serán las bacterias predominantes. Actualmente, se utilizan los cultivos iniciadores concentrados, que garantizan la correcta composición bacteriana del starter (Estrada 2007).

1.5.2.1 Potencial de Streptococcus termophilus y Lactobacillus bulgaricus

La mayoría de los procesos de fermentación de alimentos implican cultivos mixtos en los que diferentes especies microbianas interactúan entre sí. Estas interacciones pueden tener efectos neutros, positivos o negativos según la capacidad de las cepas en realizar la fermentación, esta interacción es llamada mutualista ya que consta de las BAL, *Streptococcus termophilus* y *Lactobacillus bulgaricus* (Arioli et al. 2017).

En el yogur, las interacciones que se producen entre las dos especies de BAL se describe como un proceso protooperativo, que tiene efectos positivos sobre la tasa y el tamaño de crecimiento de cada población. Durante el crecimiento de estas especies en el yogur se describe la disponibilidad de nitrógeno, el intercambio de ácido fórmico, ácido pirúvico y ácido fólico, la producción y la utilización de dióxido de carbono, el metabolismo de purinas, ácidos grasos de cadena larga y hierro. La mayoría de estas interacciones descritas anteriormente son las interacciones tróficas en la que la especie se alimentan el uno al otro con piruvato, ácido fólico, ácidos grasos de cadena larga, ornitina, dióxido de carbono, péptidos, aminoácidos (Jones et al. 2012).

1.5.2.2 Actividad de *Streptococcus thermophilus* sobre *Lactobacillus bulgaricus*

S. thermophilus libera amoníaco y lo difunde dentro de las células de *L. bulgaricus* provocando un aumento en el pH haciéndolo más alcalino, provocando un descenso en el crecimiento de los lactobacilos e incapacitándolos para el transporte de amonio al interior de la célula, como consecuencia de la hidrólisis de la urea realizado por *S. thermophilus* llegan a afectar la fermentación homoláctica del mismo (Carrión, 2014).

Además, durante la fermentación de la leche, *S. thermophilus* y *L. bulgaricus* se enfrentan constantemente a cambios, estímulos y las tensiones ambientales, que pueden afectar la fisiología celular. Estos cambios ambientales previsible incluyen variaciones de pH, la limitación de la disponibilidad de nutrientes, y la acumulación de metabolitos tóxicos formados en el proceso de fermentación. La exposición a pH bajo por un largo período de tiempo provoca una detención del crecimiento, una reducción dramática de glucosa y una pérdida progresiva de la viabilidad (Carrión, 2014).

Actividad de ureasa, que es una reacción enzimática que se sabe que es una respuesta de estrés que se activa para contrarrestar pH del medio ambiente ácido en un número de bacterias, se describe como un potencial mecanismo regulador metabólico para el metabolismo energético en la bacteria láctea *S. thermophilus*. En *S. thermophilus*, ureasa aumenta el cambio general en la entalpía que se genera por microorganismos metabólicos como consecuencia del aumento de glucosa (Mora et al. 2005).

1.5.3 Probióticos en el yogur

Los probióticos están definidos como microorganismos vivos que, cuando son ingeridos en cantidades adecuadas, se espera que confieran beneficios de salud al anfitrión. En la práctica, las especies que pertenecen al grupo de bacterias productoras de ácido láctico, tales como el *Lactobacillus*, *Bifidobacterias*, *Leuconostoc* y *Pediococcus*, se utilizan más frecuentemente y tienen un largo historial de uso en alimentos fermentados, incluyendo al yogur (Pérez et al. 2012).

El interés por los probióticos y su uso en la industria de productos lácteos fermentados han aumentado en los últimos años, no sólo desde el punto de vista terapéutico, causando efectos beneficiosos en las personas que los ingieren, sino también como agente antagónico de agentes patógenos entéricos. Las bacterias probióticas son capaces de prevenir la adherencia, establecimiento, replicación y acción patogénica de enteropatógenos específicos en el intestino y en alimentos, ya sea provocando un descenso en el pH a través de la producción de ácidos orgánicos volátiles de cadena corta, interviniendo en la disponibilidad de nutrientes necesarios para los patógenos, disminuyendo el potencial de óxido reducción del medio o produciendo compuestos inhibitorios específicos, incluyendo bacteriocinas (Palencia Socarrás et al. 2005).

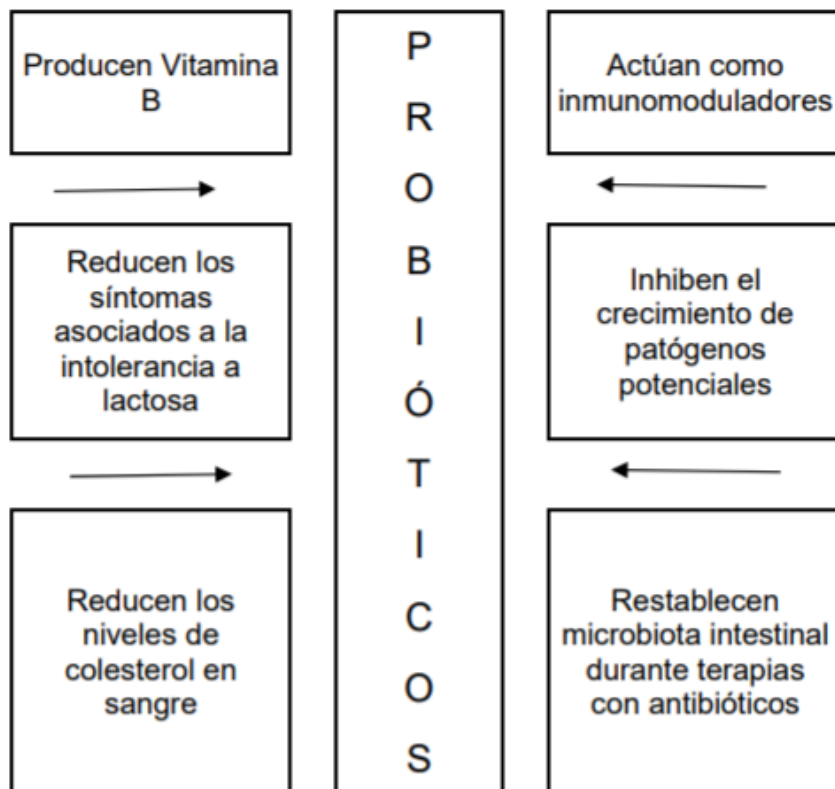


Figura 1-1: Esquema general de la función de los probióticos

Fuente: (Palencia Socarrás et al. 2005).

1.5.3.1 Potencial probiótico

Los probióticos son definidos como suplementos alimenticios conformados por microorganismos vivos, que una vez ingeridos, influyen beneficiosamente en la salud del consumidor al mejorar su equilibrio microbiano intestinal. Entre los géneros bacterianos utilizados para este fin se encuentran *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Bacillus*, *Streptococcus*, *Pediococcus* y *Enterococcus* (López Olmeda, de la Luz Santón y Urbanos Martínez 2006).

Los derivados lácteos constituyen los principales vehículos para el aporte de probióticos ya que, además de las propiedades funcionales de las bacterias inoculadas, son alimentos con gran aceptación en los distintos grupos de población y fáciles de digerir. Actualmente se encuentra disponible en el mercado una gran cantidad de productos alimenticios a los que se les atribuyen efectos bio o bifidus, que les confieren un gran atractivo comercial; no obstante, no siempre se especifica cuáles son realmente los compuestos bioactivos que contienen ni se definen con claridad los efectos beneficiosos que pueden ejercer sobre la salud (López Olmeda, de la Luz Santón y Urbanos Martínez 2006).

En cualquier producto probiótico se debe exigir la correcta identificación de las especies utilizadas. Esto requiere la aplicación no sólo de métodos microbiológicos convencionales de identificación, sino también de técnicas moleculares, ya que no siempre es sencillo resolver la posición taxonómica de las cepas probióticas (Ruiz Rivera y Ramírez Matheus 2009).

Los yogures y otras leches fermentadas son considerados vehículos adecuados para la incorporación de probióticos, a través de los cuales el consumidor recibe el número adecuado de bacterias probióticas. De forma generalizada se reconoce que son necesarios entre 1×10^7 y 1×10^9 células por ración, dependiendo de la cepa, para asegurar el efecto probiótico (Zapata, Sepúlveda-Valencia y Rojano 2015)

Así mismo la Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 2395:2011 indica que la cantidad de bacterias probióticas activas en leches fermentadas durante su vida útil debe ser como mínimo de 10^6 UFC/g, para el caso del género *Bifidobacterium* es necesario que el producto lácteo fermentado en el punto de venta tenga recuentos de 10^7 y 10^8 UFC/g para que de esta manera se asegure el nivel de 10^6 UFC/g en el producto al momento de su consumo (NTE INEN 2395 2011)

1.5.4 Legislación sobre el yogur

En cuanto a las declaraciones de propiedades saludables, en la mayoría de los países solo se permite declaraciones generales sobre los alimentos que contienen probióticos. La Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 1334-3:2011 sobre requisitos para declaraciones nutricionales y

declaraciones saludables, establece que solamente se podrá indicar que el consumo adecuado y regular de microorganismos probióticos no es el único factor para mejorar las funciones digestivas y que existen otros factores adicionales a considerar como el ejercicio físico y el tipo de dieta (NTE INEN 1334-3 2011).

En el informe sobre directrices para la evaluación de los probióticos en los alimentos del grupo de trabajo FAO/OMS, se recomienda que sean permitidas declaraciones específicas de propiedades saludables relacionadas al uso de probióticos, cuando se disponga de suficiente evidencia científica y que estas declaraciones específicas deberían ser permitidas en las etiquetas y en el material de promoción (FAO et al. 2006).

A nivel mundial, no todas las legislaciones sobre el yogur son uniformes, ni siquiera en los países de nuestro entorno. Así, nos encontramos con que existen dos posturas bien diferenciadas. La primera de ellas se basa en la consideración del yogur como alimento vivo cuya fermentación láctica se produce por la acción del *Lactobacillus bulgaricus* y el *Streptococcus thermophilus*. En este caso la diferencia con respecto a las leches fermentadas que han sufrido un tratamiento térmico posterior a la fermentación se delimita mediante la utilización de denominaciones como "postre lácteo", "especialidad láctea", "leche fermentada tratada térmicamente", "sobremesa láctea de larga duración", prohibiéndose cualquier referencia a la denominación "yogur". Los que defienden esta postura la fundamentan en el hecho de que la denominación de yogur tratado térmicamente u otra similar no es correcta ni fiable, porque ni técnica ni científicamente es demostrable que dicho producto proceda del yogur, y porque cualquier leche fermentada (con alguna excepción) tratada térmicamente tendría la misma composición (Simal 2008).

Es más, incluso manifiestan que podría obtenerse un producto similar sin la previa existencia de microorganismos de ningún tipo, simplemente mediante la adición de ácido láctico. La segunda posición se fundamenta en la utilización de la denominación "yogur", tanto para el yogur tradicional como para la leche fermentada que ha sufrido un tratamiento térmico. Los países afines a esta postura permiten la utilización de la denominación "yogur" para definir estos nuevos productos: "producto de yogur tratado térmicamente", "yogur pasteurizado después de la fermentación", "yogur de conservación prolongada por acción del calor", "yogur de larga vida", "yogur sometido a tratamiento UHT" (Simal 2008). Los partidarios de esta posición se basan en el hecho de que los avances tecnológicos en el ámbito alimentario no tienen porqué llevar a un cambio de denominación del producto cuando la composición química del mismo es igual en ambos casos, y tan sólo ha sido sometido a un proceso térmico o químico que le facilita su conservación a temperatura ambiente y lo hacen más duradero.

CAPÍTULO II

2. MARCO METODOLÓGICO

2.1 Lugar de Investigación

El trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Investigación grupo SAGID y en el Laboratorio de Bioquímica y Bromatología de la Facultad de Ciencias de la Escuela de Bioquímica y Farmacia.

2.2. Factores de Investigación

2.2.1 Población de estudio

Yogures con códigos “C1.L.F”, “C2.PC.M”, “C3.L.D”, “C3.Y.F”, “C4.L.F”, “C5.L.M” y bebida láctea marca “C1.P.F” expendidos en los bares de Unidades Educativas de la ciudad de Riobamba, todos contando con registro sanitario.

2.2.2 Muestra

Las muestras fueron recolectadas de forma aleatoria, adquiridas en 5 lugares de expendio (Unidades Educativas de la ciudad de Riobamba), siendo analizadas por duplicados y en cada muestreo por triplicado, además, el muestreo se lo realizó en cada día de realización del análisis.

2.3 Materiales, equipos y reactivos

Los materiales, equipos y reactivos utilizados durante la evaluación microbiológica y análisis físico- químicos se indican a continuación.

Tabla 1-2 Materiales, equipos, reactivos usados en los análisis microbiológicos.

	Asa de inoculación	Pipetas volumétricas de 10 mL
	Gel frío reutilizable	Piseta
	Caja térmica de poliestireno	Placas Monopetri
	Dispensor para placas Petrifilm	Placas porta y cubreobjetos

Materiales	Espátula	Probeta de 25, 100 mL
	Fundas estériles	Puntas para micropipeta 100 ul, 1000ul
	Gradillas	Toallas de papel blanco
	Lámpara de alcohol	Tubos de ensayo estériles
	Matraz de Erlenmeyer de 250, 500 mL	Papel aluminio
	Micropipeta de 500, 1000 ul	Pipeta graduada 1, 10 mL
	Vasos de precipitación 100, 250 mL	
Equipos	Autoclave	Incubadora Bacteriológica
	Balanza Analítica	Microscopio
	Cámara de Flujo Laminar	Refrigerador
	Cronómetro	Reverbero
	Baño maría	
Reactivos	Ácido acético 5M	Tiras de oxidasa
	Alcohol-cetona	Alcohol 72% y 96%
	Agua destilada	Cristal violeta
	Aceite de inmersión	Agua Peptonada
	Reactivo de Kovac	Acido Sulfúrico 0,18M
	Cloruro de bario 0,048M	

Realizado por: Lizbeth Aguirre, 2018

Tabla 2-2 Medios de Cultivo

Agar PCA	Placas 3M™ Petrifilm™ para recuento de <i>Staphylococcus aureus</i>
Agua peptonada	Placas 3M™ Petrifilm™ para recuento de <i>E. coli</i> /Coliformes
Agar MRS	Placas 3M™ Petrifilm™ para recuento de mohos y levaduras
Agar M17	

Realizado por: Lizbeth Aguirre, 2018

2.4 Técnicas y Métodos

2.4.1 Toma y transporte de muestras

Las muestras fueron recolectadas de cada Unidad Educativa el mismo día en que se realizó el análisis, para luego ser transportadas en cadena de frío hasta los laboratorios de análisis.

