

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS Fundada en 1551

FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

UNIDAD DE POST GRADO

Producción de leche fermentada utilizando bacterias probióticas (lactobacillus acidophilus, bifidobacterium lactis y streptococcus thermophilus) con leche de cabra y vaca

TESIS para optar el Grado Académico de : MAGÍSTER EN BIOTECNOLOGÍA

AUTOR

DANIZA MIRTHA GUERRERO ALVA

LIMA – PERÚ 2005

ÍNDICE

RESUMEN

SUMMARY

I. INTRODUCCIÓN

II. GENERALIDADES

III. MATERIALES Y METODOS

3.1. MATERIALES

3.2. MÉTODOS

IV. RESULTADOS

4.1. ANÁLISIS DE LA MATERIA PRIMA

4.2. FERMENTACIÓN

A. CON LECHE DE CABRA

B. CON LECHE DE VACA

C. CON MEZCLA DE LECHE DE CABRA Y DE VACA (1:1)

V. DISCUSIÓN

VI. CONCLUSIONES

VII. BIBLIOGRAFÍA

VIII. ANEXOS

RESUMEN

En el presente estudio se adicionó un cultivo mixto Bio Rich constituido por *Lactobacillus acidophilus* La-1, *Bifidobacterium lactis* Bb-12 y *Streptococcus thermophilus* a leche de cabra, de vaca, así como a la mezcla de ambas en proporción (1:1); obteniéndose leche fermentada o cultivada entera o integral en base al contenido de acidez, porcentaje de grasa y al crecimiento de las bacterias probióticas *Lactobacillus acidophilus* (10^7 ufc/ml) y *Bifidobacterium lactis* (10^6 ufc/ml) además de *Streptococcus thermophilus* (10^9 ufc/ml); las que cumplen las normas microbiológicas de las leches fermentadas o cultivadas.

Se determinó los siguientes parámetros de proceso: adición de cultivo Bio Rich (1% en leche de cabra y en la mezcla de leche de cabra y de vaca en partes iguales, y temperatura de proceso de 42° C; 2% en leche de vaca con temperatura de proceso de 39° C), pH de corte de 4,5.

El tiempo de proceso con leche de vaca, de cabra y con la mezcla de leche de cabra y de vaca (1:1) fue de 4 horas, 7 horas y 4 horas respectivamente.

Palabras clave: leche de cabra y de vaca, proceso.

SUMMARY

In the present study was added Bio Rich culture (composed by *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium lactis* and *Streptococcus thermophilus*) to goat and cow milk and a mix of goat and cow milk (1:1). It was gotten whole fermented milk with good acidity, fat percentage, and enough probiotic bacteria's growth (*Lactobacillus acidophilus* 10^7 cfu/ml, *Bifidobacterium lactis* 10^6 cfu/ml), besides *Streptococcus thermophilus* 10^9 cfu/ml. All of the fermented milks agreed with the safety food norms.

The parameters of the process were: added culture (1% in goat and in cow and goat mix milk, fermentation temperature 42° C; 2% in cow milk and fermentation temperature 39° C); final pH of 4,5.

The time of process with cow, goat, and cow and goat mix milk was: 4 hours, 7 hours and 4 hours respectively.

Keywords: goat and cow milk, process.

I.INTRODUCCIÓN

La leche es un fluido segregado por las glándulas mamarias de las hembras sanas, poco después del calostro, cuando nace la cría, es un líquido de composición compleja, blanco y opaco; sabor ligeramente dulce y pH casi neutro.

Mantiene en suspensión glóbulos de grasa y proteínas, es análoga al plasma sanguíneo y está constituida por lactosa, sales minerales y algunos otros elementos, de gran importancia industrial y para efecto del procesamiento de los derivados lácteos (1).

Las diferentes especies de mamíferos producen leches que varían en su composición y como consecuencia tienen propiedades diferentes.

En la Tabla podemos observar a continuación la Composición Porcentual de diferentes tipos de leche.

Leche	Mat. Seca	Grasa	Lactosa	Minerales	Prot.Totales	Caseína
Humana	11,7	3,5	6,5	0,25	1,4	28
Vaca	12,5	3,5	4,7	0,8	3,5	78
Cabra	13,8	4,3	4,7	0,8	4,0	75

Fuente; La leche y sus derivados, Armando Santos Moreno, Edit. Trillas 1987.

La leche de vaca se caracteriza por poseer carbohidratos libres en solución en fase acuosa y unidos a proteínas entre ellos se encuentra la lactosa en una proporción promedio de 50 g/l, que es hidrolizada a galactosa y glucosa por parte de microorganismos benéficos (2,3) y también contaminantes (4). Los lípidos son una fracción muy variable y depende del tipo de alimentación del ganado; se

encuentra triglicéridos (96% del total de lípidos), fosfolípidos (entre 0,8% y 1,0%) y sustancias insaponificables (aproximadamente 1%).