2.4.2 Muestreo de yogur

Se recolectaron las muestras de yogur de 5 Unidades Educativas de forma aleatoria como se muestra en la tabla 3-2.

Tabla 3-2 Lugares de muestreo y códigos de las muestras de yogur

Lugar de origen	Códigos	Contenido Neto	Lote
U.E “Riobamba”	C1.L.F	85 g	8-L18115
U.E “Chiriboga”	C2.PC.M	100 ml	-
U.E “Juan de Velasco”	C3.L.D	85 g	8-L18117
	C3.Y.F	100 ml	-
U.E “Cisneros”	C4.L.F	85 g	8-L18117
U.E “Maldonado”	C5.L.M	85 g	8-L18118

Realizado por: Lizbeth Aguirre, 2018

Las codificaciones significan lo siguiente:

C1= Unidad Educativa “Riobamba”

C2= Unidad Educativa “Chiriboga”

C3= Unidad Educativa “Juan de Velazco”

C4= Unidad Educativa “Cisneros”

C5= Unidad Educativa “Maldonado”

L, PC, Y, P= Marcas de yogures y bebidas lácteas

F= Fresa

M=Mora

D= Durazno

Además de las muestras que fueron de control

T= Marca del yogur; N= Sabor natural

E.L= Elaborado en laboratorio

2.4.3 Muestreo de bebidas lácteas

Se recolectó una sola muestra de bebida láctea en la Unidad Educativa “Riobamba”.

Tabla 4-2 Lugar de muestreo de bebida láctea y su marca

Lugar de origen	Marca de la muestra	Contenido Neto	Lote
U.E “Riobamba”	C1.P.F	50-80 ml	P018115

Realizado por: Lizbeth Aguirre, 2018

2.5 Análisis microbiológicos

2.5.1 Preparación de diluciones

Para la preparación de las diluciones de las muestras de yogur fue realizado de acuerdo a la norma NTE INEN 1529:2, en la que indica tomar 1 mL de muestra y colocarlo en un matraz Erlenmeyer conteniendo 9 mL de agua peptonada esterilizada (121°C a 1 ATM de presión por 15 minutos), agitar el matraz Erlenmeyer hasta su homogenización, siendo este la dilución 10-1 o solución madre, se transfirió 1 mL de la solución madre a un tubo de ensayo con 9 mL de agua peptonada, teniendo así la dilución 10-2. Se realizó el mismo procedimiento hasta obtener dilución 10-8. Las diluciones variaron de acuerdo al análisis que se realizó (NTE INEN 1529-2 1999).

2.5.2 Control de calidad

Para estos análisis se evaluaron indicadores de calidad, aerobios mesófilos, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y coliformes totales y mohos y levaduras.

2.5.2.1 Recuento de aerobios mesófilos

Procedimiento

Preparar medio de cultivo PCA para la cantidad de muestras a analizar, diluir con agua destilada y llevarla a hervor 3 veces, posteriormente esterilizar durante 15 minutos a 121°C a 1ATM de presión. Colocar 15 mL en cada caja monopetri y dejar solidificar.

Etiquetar las cajas monopetri y colocar 1 mL de la dilución requerida previamente preparada en el centro de la caja, mezclar cuidadosamente el inóculo con una espátula estéril. Dejar en reposo para luego incubarlas a 30°C ± 1°C de 48 a 75 h (NTE INEN 1529-5 2006)

Reporte de resultados

Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se realiza el recuento de las colonias visibles solo en aquellas colonias que tienen un número mayor a 15 y menor a 300, posteriormente se calcula en base al factor de dilución, y expresar los resultados en UFC/g (Unidades Formadoras de Colonias)

2.5.2.2 Recuento para bacterias indicadoras de calidad, coliformes, Escherichia coli, Staphylococcus aureus, mohos y levaduras

El recuento se lo realizó mediante la técnica de Petrifilm, AOAC 991.14 para *Escherichia coli*/coliformes, AOAC 2003.07 para *Staphylococcus aureus*, y AOAC 997.02 para mohos y levaduras.

Procedimiento

Etiquetar las placas petrifilm con el nombre de la muestra y la dilución usada, colocar la placa en una superficie plana o en cámara de flujo laminar. Levantar el film superior y colocar 1mL de muestra de forma perpendicular en el centro de la placa con ayuda de una micropipeta, bajar el film superior suavemente evitando la formación de burbujas de aire. Con ayuda del aplicador con la cara lisa abajo, presionar suavemente con la finalidad de distribuir la muestra en la superficie circular de la placa antes que se forme el gel. Retirar el aplicador y esperar 5 minutos hasta que se solidifique el gel de la petrifilm e incubar las placas caras arriba según el tiempo y temperatura para cada análisis como se indica en la tabla 5-2.

Tabla 5-2 Condiciones de crecimiento en placas petrifilm

Microorganismo	Temperatura de incubación	Tiempo de incubación
Coliformes	35°C ± 1° C	24h ± 2h
<i>Escherichia coli</i>	35°C ± 1° C	48h ± 2h
<i>Staphylococcus aureus</i>	37°C ± 1° C	24h ± 2h
Mohos y levaduras	21°C- 25°C	5 días

Realizado por: Lizbeth Aguirre, 2018

Reporte de resultados

Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se realiza el recuento de las colonias visibles según la guía de interpretación para cada microorganismo, posteriormente se calcula en base al factor de dilución, y se expresan los resultados en UFC/g (Unidades Formadoras de Colonias)

Tabla 6-2 Condiciones de crecimiento microbiano en placas petrifilm

Microrganismo	Características de crecimiento microbiano
Coliformes totales	Colonias rojas y azules con gas
<i>Escherichia coli</i>	Colonias azules con gas
<i>Staphylococcus aureus</i>	Colonias rojo violeta
Mohos	Colonias grandes sin límite definido el color varía
Levaduras	Colonias desde beige hasta rosa, o azul verdoso

Realizado por: Lizbeth Aguirre, 2018

2.5.3 Recuento de bacterias ácido lácticas (BAL)

Para realizar el recuento de BAL, por el método vertido en placa se lo hizo en medios de cultivo MRS Y M17 de acuerdo con la norma PRT-712.02-047 del Instituto de Salud Pública de Chile, y la Norma ISO 16068.

Preparación de los medios de cultivo

El agar de Man Rogosa Shape (MRS) de la marca Oxoid, establece la disolución de 62g en 1L de agua destilada, y la esterilización a 121° C por 15 minutos en la autoclave. El medio posee un pH final de 6.2 aproximadamente luego de su preparación. Con el objetivo de lograr mayor selectividad se ajustó el pH a 5.4 del medio con ácido acético 5M, antes de su esterilización.

El agar M17 de la marca Conda establece que para su preparación se diluye 55g en 1L de agua destilada. Las condiciones de esterilización son de 121°C por 15 minutos en el autoclave. El pH del medio es de 7.2 ± 0.2 , mismo que no necesita ser modificado ya que el medio es selectivo para el cultivo y enumeración de cocos lácticos en yogur.

Procedimiento

Se preparan diluciones seriadas de las muestras para ser sembradas en medios de cultivo selectivos. Depositar 1000 uL de la dilución requerida en placas petri estériles e inmediatamente verter aproximadamente 15mL de agar MRS. Mezclar el inóculo con el agar y dejar reposar hasta que solidifique. Luego colocar una capa de agar MRS usándolo como capa sellante dándole condiciones anaeróbicas. Incubar las placas a 37°C por 72 h. Se procede de manera similar para el recuento de BAL en agar M17, con la diferencia de que las placas se incuban a 32°C por 48h.

2.5.4 Pruebas bioquímicas para comprobación de BAL

2.5.4.1 Tinción de Gram

Sobre un portaobjetos se colocó una gota de agua destilada y con un asa de siembra tomar una parte de la colonia de la muestra a analizar, mezclar y fijar 3 veces a la flama. Cubrir con la solución de cristal de violeta durante 1 min y lavar ligeramente con chorro de agua, luego añadir la solución de yodo durante 1 min y lavar con agua. Con el portaobjetos inclinado, agregar gota a gota la solución de alcohol-cetona y lavar con agua. Finalmente cubrir con safranina de 10 a 20 segundos y lavar con agua (Fernandez et al. 2010).

2.5.4.2 Prueba de catalasa

Tomar con un asa de inoculación el centro de una colonia obtenida de un cultivo puro de 10 a 24 horas y colocar sobre un portaobjetos, agregar una gota de peróxido de hidrogeno al 30% sobre el cultivo y observar la inmediata formación de burbujas que indica la liberación de O₂, determinando la prueba como positiva. Se incluye un testigo negativo (Fernandez et al. 2010).

2.5.4.3 Prueba de oxidasa

Tomar una colonia con el asa de inoculación y depositarla sobre una tira de papel filtro y sobre la colonia colocar una gota de reactivo, la cepa es oxidasa positiva cuando hay un viraje del color blanco de la tira a morado, caso contrario se reporta como catalasa negativa (Fernandez et al. 2010).

2.5.5 Evaluación del efecto de bacterias ácido lácticas de yogur, sobre población de Escherichia coli ATCC 25922

Al evaluar el efecto de las bacterias ácido lácticas del yogur sobre una población de *Escherichia coli* en 5 tiempos diferentes cada 5 días durante el tiempo de vida útil de un yogur representativo de la población, una bebida láctea y el grupo control.

2.5.5.1 Yogurt

Se utilizó 4 yogures de diferentes marcas, dos yogures que declara cultivos probióticos (C2.L.F y T.N), uno sin alegación en el etiquetado (C1.P.F) y E.L. Los cuatro tipos de yogur eran pasteurizados y poseían bacterias ácido lácticas ya analizadas anteriormente.

Elaboración de yogur

Para la comprobación de la actividad de las BAL sobre la población patógena se elaboró un yogur artesanal realizado en laboratorio.

Procedimiento

Se tomaron 4 litros de leche cruda, y se esterilizó en el autoclave durante 15 minutos a 121°C a 1ATM de presión, una vez fría la materia prima se colocó 240 gramos de leche en polvo, agitando para su mezcla completa dentro de la cámara de flujo laminar, posteriormente se adicionó el

fermento láctico marca Danisco, que en su ficha técnica en el ANEXO G se encuentra la descripción de la composición, luego se debe mezclar cuidadosamente para no estresar a las bacterias inoculadas, después se dejó incubando el producto a baño maría durante 12 horas a 28°C, para acondicionar a las bacterias a una temperatura en la que puedan desarrollarse y realizar la fermentación de la leche.

2.5.5.2 Preparación de suspensión de Escherichia coli

Para realizar la suspensión se tomaron de 30 a 40 colonias de *E. coli* y se inoculó en 9mL de solución salina al 0.85%. Para conocer la concentración de *E.coli* se debe ir verificando con la escala 0.5 McFarland usando un espectrofotómetro a una longitud de onda de 625 nanómetros, misma concentración estuvo entre los 0.08 a 0.1 de absorbancia que es lo que indica la escala de McFarland con el fin de conocer la cantidad de UFC que estaremos inoculando a los yogures, indicando según la escala 0.5 que existen 10^8 UFC/mL.

2.5.5.3 Inoculación de E. coli en el yogur

Durante 1 sola ocasión se preparó una suspensión de 10^8 UFC/mL de la bacteria patógena. De la suspensión se tomó 12.5 mL para inocular en medio litro de cada yogur, para después almacenarlo en temperatura de refrigeración (4°C) durante 20 días el tiempo de vida útil de los yogures.

2.5.5.4 Medición de bacteria patógena y bacterias ácido lácticas

Para realizar el recuento de *E.coli* se realizó en el tiempo 0 siendo el primer momento en el que se inoculo la bacteria patógena, se usó un medio de diferenciación selectivo Agar MacConkey, y para las bacterias ácido lácticas agar MRS para bacilos y M17 para cocos.

Procedimiento de siembra en agar MacConkey

De cada uno de los yogures se realizó diluciones de 10^{-1} 10^{-3} 10^{-5} 10^{-7} y 10^{-8} , para ser sembradas en el medio de cultivo selectivo. Depositar aproximadamente 15mL de agar en placas petri estériles y luego con una pipeta de 100 uL inocular la dilución requerida en cada caja. Mezclar el inóculo con una espátula de vidrio previamente esterilizada. Incubar las placas a 35°C por 48 h. la siembra se realizó cada 5 días durante el tiempo de vida útil de los yogures

Procedimiento de siembra en agar MRS Y M17

Se procede de la misma forma que en el recuento de BAL anteriormente mencionado.

2.5.5.5 Medición de pH

Se realizó la medición de pH para los cuatro yogures con un pHmetro, cada 5 día en la determinación de las poblaciones bacterianas. Esta medición se realizó por triplicado y se utilizó el promedio de las mediciones para interpretar los resultados.

2.6 Análisis físico- químicos

2.6.1 pH

Para realizar la medición del pH, el equipo debe estar previamente calibrado, y se coloca en un vaso estéril 200 ml de muestra y se realiza la medición con el pH-metro, en cada repetición del ensayo se debe ir lavando el electrodo agua destilada y de igual manera al cambiar de muestra.

2.6.2 Actividad de agua

Para realizar la medición de actividad de agua se usó el equipo Aqualab, preparando a la muestra previamente llevándola a una temperatura ambiente, debido a que el equipo puede realizar su lectura con temperaturas entre 18 y 24 °C. Colocar la muestra en los envases propios del equipo y realizar la medición, luego de transcurrido unos minutos en la pantalla del equipo se revela el resultado en aw actividad de agua y temperatura.

2.6.3 Porcentaje de humedad por método de desecación en estufa de aire caliente

La determinación de la humedad es uno de los pasos obligatorios que se deben realizar en el análisis de todos los alimentos para conocer los cambios que el producto puede sufrir por la cantidad de agua presente.

Este método se basó en la medición de la pérdida de masa de la muestra desecada hasta masa constante llamándose materia seca.

Procedimiento

Se tara las cápsulas de porcelana colocándola en una estufa a 105°C por 4 horas pesándolas cada 30 minutos hasta obtener un peso constante, después pesar 5 gramos de las muestras de yogur en

las capsulas de porcelana ya taradas repartiendo la muestra uniformemente en la base de la cápsula, colocar todas las cápsulas con las muestras en la estufa a 105°C por 3 horas retirar de la estufa y enfriarlas en un desecador hasta llegar a una temperatura ambiente y pesarlal hasta obtener nuevamente un peso constante. La determinación se la realiza por triplicado

Reporte de resultados

Una vez obtenidos los datos se utilizó la siguiente ecuación para obtener los resultados:

Ec.1

$$SS (\%) = \{ (m2 - m) / (m1 - m) \} \times 100$$

Donde:

SS= sustancia seca en porcentaje en masa

m= masa de la cápsula en gramos

m1= masa de la cápsula con la muestra en g

m2= masa de la cápsula con la muestra después del calentamiento en g

Ec. 2

$$\% \text{ HUMEDAD} = 100 - \%SS$$

En la Ecuación 2 solo se reemplazará el porcentaje de la sustancia seca en masa para ser restado de 100 y obtener el porcentaje de humedad.

2.6.4 Porcentaje de cenizas

Las cenizas del yogur representan el residuo inorgánico resultado de la calcinación de la materia orgánica del alimento, la muestra debe ser calcinada en una mufla a 550°C para quemar toda la materia orgánica y que el residuo sea solo la materia inorgánica que no puede ser destruida a esta temperatura.

Procedimiento

Se coloca la cápsula con la muestra seca ya obtenida del resultado de humedad y sobre un reverbero se precalcina la muestra hasta que no exista la presencia de humo, este procedimiento se lo realiza dentro de una Sorbona, después se pasa la cápsula a una mufla a 550°C durante 3 horas hasta obtener cenizas de color blanco que estén libres de residuo carbonoso.

Retirar la cápsula de la mufla y pasarla a un desecador hasta que llegue a temperatura ambiente para después pesar la capsula. Todas las mediciones se las realiza por triplicado.

Reporte de resultados

Ya obtenido los datos de las mediciones de pesos de las cápsulas se utiliza la siguiente ecuación para obtener el % de cenizas.

Ec.3

$$\%C = \{ (m1 - m) / (m2 - m) \} \times 100$$

Donde:

%C= contenido de cenizas en porcentaje de masa

m= masa de la cápsula vacía en g

m1= masa de la cápsula con la muestra después de la incineración en g

m2= masa de la cápsula con la muestra antes de la incineración en g

2.6.5 Contenido graso

No se realizó la determinación de contenido graso dentro de los laboratorios de la facultad debido a que no cuenta con los reactivos y equipos necesarios, de tal manera que el análisis fue enviado a un laboratorio externo acreditado por SAE.

El análisis fue realizado por el laboratorio con el método oficial de referencia AOAC 20TH 952.06

2.6.6 Proteínas

No se realizó la determinación de proteínas de los laboratorios de la facultad debido a que no cuenta con los reactivos y equipos necesarios, de tal manera que el análisis fue enviado a un laboratorio externo acreditado por SAE.

El análisis fue realizado por el laboratorio n el método oficial de referencia AOAC 20TH 991.20

CAPÍTULO III

3. MARCO DE RESULTADOS, DISCUSIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

3.1 Información de la etiqueta de los productos analizados

La tabla 1-3 muestra la información del etiquetado de los productos objeto de análisis.

Tabla 1-3: Información de la etiqueta de los productos analizados

Código / Producto	Ingredientes	Lote	Alegación de probióticos	Fecha de elaboración	Fecha de caducidad
C1.P.F / Bebida láctea	Suero de leche, azúcar, gelatina, estabilizante (gelatina peptina, carragenina), conservante (sorbato de potasio) sabor a frutilla idéntico al natural, colorante natural rojo y fermento de yogur	P018115	No	21- Abril - 2018	21 – Mayo – 2018
C1.L.F / Leche fermentada	Leche semidescremada, suero de leche, azúcar, gelatina, estabilizante (gelatina peptina, carragenina), conservante (sorbato de potasio) sabor a frutilla idéntico al natural, colorante natural rojo carmín y fermento de yogurt	8- L18115	Sí	27-Abril - 2018	11- Junio - 2018
C2.PC.M / Leche fermentada	Leche semidescremada, jarabe de azúcar, fermento lácteo, gelatina, sorbato de portasio, sabor artificial a mora, colorantes artificiales (Rojo N°40, Azul N°1)	-	No	20 - Abril - 2018	20 – Junio - 2018
C3.L.D / Leche fermentada	Leche semidescremada, suero de leche, azúcar, gelatina, estabilizante (gelatina peptina, carragenina), conservante (sorbato de potasio) sabor a durazno idéntico al natural, colorante natural y fermento de yogurt	8- L18117	Sí	27-Abril - 2018	11- Junio - 2018
C3.Y.F / Leche fermentada	Leche entera, azúcar, sorbato de potasio (E211 conservante), saborizante artificial a frutilla, benzoato de sodio (E211 conservante), colorante natural	-	No	22- Abril - 2018	22 – Mayo - 2018

	carmín(E120), aspartame (E951 edulcorante), fermento láctico.				
C4.L.F / Leche fermentada	Leche semidescremada, suero de leche, azúcar, gelatina, estabilizante (gelatina peptina, carragenina), conservante (sorbato de potasio) sabor a frutilla idéntico al natural, colorante natural rojo carmín y fermento de yogurt	8- L18117	Sí	27-Abril - 2018	11- Junio - 2018
C5.L.M / Leche fermentada	Leche semidescremada, suero de leche, azúcar, gelatina, estabilizante (gelatina peptina, carragenina), conservante (sorbato de potasio) sabor a durazno idéntico al natural, colorante natural y fermento de yogurt	8- L18118	Si	30-Abril - 2018	14- Junio - 2018

Realizado por: Lizbeth Aguirre, 2018

Los productos analizados que contienen entre sus ingredientes *suero de leche* deben ser etiquetados como “BEBIDA LÁCTEA” de acuerdo con la norma NTE INEN 2564: 2011, ya que en la norma de leches fermentadas no está permitido el uso de este ingrediente.

3.1.1 Etiquetado semafórico e información nutricional

La tabla 2-3 se presenta la información de la composición de los productos analizados de acuerdo con lo que señalan en el etiquetado de sus envases, parámetros que serán comparados con los resultados de análisis físico químico que se presentan más adelante.

Tabla 2-3: Etiquetado semafórico e información nutricional de los productos analizados

		C1.P.F (Bebida láctea)	C1.L.F	C2.PC.M	C3.L.D	C3.Y.F	C4.L. F	C5.L.M
Etiquetado Semafórico	Azúcar	Medio	Medio	Medio	Medio	Medio	Medio	Medio
	Grasa	Medio	Medio	Medio	Medio	Medio	Medio	Medio
	Sal	Bajo	Bajo	Bajo	Bajo	Bajo	Bajo	Bajo
	Grasa total	2	2,5	5	2,5	6	2,5	2,5
	Colesterol	0,04	0,06	0,019	0,06	0,018	0,06	0,06
	Sodio	0,04	0,035	0,105	0,035	0,110	0,035	0,035

Información nutricional g/100g	Carbohidratos totales	6	6	16	6	21	6	6
	Proteína	3	3	8	3	8	3	3

Realizado por: Lizbeth Aguirre, 2018

3.2 Resultados del análisis microbiológico de leches fermentadas y bebida láctea fermentada

3.2.1 Recuento de aerobios mesófilos

La Tabla 3-3 reúne los resultados del análisis y recuento de aerobios mesófilos de leches fermentadas y bebida láctea de las muestras recolectadas

Tabla 3-3: Resultados de recuento de microorganismos aerobios mesófilos de leches fermentadas y bebida láctea

AEROBIOS MESÓFILOS		
CÓDIGOS DE MUESTRAS	UFC/ mL	LÍMITES MÁXIMOS PERMISIBLES UFC/g
C1.P.F (Bebida láctea)	< 10 ± 0	50000
C1.L.F	< 10 ± 0	N.E
C2.PC.M	40 x 10 ³ ± 5	
C3.L.D	< 10 ± 0	
C3.Y.F	21x 10 ² ± 3	
C4.L. F	< 10 ± 0	
C5.L.M	< 10 ± 0	
T.N	< 10 ± 0	
E.L	< 10 ± 0	
Leche cruda	25 X10 ⁵	1,5X10 ⁶

Realizado por: Lizbeth Aguirre, 2018

De acuerdo a esta tabla, en las leches fermentadas C.2PC.M, y C3.Y.F existe la presencia de aerobios mesófilos en comparación de las demás muestras que presentan ausencia de crecimiento; sin embargo, la norma NTE INEN 2395 no establece como requisito este análisis microbiológico, sin embargo se puede comparar con la norma para bebidas lácteas que indica máximo 1*10⁵ UFC/g, por tanto, todos los productos analizados cumplen con éste parámetro. Según Zalgado, el recuento y presencia de aerobios mesófilos en cantidades superiores a los límites permitidos se

debe a condiciones de fabricación, manejo, almacenamiento que no siguen normas de correctas de higiene.

A nivel industrial, en la elaboración de las leches fermentadas y bebidas lácteas se utiliza leche pasteurizada como materia prima de estos productos para asegurar que en la fermentación no exista contaminación y garantizar su efectividad dando como resultado productos de buena calidad microbiológica, lo que puede relacionarse con los resultados del recuento de aerobios mesófilos que son menores para los dos casos. El recuento de estas bacterias además de indicar la calidad microbiológica general de un producto lo relaciona con las prácticas de higiene de acuerdo al nivel de producción, pudiendo estar asociado con la prevalencia de microorganismos beneficiosos como las bacterias ácido lácticas que son inoculadas en el proceso de elaboración. Estos resultados se relacionan con los recuentos realizados en medios selectivos para bacterias ácido lácticas. Debe considerarse el establecimiento de un equilibrio entre la elaboración de productos lácteos que cumplan con los requisitos microbiológicos de calidad y su aporte de microorganismos beneficiosos como las BAL

3.2.2 Recuento de coliformes totales y *Escherichia coli*

La tabla 4-3 presenta los resultados del recuento de coliformes totales y *Escherichia coli*, expresados en UFC/g, y los límites máximos permisibles tanto para leches fermentadas y bebidas lácteas, considerando que la norma NTE INEN 2395 establece que para leches fermentadas su límite permisible debe ser 100 UFC/g para coliformes totales y ausencia de *Escherichia coli*, por otra parte la norma NTE INEN 2564 para bebidas lácteas establece 10 UFC/g para coliformes totales y ausencia de *Escherichia coli*.

Tabla 4-3: Resultados del recuento de coliformes y *Escherichia coli* de leches fermentadas y bebida láctea

CÓDIGOS DE MUESTRAS	E. coli		Coliformes	
	UFC/ mL	LÍMITES MÁXIMOS PERMISIBLES	UFC/ mL	LÍMITES MÁXIMOS PERMISIBLES
C1.P.F (Bebida láctea)	< 10 ± 0	10 UFC/g	< 10 ± 0	-
C1.L.F	< 10 ± 0		< 10 ± 0	
C2.PC.M	< 10 ± 0		< 10 ± 0	

		100 UFC/g		-
C3. L.D	$< 10 \pm 0$		$< 10 \pm 0$	
C3.Y.F	$< 10 \pm 0$		$< 10 \pm 0$	
C4.L. F	$< 10 \pm 0$		$< 10 \pm 0$	
C5.L.M	$< 10 \pm 0$		$< 10 \pm 0$	
T. N	$< 10 \pm 0$		$< 10 \pm 0$	
E.L	$< 10 \pm 0$		$< 10 \pm 0$	
Leche cruda	188 ± 0	N.E	$8 \times 10^1 \pm 0$	N.E

Realizado por: Lizbeth Aguirre, 2018

En el análisis de recuento de coliformes y *E. coli* se ha determinado que en las leches fermentadas y en bebidas lácteas hay ausencia de estos microorganismos, es decir cumplen con lo establecido en las normas NTE INEN 2395 y NTE INEN 2564, respectivamente. El análisis de coliformes y *E. coli* en la leche cruda como grupo control existe la presencia de coliformes y *E. coli*; al no contar con un límite permisible en la norma se establece que la presencia de estos microorganismos en la leche cruda son señales de prácticas sanitarias deficientes en la recolección y manejo de la leche que pueden relacionarse con la presencia de estos patógenos entéricos, el recuento de *Escherichia coli* permiten establecer que existe contaminación fecal dejando al consumidor expuesto a bacterias entéricas, cabe mencionar que el análisis de coliformes y *E. coli* para leche cruda se lo realizó para comprobar si la ausencia de crecimiento en leches fermentadas y bebida láctea se debió a alguna falla en el método usado para su detección.

La investigación realizada por Belaunzarán et al., sobre la caracterización de yogur firme elaborado con leche ovina, determinó que el producto final en cuanto a las características microbiológicas se obtuvo 1 UFC/g de *E. coli* debido a que este tipo de microorganismos no pueden crecer en un medio ácido como el del yogur; además, Calderón et al., en su estudio “Evaluación del efecto del cultivo probiótico *Lactobacillus rhamnosus* adicionado a yogurt natural y con probióticos comerciales sobre poblaciones de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* y *Salmonella enteritidis*”, resalta que las BAL producen un efecto antagónico sobre bacterias potencialmente patógenas para el ser humano y animales, debido a la acidez que generan.

3.2.3 Recuento de *Staphylococcus aureus*

La tabla 5-3 presenta los resultados obtenidos en el recuento de *S. aureus* en las muestras, reportándose en UFC/g, sin tener un referente de límite máximo permisible por no encontrarse en las normas de cada una de ellas.