Por otro lado, la caseína entera comprende el 78% del total de las proteínas de la leche, las proteínas de punto isoeléctrico elevado, tales como la caseína ν , proteína roja y lactolina, además de las proteínas del suero o solubles como β -lactoglobulina, ∞ -lactoalbúmina, inmunoglobulina, seroalbúmina, proteosa, peptona y otras proteínas menores. Demás está decir que la leche de vaca es rica en minerales, vitaminas y enzimas (4,5).

Respecto a la leche de cabra se puede indicar que es de sabor agradable y dulzón. Los glóbulos de grasa se caracterizan por ser de tamaño muy pequeño, lo que desde el punto de vista nutricional es importante pues un diámetro menor de 5 micras reduce el tiempo de residencia en el estómago así como el tránsito intestinal. Existen pocas diferencias en la estructura de los triglicéridos de la leche de cabra y de vaca (6).

En cuanto a las proteínas, las caseínas representan la fracción mayoritaria. La diferencia radica en las proteínas séricas ya que posee concentraciones cuatro veces menores de lactoalbúmina, pero más lactoglobulina. En cuanto a minerales y enzimas es semejante a la leche de vaca (1).

Según la Oficina de investigación Agraria del Ministerio de Agricultura, el Perú tuvo en el año 2000 aproximadamente 2 022 756 cabezas de ganado caprino, distribuidas principalmente en los departamentos de Piura (384 000 animales), Ayacucho (257 123 animales), La Libertad (132 124 animales) Ancash (207 350 animales) Huancavelica (190 800 animales) y Lima (190 700 animales), (7). Es llamada en forma general “la ganadería de los pobres”, ya que los hatos se concentran en ganaderos de escasos recursos. Los volúmenes de producción de leche de cabra oscilan entre 2 y 6 litros por día, por unidad. Este tipo de leche empieza a tomar importancia en otros países como España, Grecia, China e India (6).

Sin embargo, durante el final de la lactación se produce de manera natural mayor cantidad de grasa, en la cual se incrementa el contenido de ácidos grasos caproico, caprílico y cáprico (8), los que confieren sabor y aroma específico que no siempre es aceptado por el público consumidor. Por otro lado, este tipo de ganado se encuentra asociado a la crianza del ganado vacuno cuya leche tiene propiedades distintas a la proveniente de ganado caprino. Adicionalmente el consumo de leche de cabra tiene mayor aplicación en la producción de quesos (9), mientras que la leche de vaca goza de uso industrial más diversificada, siendo cada vez mayor la producción de leches fermentadas cuyas propiedades y bondades –probadas por numerosos estudios- han incrementado su demanda en el mercado.

La característica principal de estos productos es que son procesados empleando microorganismos seleccionados, capaces de hidrolizar la lactosa presente, por ejemplo los géneros de lactobacilos y estreptococos a los que se han sumado las bifidobacterias todos ellos denominados probióticos (10). Actualmente existen alrededor de 70 productos en el mercado internacional que incluyen este tipo de microorganismos, al menos la mitad de estos productos se procesan en Japón con el rótulo “Alimentos para uso especial en salud”, (FOSHU), de los cuales más de 50 productos poseen Bifidobacterium en su composición. Su éxito radica en que suprime la absorción de colesterol (11), regulan la composición de microorganismos en el intestino (12), reducen la actividad de la nitroreductasa y β -glucuronidasa que causan cáncer al colon, reducen la concentración de amonio y azoximetano que inducen criptas aberrantes (13), sintetizan folatos e inmunoglobulinas, vitamina B y K, así como reducen traslocaciones de *Escherichia coli* (14, 15,16).

A nivel industrial la producción de derivados lácteos es predominante sobre la base de leche de ganado vacuno y en menor escala a la producción de yogurt con leche de cabra, debido entre otras razones a la limitada producción de leche de cabra comparativamente a la de vaca. Actualmente, la industria no procesa leche

fermentada de cabra con *Bifidobacterium*, debido a que se desconoce el manejo óptimo de estas bacterias así como los parámetros de proceso. También es necesario introducir otras cepas como *Lactobacillus acidophilus* en el diseño de nuevos productos y desde el punto de vista de la salud es importante promover el consumo de alimentos que incluyan bacterias probióticas. El presente trabajo se realizó en los Laboratorios del Centro en Investigación en Cáncer Maes Heller del Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas de Lima Perú (INEN), ONG PROCABRA y laboratorios de la Universidad Nacional del Callao; empleando las cepas de *Bifidobacterium lactis* Bb-12, *Lactobacillus acidophilus* La-1 y *Streptococcus thermophilus* para producir leche fermentada utilizando como sustrato leche de vaca y de cabra, así como la mezcla de ambas en proporciones iguales y se determinaron los parámetros del proceso: temperatura y tiempo de fermentación, porcentaje de inóculo, pH, y crecimiento de microorganismos benéficos, en el producto final (pH, acidez y consistencia), los recuentos microbiológicos de coliformes, hongos y levaduras, *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus thermophilus* y *Bifidobacterium lactis*; además de las características sensoriales del producto final.