Tabla 5-3: Resultados del recuento de *Staphylococcus aureus* de leches fermentadas y bebida láctea

<i>Staphylococcus aureus</i>		
CÓDIGOS DE MUESTRAS	UFC/ mL	LÍMITES MÁXIMOS PERMISIBLES
C1.P.F (Bebida láctea)	< 10 ± 0	N.E
C1.L.F	< 10 ± 0	
C2.PC.M	< 10 ± 0	
C3.L.D	< 10 ± 0	
C3.Y.F	< 10 ± 0	
C4.L. F	< 10 ± 0	
C5.L.M	< 10 ± 0	
T. N	< 10 ± 0	
E.L	< 10 ± 0	
Leche cruda	43 x10 ²	

Realizado por: Lizbeth Aguirre, 2018

En ningún muestreo hubo crecimiento de *S. aureus*, lo que indicaría un proceso higiénico de elaboración, por lo contrario en la leche cruda analizada como grupo control sí presentó crecimiento de este microorganismo indicando la existencia de condiciones de higiene inadecuadas en el proceso de recolección, pudiendo deberse a contaminación por transmisión humana, y también la presencia de *S. aureus* se encuentra principalmente en las manos de los manipuladores del alimento, siendo fundamental que su recolección también cuente con normas de correcta higiene.

Esta ausencia en las leches fermentadas y bebidas lácteas podría deberse a que *S. aureus* no resiste pH ácidos al que se fermentan estos productos es por ello de su ausencia, además Calderón indica que este tipo de bacterias son inhibidas en su crecimiento por acción de las BAL presentes en los yogures por realizar la fermentación a pH bajo y también la capacidad de producir componentes inhibitorios como el ácido láctico, diacetilo, acetaldehído, peróxido de hidrógeno, y bacteriocinas, pequeños péptidos con capacidad antimicrobiana.

3.2.4 Recuento de mohos y levaduras

La tabla 6-4 presenta los resultados del análisis de mohos y levaduras de las muestras y los límites máximos permisibles para leches fermentadas NTE INEN 2395 con un máximo de 500 UFC/g, y no para bebidas lácteas ya que no se establece un límite para este producto.

Tabla 6-3: Resultados del recuento de mohos y levaduras de leches fermentadas y bebidas lácteas

MARCAS	UFC/ mL	LÍMITES MÁXIMOS PERMISIBLES
C1.P.F (Bebida láctea)	< 10 ± 0	N.E
C1.L.F	< 10 ± 0	500 UFC/ g
C2.PC.M	< 10 ± 0	
C3.L.D	< 10 ± 0	
C3.Y.F	< 10 ± 0	
C4.L.F	< 10 ± 0	
C5.L.M	< 10 ± 0	
T.N	< 10 ± 0	
E.L	< 10 ± 0	
Leche cruda	< 10 ± 0	

Realizado por: Lizbeth Aguirre, 2018

En todas las muestras analizadas no existió crecimiento de mohos y levaduras, según Ramírez indica que este tipo de microorganismos se les imposibilita crecer a temperaturas bajas como son las de almacenamiento de estos productos a 4°C además de su inhibición en bajos pH al igual que *S. aureus* y *E.coli* la acción de las BAL responsables de la fermentación de la leche y por su producción de ácido láctico y otros componentes impiden el desarrollo y crecimiento de mohos y levaduras.

3.3 Resultado de recuento de bacterias ácido lácticas

La tabla 7-3 muestra los resultados del recuento de BAL realizado en medios de cultivo selectivo para bacilos MRS y para cocos M17. La NTE INEN 2395 para leches fermentadas establece que deberán cumplir con los requisitos del contenido mínimo del microorganismo específico siendo estos *Lactobacillus delbruekii* subsp. *bulgaricus* y *Streptococcus salivaris* subsp. *thermophilus*; *Lactobacillus acidophilus*, según sea el caso, es decir que toda leche fermentada debe contener como mínimo uno de los microorganismos mencionados y encontrarse entre los límites máximos permisibles.

Tabla 7-3: Recuento de bacterias ácido lácticas en MRS y M17

MARCAS	MRS UFC/ mL	M17 UFC/ mL	SUMA DE M.O DEL CULTIVO	LÍMITES MÁXIMOS PERMISIBLES
C1.P.F (Bebida láctea)	< 10 ± 0	13x 10 ^{8±2}	1,3x 10 ^{8 ± 2}	10 ⁷ UFC/ g
C1.L.F	< 10 ± 0	24x 10 ^{8±2}	24x 10 ^{8 ± 2}	
C2.PC.M	< 10 ± 0	22x 10 ^{8±2}	22x 10 ^{8 ± 2}	
C3.L.D	< 10 ± 0	22x 10 ^{8±2}	22x 10 ^{8 ± 2}	
C3.Y.F	< 10 ± 0	15x 10 ^{8±2}	15x 10 ^{8 ± 2}	
C4.L.F	< 10 ± 0	23x 10 ^{8±2}	23x 10 ^{8 ± 2}	
C5.L.M	< 10 ± 0	26x 10 ^{8±2}	26x 10 ^{8 ± 2}	

Realizado por: Lizbeth Aguirre, 2018

Las muestras analizadas no presentaron crecimiento en agar MRS indicado para bacilos, pero si crecimiento en agar M17 indicado para cocos, sumando valores mayores a los establecido en la norma, es decir si cumplen con los requisitos microbiológicos de la normativa ecuatoriana y también con el reglamento de la Comunidad Europea.

Estrada menciona en su estudio que la flora de las leches fermentadas y sus derivados están constituida por cocos y bacilos, además, ambas especies deben encontrarse en gran número en el producto y por lo tanto en el cultivo iniciador, la relación normalmente deberá ser de 1:1 y mantenerse en el producto final. Esta proporción entre los dos microorganismos va cambiando inicialmente, los cocos crecen más deprisa debido a que los bacilos sintetizan factores de crecimiento y también como consecuencia de la adición de estos compuestos con el inoculo. Después el desarrollo de los cocos se hace más lento por el efecto del ácido producido mientras tanto los bacilos han empezado a crecer más rápidamente estimulados por los factores de crecimiento (CO₂ y ácido fórmico) producidos por los cocos.

En estos productos también hay un proceso de antibiosis, ya que los cocos no pueden seguir desarrollándose a partir del momento en que se alcanza una determinada acidez. Tanto los estreptococos como los lactobacilos tienen una importante contribución en la determinación de las propiedades del yogurt. Es preciso evaluar las características de las cepas bacterianas utilizadas, ya que no todas las combinaciones son compatibles.

La mayor prevalencia de cocos según Carrión explica que *S. thermophilus* libera amoníaco y lo difunde dentro de las células de *L. bulgaricus* provocando un aumento en el pH haciéndolo más alcalino, provocando un descenso en el crecimiento de los lactobacilos e incapacitándolos para el

transporte de amonio al interior de la célula, como consecuencia de la hidrólisis de la urea realizado por *S. thermophilus* llegan a afectar la fermentación homoláctica del mismo.

Además, durante la fermentación de la leche, *S. thermophilus* y *L. bulgaricus* se enfrentan constantemente a cambios, estímulos y las tensiones ambientales, que pueden afectar la fisiología celular. Estos cambios ambientales previsible incluyen variaciones de pH, la limitación de la disponibilidad de nutrientes, y la acumulación de metabolitos tóxicos formados en el proceso de fermentación. La exposición a pH bajo por un largo período de tiempo provoca una detención del crecimiento, una reducción dramática de glucosa y una pérdida progresiva de la viabilidad.

3.4 Resultado de pruebas bioquímicas para comprobación de BAL

3.4.1 Resultado de pruebas de tinción Gram, catalasa y oxidasa

La tabla 8-3 muestra los resultados de las pruebas bioquímicas realizadas a los productos para comprobar si las bacterias ácido lácticas que crecieron en los medios selectivos son verdaderamente ácido lácticas esto se comprobó mediante los análisis de tinción Gram, catalasa y oxidasa.

Tabla 8-3: Resultado de pruebas de tinción Gram, catalasa y oxidasa

MARCAS	TINCIÓN GRAM	CATALASA	OXIDASA
C1.P.F (Bebida láctea)	Estreptococos Gram (+)	-	-
C1.L.F	Estreptococos Gram (+)	-	-
C2.PC.M	Estreptococos Gram (+)	-	-
C3.L.D	Estreptococos Gram (+)	-	-
C3.Y.F	Estreptococos Gram (+)	-	-
C4.L.F	Estreptococos Gram (+)	-	-
C5.L.M	Estreptococos Gram (+)	-	-
T.N	Bacilos Gram (+)	-	-
E.L	Bacilos Gram (+)	-	-

Realizado por: Lizbeth Aguirre, 2018

En los resultados la mayoría de las leches fermentadas mediante tinción Gram se pudo observar la presencia de estreptococos Gram negativos, es decir en estos productos hay prevalencia de

Streptococcus termophilus de acuerdo a las características microscópicas y al ser más utilizado en la fermentación de leches, a pesar de que su relación sea 1:1 en la prueba microscópica no se confirma que se cumpla esta analogía, esto se explica por el proceso de proto cooperación que existen entre las dos bacterias.

Todas las muestras resultaron dar pruebas catalasa negativa donde se comprueba que esta enzima no está presente en este tipo de bacterias ácido lácticas y de la misma manera se da en la prueba de oxidasa resultando ser negativa para todas las muestras en la cual se evidencia que no existe la presencia de la enzima que solo están presentes en bacterias Gram negativas.

3.4.2 Resultado de la evaluación del efecto de bacterias ácido lácticas de yogur, sobre población de *Escherichia coli* ATCC 25922

3.4.2.1 Resultado de recuento de *Escherichia coli*

La tabla 9-3 expone los resultados de la evaluación del efecto de las bacterias ácido lácticas sobre la población de *E. coli*, con base en las variaciones en el crecimiento de la bacteria durante 20 días de vida útil promedio de las 4 muestras de yogur analizadas, el día cero corresponde al día que fue inoculada la cepa de *E. coli*, para esta comprobación se utilizó la única bebida láctea, un yogurt envasado en funda de polietileno de baja densidad comercializados en los bares escolares muestreados, un yogurt del grupo control y el yogurt elaborado en laboratorio.

Tabla 9-3: Resultado de recuento de *Escherichia coli* durante el tiempo de vida útil de los productos

DIAS	C1.P.F (Bebida láctea) 10 ⁻³ UFC/m	C1.L.F 10 ⁻³ UFC/m	T.N 10 ⁻³ UFC/m	E.L 10 ⁻³ UFC/m
0	67	11	81	7
5	35	2	50	1
10	0	0	0	0
15	0	0	0	0
20	0	0	0	0

Realizado por: Lizbeth Aguirre, 2018

El comportamiento de *Escherichia coli* frente al tiempo de vida útil que se presenta en la tabla indica como el desarrollo de la bacteria va disminuyéndose desde niveles detectables en el día 0 y día 5 a niveles no detectables a partir del día 10 como se observa en el Gráfico 1-3.

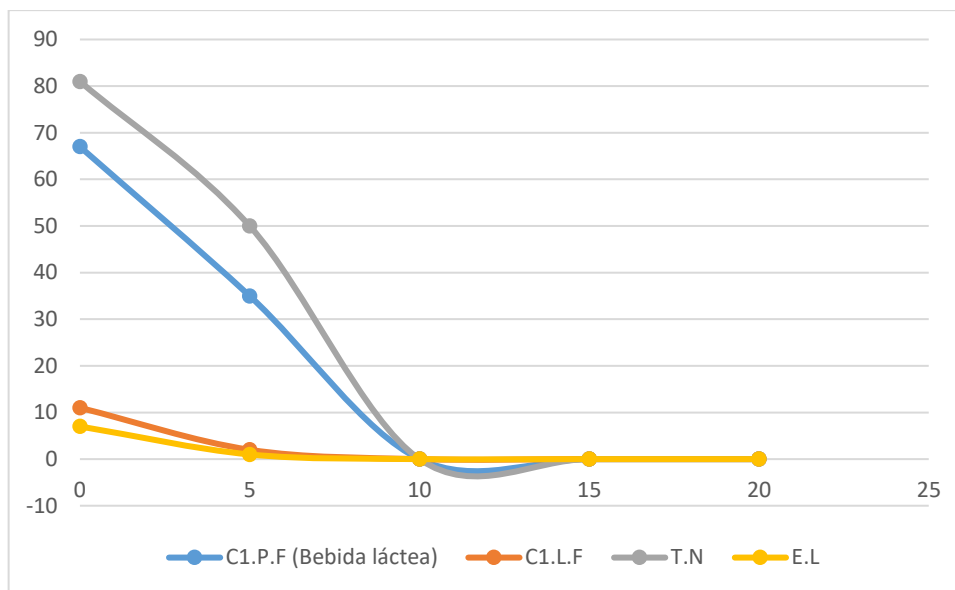


Gráfico 1-3: Resultados de recuento de *E. coli* en el tiempo de vida útil
Realizado por: Lizbeth Aguirre, 2018

Como se observa en la Gráfico 1-3 la muestra C1.P. F(Bebida láctea) y T.N presentan un mayor número de *E. coli* en el día 0 y día 5 y en la muestra C1.L.F y E.L tiene un bajo crecimiento desde el día de inoculación de la bacteria patógena. Al finalizar el análisis las muestras no tienen presencia de *E. coli*

3.4.2.2 Resultado de recuento de medición de pH

La tabla 10-3 presenta los resultados de la medición progresiva de pH a medida en los días de vida útil de cada muestra a analizar detectando así la acción de las bacterias ácido lácticas en este tiempo.

Tabla 10-3: Resultado de medición de pH durante el tiempo de vida útil de los productos

DIAS	C1.P.F (Bebida láctea)	C1.L.F	T. N	E.L
0	4,193	4,016	4,19	4,12
5	4,1	3,95	4,08	3,98
10	4,05	3,93	4	3,91
15	4,03	3,93	3,99	3,89
20	4,04	3,94	4	3,9

Realizado por: Lizbeth Aguirre, 2018

Con los resultados que se muestran se puede describir que a medida que aumentan los días de vida útil de cada producto el pH disminuye debido a que las bacterias ácido lácticas realizan la fermentación de los azúcares aun después de el envasado de cada producto.

Se observa un comportamiento muy similar en las cuatro muestras, los resultados de pH son directamente proporcionales a el recuento de *E. coli* debido a que a este pH ácido no son tolerables la *E. coli* según la ficha Rodríguez en su artículo “Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*” indica que las condiciones óptimas de crecimiento de la *E. coli* es en un pH de 6 a 7 y pueden sobrevivir hasta un pH de 4,4, de tal manera que al encontrarse en un medio que se encuentra menor a 4,4 se evidenció la ausencia de crecimiento a partir del día 10 en todas las muestras de yogur analizados hasta el último día de vida útil de cada producto.

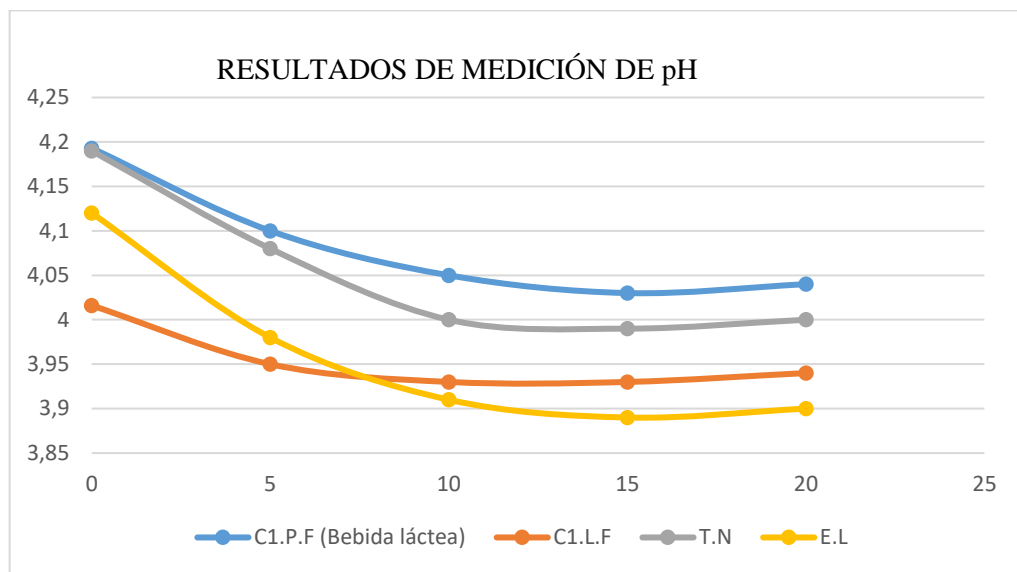


Gráfico 2-3: Resultados de medición de pH durante el tiempo de vida útil de los productos
Realizado por: Lizbeth Aguirre, 2018

Además, como se observa en el Gráfico 2-3 el pH inicial es 4.2 y va decreciendo a medida que pasan los días disminuye el pH, lo que indica que las muestras de leches fermentadas inoculadas la cepa de *E. coli* llegan a tener un pH menor por la acción de las BAL como señala Bodana y Rao en su estudio “Antimutagenic Activity of Milk Fermented by *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus*” que la exposición a pH bajo por un largo período de tiempo provoca una detención del crecimiento una reducción dramática de glucosa y una pérdida progresiva de la viabilidad de bacterias patógenas.

3.4.2.3 Resultado de recuento de BAL en agar MRS

En la tabla 11-3 se muestran los resultados de la medición progresiva de bacterias ácido lácticas en el medio selectivo MRS indicadas para bacilos en el transcurso de 20 días de vida útil de cada producto.

Tabla 11-3: Resultado de recuento de bacterias ácido lácticas en agar MRS

DIAS	C1P.F(Bebida láctea) 10 ⁻¹ UFC/mL	C1L.F 10 ⁻¹ UFC/mL	T. N 10 ⁻² UFC/mL	E.L 10 ⁻² UFC/mL
0	0	0	50	150
5	0	0	28	68
10	0	0	5	50
15	0	0	0	0
20	0	0	0	0

Realizado por: Lizbeth Aguirre, 2018

Las muestras C1.P.F y C1.L.F presenta ausencia de bacilos esto quiere decir que estas bacterias ácido lácticas no actuaron en la inhibición de crecimiento de *E. coli* ya que si lo hubiera sido se encontraría en un número elevado o existiría la presencia de crecimiento, por lo contrario, las muestras T. N y E.L en el día 0 si presentan bacilos aunque en un número no significativo y a la vez indica su decrecimiento en el día 5, esto se explica a que el las industrias de yogures el cultivo de bacterias fermentadoras son de alto costo especialmente los bacilos es por ello que muchas de las veces se prefiere fermentar la leche con cultivos con mayor carga de cocos, además como ya se había explicado anteriormente el peso que tiene los cocos sobre los bacilos debido a que los cocos y principalmente el *Streptococcus* actúa a la par con *Lactobacillus* pero a la vez lo inhibe por la liberación de amoniaco que ingresa al centro de los lactobacilos.

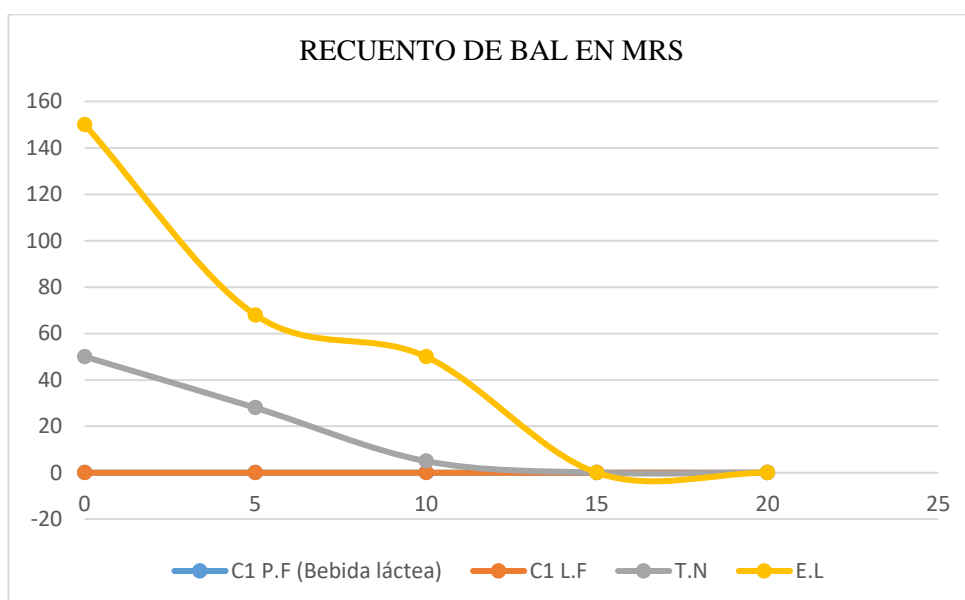


Gráfico 3-3: Recuento de bacterias ácido lácticas en agar MRS durante el tiempo de vida útil de los productos

Realizado por: Lizbeth Aguirre, 2018

Como se observa en el Gráfico 3-3 existe una depreciación de bacilos que se desarrollaron en este medio selectivo, es decir que los bacilos no siempre actúan a la par con los cocos de las leches fermentadas.

3.4.2.4 Resultado de recuento de BAL en agar M17

La tabla 12-3 reportan los resultados del recuento de bacterias en el medio selectivo M17 que indican la presencia de cocos en el transcurso de 20 días como tiempo de vida útil de cada producto.

Tabla 12-3: Resultado del recuento de bacterias ácido lácticas en agar M17 durante el tiempo de vida útil de cada producto

DIAS	C1.P. F(Bebida láctea) 10 ⁻⁸ UFC/mL	C1.L.F 10 ⁻⁸ UFC/mL	T. N 10 ⁻⁸ UFC/mL	E.L 10 ⁻⁸ UFC/mL
0	13	24	98	17
5	24	52	84	32
10	28	50	80	30
15	25	35	72	30
20	16	20	50	14

Realizado por: Lizbeth Aguirre, 2018

En todas las muestras existió crecimiento de cocos en el medio selectivo M17 lo que se explica que la flora del yogurt está constituida por las bacterias lácticas termófilas *Streptococcus termophilus* y *Lactobacillus bulgaricus*. y por ello entre cocos y bacilos se crea un fenómeno de mutua estimulación del crecimiento llamado protooperación. Glavina et al., indica que los cocos potencian el desarrollo de los bacilos produciendo ácido fórmico a partir del ácido pirúvico en condiciones anaeróbicas y formando rápidamente CO₂, pero a la vez que potencia la acción de bacilos también los inhibe esta acción se debe a que los cocos liberan amoniaco y lo difunde dentro de las células de *L. bulgaricus* provocando un aumento en el pH haciéndolo más alcalino, induciendo un descenso en el crecimiento de los lactobacilos e incapacitándolos para el transporte de amonio al interior de la célula, como consecuencia de la hidrólisis de la urea realizado por *S. termophilus* llegan a afectar la fermentación homoláctica del mismo.

Además, el resultado del día 20 indica un crecimiento bajo esto se debe a que en el yogurt también hay un proceso de antibiosis, ya que los cocos no pueden seguir desarrollándose a partir del momento en que se alcanza una determinada acidez. Tanto los estreptococcus como los lactobacillus tienen una importante contribución en la determinación de las propiedades del yogurt, de tal manera que su relación con el pH medido es directa ya que a medida que el pH desciende las bacterias ácido lácticas aumentan y a la vez ejercen su acción inhibitoria sobre la población de *E. coli*.

En la Gráfica 4-3 se evidencia el aumento de colonias a partir del día cero con su máximo crecimiento en el día 10, además, la muestra T.N es el producto que mayor UFC tiene y a la vez si tuvo crecimiento de bacilos, esto puede deberse a que en la industria que elabora este producto si utilizan cultivos fermentadores con alto número de cocos y bacilos.

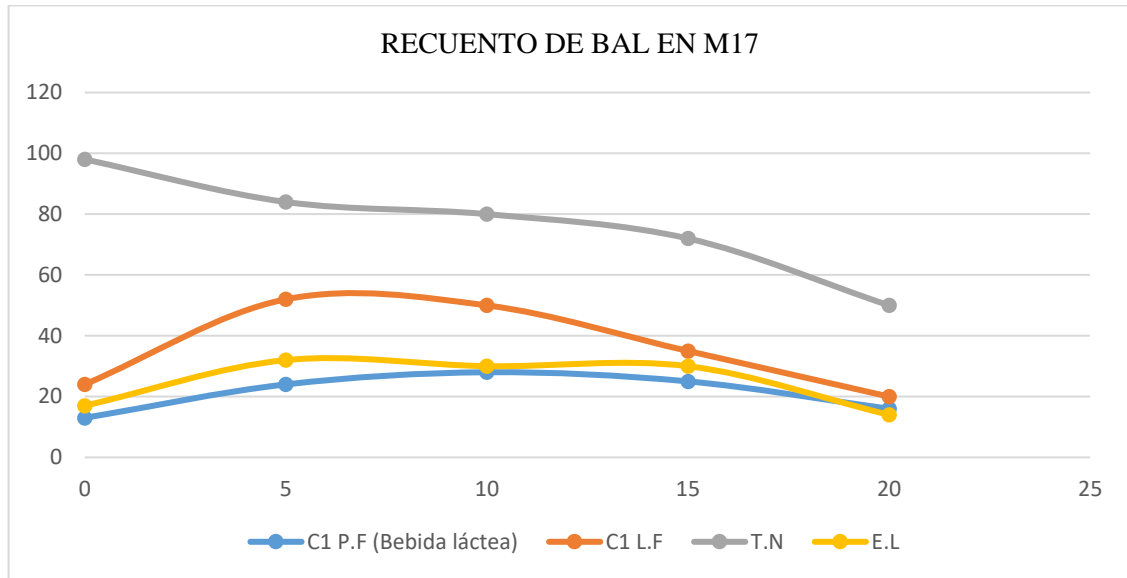


Gráfico 4-3: Resultado del recuento de bacterias ácido lácticas en agar M17 durante el tiempo de vida útil de cada producto

Realizado por: Lizbeth Aguirre, 2018

De acuerdo con la Tabla 1-3 el producto C1.LF hace una alegación de contener probióticos, pero según normativa internacional para que un yogur tenga esta denominación probiótica debe contener a más del cultivo mínimo, cepas probióticas adicionales, de acuerdo con esto es importante mencionar que existe un vacío legal en cuanto a las alegaciones que pueden hacerse en un etiquetado con la normativa ecuatoriana.

3.5 Resultados del análisis físico químico de leches fermentadas y bebidas lácteas

3.5.1 Resultado de medición de pH

En la Tabla 13-3 se muestran los resultados de la medición de pH y los límites máximos permisibles según la Norma Oficial Mexicana NOM-181-SCFI-2010, ya que en la normativa ecuatoriana no establece un límite para este parámetro.

Tabla 13-3: Resultado de medición de pH de leches fermentadas y bebida láctea

pH		
CÓDIGOS DE MUESTRAS	pH	LÍMITES MÁXIMOS PERMISIBLES
C1.P.F (Bebida láctea)	4,21 ± 0,01	≤4,6
C1.L.F	4,15 ± 0,1	
C2.PC.M	4,07 ± 0,01	
C3.L.D	4,13 ± 0,01	
C3.Y.F	4,02 ± 0,01	
C4.L. F	4,16 ± 0,01	
C5.L.M	4,10 ± 0,01	
T. N	4,19 ± 0,005	
E.L	4,12 ± 0,005	

Realizado por: Lizbeth Aguirre, 2018

De todas las muestras tanto de leches fermentadas como de bebidas lácteas se encuentran dentro del rango permitido por la normativa mexicana, teniendo en cuenta que las leches fermentadas por la acción de las bacterias ácido lácticas y por la fermentación de los azúcares deben tener un pH relativamente bajo para llamarse leche fermentada y bebida láctea.

Gamboa (Gamboa 2013) indica que el pH es un parámetro relevante para la conservación de los yogures y bebidas lácteas cuando disminuye, aumenta el periodo de conservación del producto

3.5.2 Resultado de medición de actividad de agua

En la tabla 14-3 se muestran los resultados de la medición de la actividad de agua.

Tabla 14-3: Resultado de medición de actividad de agua de yogures y bebidas lácteas

ACTIVIDAD DE AGUA	
CÓDIGO DE MUESTRAS	aW
C1.P.F (Bebida láctea)	0,9942 ± 0,0015
C1 L.F	0,9941 ± 0,0014
C2 PC.M	0,9954 ± 0,0007
C3 L.D	0,9930 ± 0,0001

C3 Y.F	0,9939 ± 0,0018
C4 L. F	0,9939 ± 0,0014
C5 L.M	0,9937 ± 0,0018

Realizado por: Lizbeth Aguirre, 2018

La actividad de agua para todas las muestras analizadas es superior a 0,99, siendo valores coherentes con el tipo de producto, ya que los alimentos frescos y líquidos tienen los valores de actividad de agua cercano a 1, esta medida de agua no ligada dispone al crecimiento de microorganismos, por lo que es necesario las adecuadas condiciones de higiene en su elaboración, para que únicamente se desarrollen las bacterias deseadas.

3.5.3 Resultado de medición de porcentaje de humedad por método de desecación en estufa de aire caliente

En la tabla 15-3 se muestran los resultados del análisis de porcentaje de humedad por el método de desecación en aire caliente y los límites máximos permisibles según la normativa oficial mexicana NOM-116-SSA1-1994, para conocer la cantidad de agua de las muestras que se encuentra libre.

Tabla 15-3: Resultado de medición de porcentaje de humedad por método de desecación en estufa de aire caliente de leches fermentadas y bebidas lácteas

%HUMEDAD		
CÓDIGO DE MUESTRAS	%H	LÍMITES MÁXIMOS PERMISIBLES NORMA NOM-116-SSA1-1994
C1.P.F (Bebida láctea)	91,4603 ± 0,1	70-95%
C1.L.F	84,6173 ± 0,06	
C2.PC.M	87,461 ± 0,039	
C3.L.D	84,4826 ± 0,035	
C3.Y.F	86,8976 ± 0,135	
C4.L.F	84,3803 ± 0,43	
C5.L.M	84,3867 ± 0,02	

Realizado por: Lizbeth Aguirre, 2018

Todas las muestras cumplen con lo establecido en la norma NOM-116-SSA1-1994, sin embargo las muestras C1.P.F (Bebida láctea) y C2.P.CM (Yogurt) presentan el más alto porcentaje de

humedad lo que significa que cuenta con menor número de sólidos y presentan también mayor aw. Las cifras de contenido en agua varían entre un 60 y un 95% en los alimentos naturales. En los tejidos vegetales y animales, puede decirse que existe en dos formas generales: “agua libre” y “agua ligada”. El agua libre o absorbida, que es la forma predominante, se libera con gran facilidad. El agua ligada se halla combinada o absorbida. Se encuentra en los alimentos como agua de cristalización (en los hidratos) o ligada a las proteínas y a las moléculas de sacáridos y absorbida sobre la superficie de las partículas coloidales (Hart, 1991).

3.5.4 Resultado de análisis de porcentaje de cenizas

La tabla 16-3 indica los resultados del análisis de % de cenizas junto con el límite máximo permisible basado en la norma oficial mexicana NOM-181-SCFI-2010 en la que establece que la medición de cenizas debe encontrarse en un 0,6%.

Tabla 16-3: Resultado de análisis de porcentaje de cenizas de leches fermentadas y bebidas lácteas

%CENIZAS		
CODIGO DE MUESTRA	%C (Promedio y D.E)	LÍMITES MÁXIMOS PERMISIBLES
C1.P.F (Bebida láctea)	0,9± 0,1	0,6%
C1.L.F	0,5 ± 0,06	
C2.PC.M	0.9 ± 0,039	
C3.L.D	0,7 ± 0,035	
C3.Y.F	0,5 ± 0,135	
C4.L.F	0,5 ± 0,43	
C5.L.M	0.4 ± 0,02	

Realizado por: Lizbeth Aguirre, 2018

De todas las muestras analizadas la muestra C1.P.F(Bebida láctea) y C2.PCM no cumplen con lo que establece la normativa mexicana, dichos resultados se deben a la presencia de minerales en el producto como adulterantes inorgánicos siendo perjudiciales para la salud de quien lo consume ya que los minerales no se pueden oxidar en el organismo para producir energía.

3.5.5 Resultado de análisis de contenido graso

En la tabla 17-3 se presentan los resultados que indica el análisis de contenido graso que fueron reportados por un laboratorio externo acreditado, basándose en Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL AOAC 20TH 952.06 para leches fermentadas y norma NTE INEN 2564 para bebidas lácteas.

17-3: Resultado de análisis de contenido graso

CONTENIDO GRASO		
MUESTRAS	Contenido Graso	LÍMITES MÁXIMOS PERMISIBLES
C1 P.F (Bebida láctea)	1,7	3
C1 L.F	2,80	<2,5

Realizado por: Lizbeth Aguirre, 2018

En los resultados de las dos muestras representativas solo la bebida láctea se encuentra dentro de los límites permisibles por la norma ecuatoriana NTE INEN 2364 cumpliendo con lo establecido, por lo contrario, la muestra de leche fermentada C1.L.F presenta un valor que no se encuentra dentro de los límites permisibles por la normativa, y no concuerda con la declaración de la etiqueta (Tabla 2-3), sobre todo en el producto bebida láctea ya que tiene un valor menor al que declara (2g/100g).

3.5.6 Resultado de análisis de proteínas

La tabla 18-3 presenta los resultados del análisis de proteínas que fueron reportados por el Laboratorio externo acreditado, basándose en Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL AOAC 20TH 991.20 para leches fermentadas y en la norma NTE INEN 2564 para bebidas lácteas.

Tabla 18-3: Resultado de análisis de proteínas

PROTEINA		
CÓDIGO DE MUESTRAS	Proteína	LÍMITES MÁXIMOS PERMISIBLES
C1.P.F (Bebida láctea)	1,54	1,5

C1.L.F	2,61	2,7
--------	------	-----

Realizado por: Lizbeth Aguirre, 2018

En los dos casos las muestras cumplen con lo establecido en las normativas, es decir los productos cuentan con la cantidad requerida por el organismo, además, las proteínas con el pH medido no han sufrido ningún proceso de desnaturalización, pero de acuerdo con la Tabla 2-3 los valores de proteína que exhiben en su etiquetado (3g/100g) en la bebida láctea y yogur, no se encuentran acorde a los valores reportados por el laboratorio.

Cabe mencionar que las proteínas que tiene el yogurt son utilizadas por el organismo para crear nuevas proteínas, responsables de construir tejidos, como los de nuestra masa muscular, y regular los fluidos del organismo entre otras funciones, es por ello que este es uno de los parámetros más importantes a analizar y controlar en las industrias que elaboran estos productos, y si estos alimentos no aportan la cantidad necesaria de lo que declaran se está engañando al consumidor.

CONCLUSIONES

El análisis microbiológico de calidad sanitaria de los yogures y bebida láctea se determinó que de todas las muestras analizadas si cumplen con lo establecido en la normativa ecuatoriana NTE INEN 2395 y NTE INEN 2564, sin contar con crecimiento de microorganismos patógenos que señala la norma como los es coliformes, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, mohos y levaduras y a la vez el análisis de aerobios mesófilos no cuenta con un número elevado que sea significativo para ser un riesgo en la salud del consumidor.

En la determinación de las características físico-químicas del yogur y la bebida láctea, todas las muestras analizadas cumplen con los establecido en las normas correspondientes para cada análisis, sin embargo en cuanto a contenido de grasa y proteínas hay diferencia entre lo que reportan en su etiqueta con los datos del laboratorio.

El recuento de bacterias ácido lácticos en los medios de cultivo selectivos M17 y MRS mostró una mayor prevalencia de cocos en todas las muestras analizadas, pero con mayor crecimiento en las leches fermentadas que en la bebida láctea.

En la confirmación de bacterias ácido lácticas por actividad de catalasa, oxidasa y tinción Gram, las reacciones de oxidasa y catalasa fueron negativas y en tinción Gram predominó la presencia de cocos.

RECOMENDACIONES

Dar a conocer a los responsables del expendio de estos productos lo que se está exhibiendo en los etiquetados ya que no están cumpliendo con lo que declaran, para así erradicar la publicidad engañosa y asegurar la salud del consumidor.

Realizar más estudios a los productos que se expenden en las instituciones educativas, ya que estos productos son consumidos por la población infantil, para poder brindar una ayuda a las industrias y que puedan controlar ciertos parámetros que pueden causar un error en los análisis y que así brinden confianza al consumirlo

Las BAL son bacterias facultativas que pueden desarrollarse tanto en presencia como en ausencia de oxígeno por lo que es recomendable realizar un análisis previo para conocer qué características poseen las bacterias que van a ser estudiadas y brindarles el ambiente adecuado para su crecimiento óptimo.

Complementar el estudio con el aislamiento e identificación de las bacterias ácido lácticas encontradas mediante métodos más actualizados como la identificación molecular a través del RNA ribosomal 16S

BIBLIOGRAFÍA

- Ancasi et al.** Mohos y levaduras en agua envasada y bebidas sin alcohol. *Revista argentina de microbiología*, vol. 38, no. 2, (2006) pp. 93-96. ISSN 0325-7541.
- Arioli et al.** Streptococcus thermophilus urease activity boosts Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus homolactic fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, vol. 247, (2017) pp. 55-64. ISSN 01681605. DOI 10.1016/j.ijfoodmicro.2016.01.006.
- Belaunzarán et al.** Caracterización de yogurt firme elaborado con leche ovina. [en línea], 2013, [Consulta: 2 julio 2018]. ISSN 0365-0871. Disponible en: <http://ri.conicet.gov.ar/handle/11336/2556>.
- Benkerroum, Oubel y Ben Mimoun.** Behavior of Listeria monocytogenes and Staphylococcus aureus in Yogurt Fermented with a Bacteriocin-Producing Thermophilic Starter. *Journal of Food Protection*, vol. 65, no. 5, (2002) pp. 799-805. ISSN 0362-028X. DOI 10.4315/0362-028X-65.5.799.
- Bodana y Rao.** Antimutagenic Activity of Milk Fermented by Streptococcus thermophilus and Lactobacillus bulgaricus. *Journal of Dairy Science*, vol. 73, no. 12, (1990) pp. 3379-3384. ISSN 00220302. DOI 10.3168/jds.S0022-0302(90)79033-9.
- Calderón et al.** Evaluación del efecto del cultivo probiótico Lactobacillus rhamnosus adicionado a yogurt natural y con probióticos comerciales sobre poblaciones de Staphylococcus aureus, Escherichia coli O157:H7, Listeria monocytogenes y Salmonella enteritidis. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, vol. 57, no. 1, (2007) pp. 51-56. ISSN 0004-0622.
- Carrión.** Viabilidad de probióticos en yogur batido durante su almacenamiento en refrigeración. *Universidad Nacional Agraria La Molina* [en línea], 2014, [Consulta: 30 junio 2018]. Disponible en: <http://repositorio.lamolina.edu.pe/handle/UNALM/2406>.
- Curtis et al.** Determinación de la calidad microbiológica de alimentos servidos en comedores de empresas privadas. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, vol. 50, no. 2, (2000) pp. 177-182. ISSN 0004-0622.
- Estrada.** Efecto de los probióticos Lactobacillus acidophilus y Bifidobacterium bifidum en las características físico-químicas y sensoriales del yogur de fresa Zamorano. [en línea],

[Consulta: 30 junio 2018]. Disponible en:
<https://bdigital.zamorano.edu/handle/11036/591>.

Fao et al. Probioticos en los alimentos. Propiedades saludables y nutricionales y directrices para la evaluación. [en línea], 2006, [Consulta: 30 junio 2018]. Disponible en: <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=XF2016042233>.

Fernandez. Metodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. *Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, (2010) pp. 52.

Fuentes y Villeda. Elaboración de yogur estilo griego con diferentes porcentajes de ATECAL, leche en polvo y horas de desuerado. (2015), pp. 42.

Gamboa. Instrumentación y estandarización del proceso para la elaboración de yogurt mediante el monitoreo de las variables analíticas (ph y temperatura). (2013), pp. 73.

García y Pacheco-Delahaye. EVALUACIÓN DE DE UNA BEBIDA LÁCTEA INSTANTÁNEA A BASE DE HARINA DE ARRACACHA (*Arracacia xanthorrhiza*) CON LA ADICIÓN DE ÁCIDO FÓLICO. *Revista chilena de nutrición*, vol. 37, no. 4, (2010) pp. 480–492.

García et al. Microbiología sanitaria de los yogures, naturales y con sabores, de consumo en la provincia de Alicante. *Alimentaria: Revista de tecnología e higiene de los alimentos*, no. 177,(2007) pp. 39-42. ISSN 0300-5755.

Glavina et al. Effect of LGG Yoghurt on Streptococcus Mutans and Lactobacillus Spp. Salivary Counts in Children. *Collegium antropologicum*, vol. 36, no. 1, (2012) pp. 129-132. ISSN 0350-6134.

González et al. El efecto antihipertensivo de las leches fermentadas. *Revista argentina de microbiología*, vol. 46, no. 1, (2014) pp. 58-65. ISSN 0325-7541.

González et al. Desarrollo de leche entera fermentada de cabra a diferentes concentraciones de *Lactobacillus acidophilus* en cocultivo con las bacterias del yogur a fin de obtener un producto con buena aceptación, viabilidad y vida útil. [en línea], 2016 [Consulta: 30 junio 2018]. Disponible en: <http://repositorio.ug.edu.ec/handle/redug/18115>.

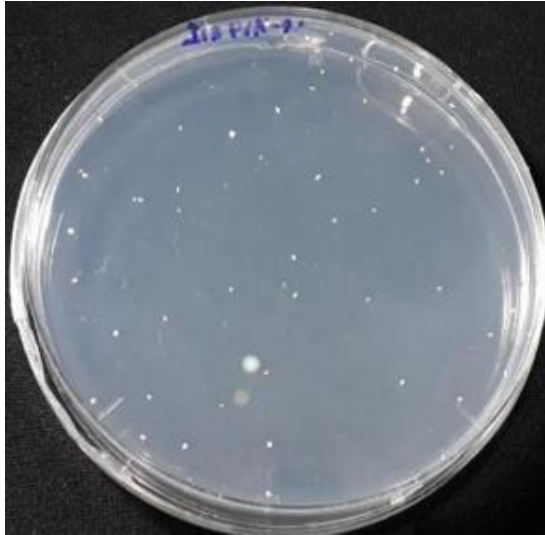
- Huginin.** Productos de suero de leche en yogurt y productos lácteos fermentados. [en línea], 2011, [Consulta: 30 junio 2018]. Disponible en: <http://bibliotecavirtual.corpmontana.com//handle/123456789/2300>.
- Jones et al.** Evaluation of safety and tolerance of microencapsulated *Lactobacillus reuteri* NCIMB 30242 in a yogurt formulation: A randomized, placebo-controlled, double-blind study. *Food and Chemical Toxicology*, vol. 50, no. 6, (2012) pp. 2216-2223. ISSN 02786915. DOI 10.1016/j.fct.2012.03.010.
- López Olmeda, De La LUZ Santón y Urbanos Martínez.** Uso potencial de los probióticos. *FMC - Formación Médica Continuada en Atención Primaria*, vol. 13, no. 10, (2006) pp. 622-627. ISSN 1134-2072. DOI 10.1016/S1134-2072(06)71417-7.
- Morales et al.** UTILIZACIÓN DE SUSTANCIAS ANTIMICROBIANAS PRODUCIDAS POR BACTERIAS ACIDO LÁCTICAS EN LA CONSERVACIÓN DE LA CARNE. *Revista chilena de nutrición*, vol. 36, no. 1, (2009) pp. 64-71. ISSN 0717-7518. DOI 10.4067/S0717-75182009000100007.
- Madrid.** Yogur y kefir: composición y fabricación. *Alimentación, equipos y tecnología*, vol. 9, no. 6, (1990) pp. 83-96. ISSN 0212-1689.
- Mater et al.** *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* survive gastrointestinal transit of healthy volunteers consuming yogurt. *FEMS Microbiology Letters*, vol. 250, no. 2, (2005) pp. 185-187. ISSN 03781097, 15746968. DOI 10.1016/j.femsle.2005.07.006.
- Mora et al.** Urease biogenesis in *Streptococcus thermophilus*. *Research in Microbiology*, vol. 156, no. 9, (2005) pp. 897-903. ISSN 0923-2508. DOI 10.1016/j.resmic.2005.04.005.
- Nte Inen 010.** *NTE INEN 0010: Leche pasteurizada. Requisitos* [en línea]. 2012, S.l.: s.n. [Consulta: 28 marzo 2018]. Disponible en: <http://archive.org/details/ec.nte.0010.2012>.
- Nte Inen 1334-3.** *NTE INEN 1334-3: Rotulado de productos alimenticios para consumo humano. Parte 3. Requisitos para declaraciones nutricionales y declaraciones saludables* [en línea]. 2011, S.l.: s.n. [Consulta: 30 junio 2018]. Disponible en: <http://archive.org/details/ec.nte.1334.3.2011>.
- Nte Inen 1529-2.** *NTE INEN 1529-2: Control microbiológico de los alimentos. Toma, envío y preparación de muestras para el análisis microbiológico* [en línea]. 1999, S.l.: s.n. [Consulta: 9 mayo 2018]. Disponible en: <http://archive.org/details/ec.nte.1529.2.1999>.

- Nte Inen 1529-5.** *NTE INEN 1529-5: Control microbiológico de los alimentos. Determinación de la cantidad de microorganismos aerobios mesofilos.* REP [en línea]. 2006, S.l.: s.n. [Consulta: 9 mayo 2018]. Disponible en: <http://archive.org/details/ec.nte.1529.5.2006>.
- Nte Inen 2395.** *NTE INEN 2395: Leches fermentadas. Requisitos* [en línea]. 2011, S.l.: s.n. [Consulta: 12 junio 2018]. Disponible en: <http://archive.org/details/ec.nte.2395.2011>.
- Nte Inen 2564.** *NTE INEN 2564: Bebidas lácteas. Requisitos* [en línea]. 2011, S.l.: s.n. [Consulta: 19 junio 2018]. Disponible en: <http://archive.org/details/ec.nte.2564.2011>.
- OMS.** OMS | Escherichia coli. WHO [en línea]. 2010, [Consulta: 22 junio 2018]. Disponible en: http://www.who.int/topics/escherichia_coli_infections/es/.
- Palencia Socarrás et al.** La cepa de yogur como probiótico, una alternativa en la salud y mejora del ternero. *REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria* [en línea], 2005, vol. VI, no. 9. [Consulta: 30 junio 2018]. Disponible en: <http://www.redalyc.org/resumen.oa?id=63612657011>.
- Pérez et al.** Aislamiento e identificación de cepas del género Bifidobacterium presentes en productos lácteos fermentados tipo yogur. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, vol. 32, no. 1, (2012) pp. 29-36. ISSN 1315-2556.
- Pérez et al.** Análisis fisicoquímico de alimentos comercializados en la Universidad de la Amazonía. *Momentos de Ciencia* [en línea], 2014, vol. 11, no. 2. [Consulta: 12 junio 2018]. ISSN 2538-9602. Disponible en: <http://www.udla.edu.co/revistas/index.php/momentos-de-ciencia/article/view/480>.
- Ramírez et al.** DESARROLLO DE UNA LECHE DE CABRA FERMENTADA EMPLEANDO L. Acidophilus EN CO-CULTIVO CON LAS BAL DEL YOGUR. *Alimentos Hoy*, vol. 25, no. 41, (2017) pp. 77-95. ISSN 2027-291X.
- Ramírez, Ulloa y Velázquez.** Bacterias lácticas: Importancia en alimentos y sus efectos en la salud. , no. 7, (2011) pp. 16.
- Reig y Anesto.** PREBIÓTICOS Y PROBIÓTICOS, UNA RELACIÓN BENEFICIOSA. , (2010) pp. 6.
- Reuben et al.** Presencia de Escherichia coli O157: H7, Listeria monocytogenes y Salmonella spp. en alimentos de origen animal en Costa Rica. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, vol. 53, no. 4, (2003) pp. 389-392. ISSN 0004-0622.

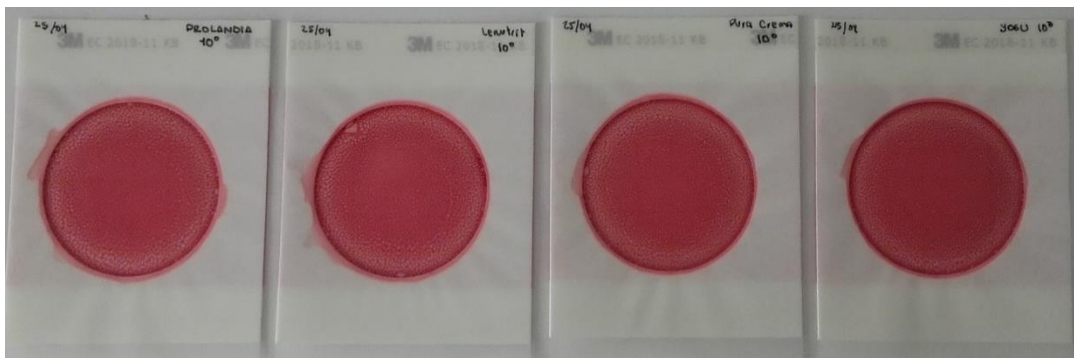
- Rodríguez-Alcalá et al.** LÍPIDOS BIOACTIVOS EN PRODUCTOS LÁCTEOS. ,(2011) pp. 12.
- Rosa y Franco.** Bacteriocinas de bacterias lácticas DOI:10.5585/conssaude.v1i0.156. *ConScientiae Saúde*, vol. 1, no. 0, (2008) pp. 09-15. ISSN 1983-9324. DOI 10.5585/conssaude.v1n0.156.
- Ruiz Rivera y Ramírez Matheus.** Elaboración de yogurt con probióticos (Bifidobacterium spp. y Lactobacillus acidophilus) e inulina. *Revista de la Facultad de Agronomía*, vol. 26, no. 2, (2009) pp. 223-242. ISSN 0378-7818.
- Silva et al.** Determinación de microorganismos indicadores de calidad sanitaria. Coliformes totales, coliformes fecales y aerobios mesófilos en agua potable envasada y distribuida en San Diego, estado Carabobo, Venezuela. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, vol. 24, no. 1-2, (2004) pp. 46-49. ISSN 1315-2556.
- Simal.** *Características de calidad de alimentos: límites establecidos por nuestra legislación.* España: Universidade de Santiago de Compostela.(2008) ISBN 978-84-398-4574-4.
- Tobía et al.** Aislamiento, selección y caracterización de bacterias ácido lácticas en ensilajes de soya. *Agronomía Costarricense* [en línea], 2003, vol. 27, no. 2. [Consulta: 30 junio 2018]. ISSN 0377-9424. Disponible en: <http://www.redalyc.org/resumen.oa?id=43627202>.
- Vinderola.** BACTERIAS PROBIÓTICAS EN PRODUCTOS LÁCTEOS FERMENTADOS. ,(2014) pp. 15.
- Xanto y Saguescerpta.** Riesgos y peligros en los productos lácteos | EROSKI CONSUMER. [en línea]. 2014, [Consulta: 22 junio 2018]. Disponible en: <http://www.consumer.es/seguridad-alimentaria/ciencia-y-tecnologia/2004/08/11/13957.php>.
- Zamorano.** Análisis de mesófilos aerobios, mohos y levaduras, coliformes totales y Salmonella spp. en cuatro ingredientes utilizados en la planta de lácteos de Zamorano, Honduras. [en línea], 2002, [Consulta: 2 julio 2018]. Disponible en: <https://bdigital.zamorano.edu/handle/11036/1553>.
- Zapata, Sepúlveda-Valencia y Rojano.** Efecto del Tiempo de Almacenamiento sobre las Propiedades Físicoquímicas, Probióticas y Antioxidantes de Yogurt Saborizado con Mortiño (*Vaccinium meridionale* Sw). *Información tecnológica*, vol. 26, no. 2, (2015) pp. 17-28. ISSN 0718-0764. DOI 10.4067/S0718-07642015000200004.

ANEXOS

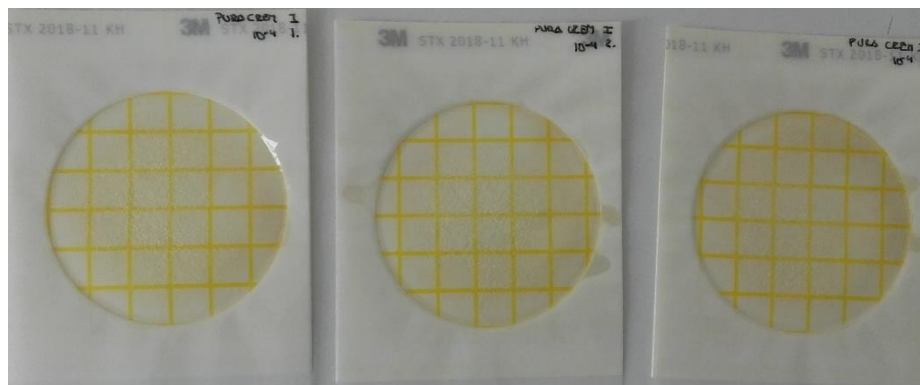
ANEXO A. Evaluación de calidad higiénico sanitaria de leches fermentadas y bebidas lácteas



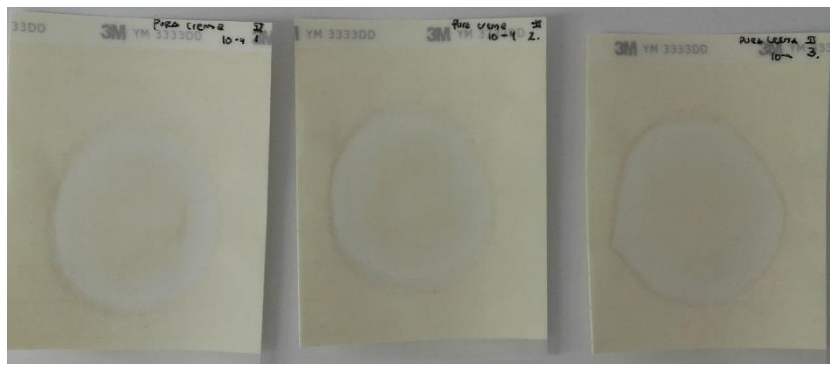
Fotografía 1A. Recuento de microorganismos aerobios mesófilos en agar PCA



Fotografía 2A. Recuento de coliformes *Escherichia coli*.



Fotografía 3A. Recuento de *Staphylococcus aureus*



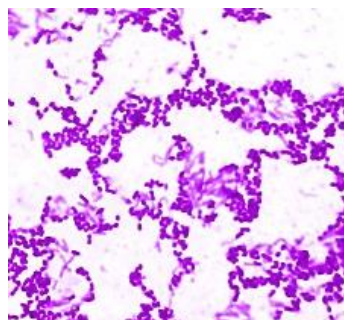
Fotografía 4A. Recuento de mohos y levaduras

ANEXO B: Recuento de bacterias ácido lácticas



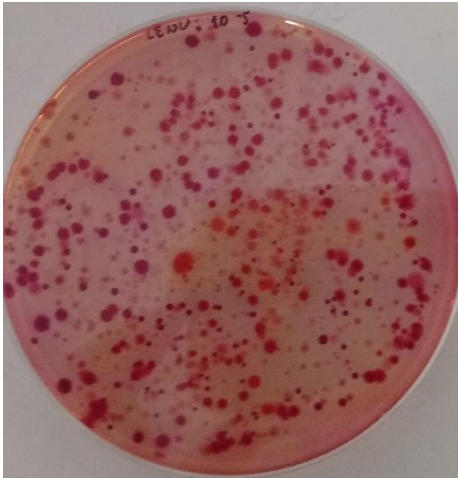
Fotografía 1B. Recuento de BAL en M17

ANEXO C: Tinción Gram de BAL

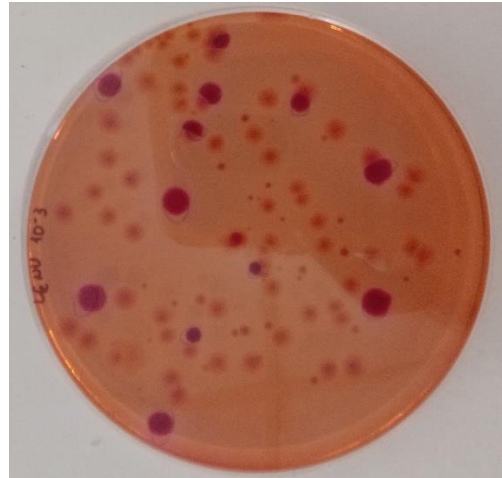


Fotografía 1C. Cocos de crecimiento en M17

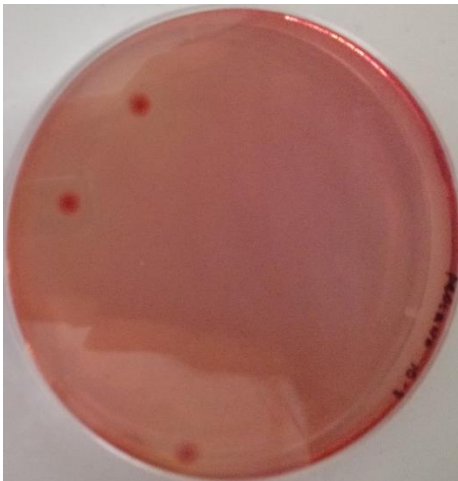
ANEXO D: Evaluación del efecto de bacterias ácido lácticas de yogur, sobre población de *Escherichia coli*



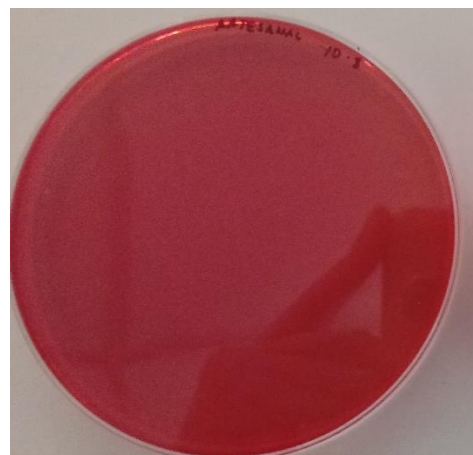
Fotografía 1D. Recuento de *E. coli*
día 0



Fotografía 2D. Recuento de *E. coli*
día 5



Fotografía 3D. Recuento de *E. coli*
día 10



Fotografía 4D. Recuento de *E. coli*
día 15 y 20

ANEXO E: Análisis físico químico




Fotografía 2E. Análisis de % Cenizas




Fotografía 4E. Análisis de actividad de Agua

ANEXO F. Informe de Laboratorio AVVE de ensayos físico químico de leche fermentada



LABORATORIOS
ave

Garantizamos su confianza



Servicio de Acreditación Ecuatoriana
Acreditación N° OAE LE 10 08 004
LABORATORIO DE ENSAYOS

INFORME DE ENSAYOS

Fecha de Informe:	22/05/2018	Orden:	2879	N° de Informe:	2647-18	Página:	1/1
-------------------	------------	--------	------	----------------	---------	---------	-----

INFORMACION DEL CLIENTE:

Nombre: ACUIBRE MARANJO ANA LEZBETH
 Dirección: BAÑOS DE AGUA SANTA
 Teléfono: 099885930 Fax: -- E-Mail: --

DATOS DE LA MUESTRA:

Tipo de Muestra: LECHE Y DERIVADOS
 Nombre: YOGUR LENO SABOR A FRESA
 Descripción: Yogur
 Lote: 18115 Fecha de Elab. 25/04/2018 Fecha de Exp. 09/06/2018
 Contenido Declarado: -- Cantidad Recibida: 6 de 85 g Condición: Normales, Funda plástica
 Forma de conservación: Refrigeración 5°C
 Fecha de Recepción: 16/05/2018 Cód. de Laboratorio: PL-C-185-16-05-18 Muestreo: Realizado por el cliente

RESULTADOS

ANÁLISIS QUÍMICO

Fecha de Análisis 17/05/2018 Página R 38-5.10: 18857
 Condiciones ambientales: Temperatura: 22°C - 33°C Humedad Relativa: 24% - 62%

Parámetros	Unidad	Resultados	Incertidumbre	**Requisitos	Método de Referencia
Grasa**	g/100g	2,80	--	Min 1,00 Max < 2,50	AOAC 20TH 952.06
Proteínas (N x 6,38)**	g/100g	2,61	--	Min 2,70	AOAC 20TH 991.20
Acidez exp Ac Láctico ^a	g/100g	0,80	± 0,008	--	AOAC 20TH 947.05

Los ensayos marcados con (*) no están incluidos en el alcance de la acreditación del SAE
 (*) Este parámetro no se encuentra dentro del alcance de acreditación A2LA
 ** Requisitos Químicos establecidos según Norma INEN 2395:2011 Segunda Revisión para Leches Fermentadas. Semidescremada.

CONCLUSIÓN


La muestra analizada **NO CUMPLE** con los Requisitos Químicos establecidos según Norma INEN 2395:2011 Segunda Revisión para Leches Fermentadas. Semidescremada.

OBSERVACIONES

Se podrán realizar modificaciones a este documento, hasta 6 meses después de su emisión, las mismas que debería ser respaldadas, por un requerimiento de las autoridades de salud o por un sustento técnico válido, de acuerdo al criterio del laboratorio.
 Estos resultados corresponden exclusivamente a la muestra analizada.
 La contra muestra se almacena en el laboratorio por 1 Mes.
 Prohibida su reproducción total o parcial, sin previa autorización de LABORATORIOS AVVE S.A.
 Las observaciones y opiniones no se encuentran dentro del Alcance de Acreditación
 Los registros generados por el análisis de la(s) muestra(s) son mantenidas en los archivos del laboratorio por 5 años

Válido sólo el informe original

Incertidumbre: ^a La estimación de la incertidumbre expandida reportada está basada en una incertidumbre típica multiplicada por un factor de cobertura K = 2, proporcionando un nivel de confianza de aproximadamente 95 %, de acuerdo con los requisitos de la Norma ISO/IEC 17025



Dra. Margot Vélez de Avilés
Gerente Técnico & Calidad

Datos de Contacto:
 Dirección Laboratorio Matriz: Parque Industrial Callimía 1, Calle Arq. Modesto Luzuriaga Píndez
 Edificio Comercial 3 Local 4 A Km. 11 1/2 vía a Dos An
 PBX. Matriz: (5934) 2103205 - Teléfono Parque Callimía 1: 2103017 / 2103025 ext. 235 Cel: 099878518
 Dirección Laboratorio de Microbiología: Parque Industrial Callimía 2, Biología D44
 Km. 11 1/2 vía a Dos An
 Teléfono: (5934) 2 103305 ext. 101. Teléfono Parque Callimía 2: 2 103198 ext. 443
 E-mail: margot.aviles@laboratoriosave.com
 coltraciones.compras@laboratoriosave.com
 paola.aviles@laboratoriosave.com
 lorena.aviles@laboratoriosave.com
 www.laboratoriosave.com

REV.10 05/05/15

Laboratorios AVVE

Fotografía 1F. Informe de resultados de análisis físico químico de leches fermentadas

INFORME DE ENSAYOS

Fecha de Informe: 22/05/2018 Orden: 2878 N° de Informe: 2646-18 Página: 1/1

INFORMACION DEL CLIENTE:
Nombre: AGUIRRE NARANJO ARA LIZBETH
Dirección: BAÑOS DE AGUA SANTA
Teléfono: 0998885930 Fax: -- E. Mail: --

DATOS DE LA MUESTRA:
Tipo de Muestra: LECHE Y DERIVADOS
Nombre: YOGUR PRO SABOR A MORA
Descripción: Yogur
Lote: -- Fecha de Elab. 24/04/2018 Fecha de Exp. 24/05/2018
Contenido Declarado: -- Cantidad Recibida: 6 de 40 g Condición: Normales, Funda plástica
Fecha de Recepción: 16/05/2018 Cód. de Laboratorio: PL-C-104-16-05-18 Forma de conservación: Refrigeración 5°C
Muestreo: Realizado por el cliente

RESULTADOS					
ANÁLISIS QUÍMICO					
Fecha de Análisis		17/05/2018		Página R 39-5.10: 18856	
Condiciones ambientales:		Temperatura: 22°C - 33°C		Humedad Relativa: 24% - 62%	
Parámetros	Unidad	Resultados	Incertidumbre	**Requisitos	Método de Referencia
Grasa ^a	g/100g	1,71	± 0,12	Min 1,00 Max < 2,50	AOAC 20TH 952.06
Proteínas (N x 6,38) ^{a*}	g/100g	1,54	--	Min 2,70	AOAC 20TH 991.20
Acidez exp Ac Láctico ^{a*}	g/100g	0,50	--	--	AOAC 20TH 947.05

Los ensayos marcados con (*) no están incluidos en el alcance de la acreditación del SAE
(*) Este parámetro no se encuentra dentro del alcance de acreditación A2LA

** Requisitos Químicos establecidos según Norma INEN 2395:2011 Segunda Revisión para Leches Fermentadas, Semidescremadas.

CONCLUSIÓN
La muestra analizada **NO CUMPLE** con los Requisitos Químicos establecidos según Norma INEN 2395:2011 Segunda Revisión para Leches Fermentadas, Semidescremadas.

OBSERVACIONES

Se podrán realizar modificaciones a este documento, hasta 6 meses después de su emisión, las mismas que deberán ser respaldadas, por un requerimiento de las autoridades de salud o por un sustento técnico válido, de acuerdo al criterio del laboratorio.

Estos resultados corresponden exclusivamente a la muestra analizada.

La contra muestra se almacena en el laboratorio por 1 Mes.

Prohibida su reproducción total o parcial, sin previa autorización de LABORATORIOS AVVE S.A.

Las observaciones y opiniones no se encuentran dentro del Alcance de Acreditación

Los registros generados por el análisis de la(s) muestra(s) son mantenidas en los archivos del laboratorio por 5 años

Válido sólo el Informe original


Incertidumbre: * La estimación de la incertidumbre expandida reportada está basada en una incertidumbre típica multiplicada por un factor de cobertura K = 2, proporcionando un nivel de confianza de aproximadamente 95 %, de acuerdo con los requisitos de la Norma ISO/IEC 17025


Dra. Margot Vélez de Avilés
Gerente Técnico & Calidad

Dirección Laboratorio Metría: Parque Industrial California 1, Calle Arg. Modesto Luque Rivarén,
Edificio Comercial 3 Local 4 A Km. 11 1/2 vía a Daule,
PBX. Metría: (5034) 2103208 - Teléfonos Parque California 1: 2103217 / 2103228 ext. 235 Cel. 01668076518

Dirección Laboratorio de Microbiología: Parque Industrial California 2, Bodega D44
Km. 11 1/2 vía a Daule,
Teléfono: (5034) 2103365 ext. 101. Teléfonos Parque California 2: 2103192 ext. 443

E-mail: margot.aviles@laboratoriosavve.com
colaciones.compras@laboratoriosavve.com
patricia.aviles@laboratoriosavve.com
larena.aviles@laboratoriosavve.com
www.laboratoriosavve.com

 Laboratorios AVVE

REV.10.05.06/15

Fotografía 2F. Informe de resultados de análisis físico químico de bebidas lácteas

ANEXO G: Fermento usado en la elaboración de yogur en laboratorio

PRODUCT DESCRIPTION - PD 207082-2.4FR

No. de produit 50430

CHOOZIT™ MA 4001 LYO 25 DCU

CHOOZIT™ Cheese Cultures

Description

Ferment lactique lyophilisé concentré pour l'ensemencement direct du lait et des bases lactées.

Dosages d'utilisation

Produit	Dose
fromage à pâte molle	5 - 10 DCU / 100 l de lait
Fromage à pâte demi-dure	5 - 10 DCU / 100 l de lait
type quark	2.5 - 5 DCU / 100 l de lait
crème acidifiée	2.5 - 5 DCU / 100 l de lait

Les doses d'ensemencement préconisées sont données à titre indicatif. Des ferments supplémentaires peuvent être rajoutés en fonction de la technologie, du taux de matières grasses et des caractéristiques produits recherchés.
Notre responsabilité ne serait être engagée dans le cas d'une utilisation autre que celle recommandée.

Conseils d'utilisation

Conservé à une température < 4°C dans un endroit sec. Lorsque le produit est conservé à une température négative, laisser le sachet pendant 30 à 60 minutes, à température ambiante, avant de l'ouvrir. Dans le cas contraire, les propriétés de la culture en seront affectées. Prolonger l'exposition à température ambiante diminuera également les performances. Vérifier avant utilisation que la culture utilisée est sous forme de poudre. Ajouter directement au lait de fabrication dès que les pâles d'agitation de la cuve sont recouvertes de lait. Eviter la formation de mousse et d'air dans le lait.
Recommandations importantes :
Si le produit forme une masse compacte, il doit être mis au rebut. Afin de garder la contamination bactériophagique sous contrôle, s'assurer que l'environnement et les équipements soient nettoyés avec des produits appropriés, à intervalles réguliers. Supprimer tout système qui pourrait recycler une partie du produit fini au début de la chaîne de fabrication afin de limiter la propagation phagique.
Notre responsabilité ne serait être engagée en cas d'une utilisation autre que celle recommandée.

Composition

Lactococcus lactis subsp. lactis
Lactococcus lactis subsp. cremoris
Lactococcus lactis subsp. lactis biovar. diacetylactis
Streptococcus thermophilus

Propriétés

- Ferments hétérofermentaires pour mélanges fermiers, essentiellement mésophiles.
- Ensemencement direct
- Une rotation phagique est disponible sur demande.

Spécifications physiques/chimiques

Normes d'activité acidifiante

Milieu test :
Lait stérilisé reconstitué (10% matières sèches)
Chauffé 20 min à 110°C. Standardisé à un pH 6,60

Température : 30 °C
Taux d'ensemencement : 6.25 DCU / 100 l
Delta pH : 0.9
Temps pour atteindre le delta pH : <= 6 heures

Spécifications microbiologiques

Normes bactériologiques (données standard et méthodes de référence)

Coliformes	< 10 / g [1]
Enterococci	< 20 / g [2]
Levures	< 10 / g [3]
Moisissures	< 10 / g [3]
Staphylococci coagulase positive	< 10 / g [4]
Listeria monocytogenes	neg. / 25 g [5]
Salmonella	neg. / 25 g [6]

[1] NF V08-015, IDF 73A-1985

[2] Gelose bile esculine azide de sodium / 48 h à 37 °C

[3] NF V08-022, IDF 94B-1991

[4] NF V08-057, IDF 145A-1997

[5] NF V08-055, IDF 143A-1990

[6] NF V08-052, IDF 93B-1995

Fotografía 1G. Ficha técnica del fermento lácteo usado en la elaboración del yogur