En la medida que hay una motivación creciente en biotecnología, ubicamos nuestro trabajo entre los que tienen interés especializado en la producción industrial de leche fermentada con probióticos que incluyen *Bifidobacterium* y *Lactobacilos* en leche tanto de cabra como de vaca con los siguientes objetivos:

- ❖ Producir un tipo de leche fermentada con leche de cabra y de vaca que incluyan microorganismos probióticos tales como *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium lactis* y *Streptococcus thermophilus*.
- ❖ Determinar los parámetros del proceso.
- ❖ Determinar las características del producto final.

II. GENERALIDADES

Las leches fermentadas en general, resultan del desarrollo de microorganismos benéficos que modifican los componentes de la leche; como por ejemplo la lactosa que se transforma parcialmente en ácido láctico ó en otros casos en alcohol etílico, y los prótidos que son parcialmente peptonizados mejorando su digestibilidad. Las leches fermentadas son consumidas desde la más remota antigüedad por los pueblos orientales cuya longevidad se atribuyó al consumo de este tipo de alimento (1).

De la revisión de literatura a nivel nacional se puede mencionar a Juan Valdivia que se ocupa de los diferentes derivados lácteos que incluye la tecnología de la producción de yogurt y otras leches acidificadas, así como de los microorganismos beneficiosos, siendo en su género, un trabajo inicial en nuestro medio. Elizabeth Paitan (con sus trabajos sobre producción de yogurt frutado y yogurt congelado, en los años 80) desarrolló el flujo de operaciones y los parámetros de proceso para producción de yogurt saborizado con mermelada de fruta, así como una versión congelada después del proceso de fermentación (8).

Últimamente, se ha dado a conocer el trabajo de yogurt con leche de soya (17), así como el de Biotecnología del yogurt enriquecido con calcio (18).

Por otro lado, a nivel internacional se cuenta con el Reglamento Técnico MERCOSUR de Identidad y calidad de Leches Fermentadas (19) que denomina Leche Fermentada al producto obtenido por coagulación y disminución del pH de la leche o leche reconstituida, adicionada o no de otros productos lácteos, por fermentación láctica de uno o varios de los siguientes cultivos; *Latobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Bifidobacterium spp*, *Streptococcus salivarius*

subsp. thermophilus y/u otras bacterias ácido lácticas que por su actividad, contribuyen a la obtención de las características del producto final (ítem 2.1.2. del Reglamento en mención).

Cabe aclarar que el añadido lácteo aludido se refiere a la crema de leche, caseína, suero en polvo, etc., y que no puede fabricarse únicamente con *Lactobacillus acidophilus* porque sería entonces leche acidófila (que corresponde al ítem 2.1.2.1. del Reglamento). Además este producto se acepta también bajo la denominación de leche “cultivada”o fermentada” (19).

Según el tenor graso presente el producto final se clasificará como: Leche fermentada con crema, si posee mínimo 6 g/100 g de grasa; entera o integral si tiene como mínimo 3g/100 g de grasa; parcialmente descremada si posee 2,9 g/100g de grasa como máximo y, leche fermentada descremada si la base láctea tiene un contenido de materia grasa no mayor a 0,5 g/100 g . El producto en el rotulado se podrá llamar “Leche fermentada” o “Leche Cultivada Natural”, “Leche fermentada Natural o Leche Cultivada Natural mencionando además “con Crema”, “Entera” o “Integral”, “Parcialmente Descremada” o “Descremada” (19).

Si el producto es saborizado o aromatizado se denominará “Leche Fermentada Endulzada” o “Leche cultivada Endulzada” o “Leche fermentada sabor a... “, o “Leche cultivada sabor a.... “o “Leche fermentada endulzada sabor a... “o “Leche cultivada endulzada sabor a... “llenando el espacio en blanco con el nombre de la o las sustancias saborizantes/ aromatizantes utilizadas que otorgan al producto sus características distintas, además de la clasificación por contenido de grasa. También podrán emplearse las expresiones “con azúcar” o “azucarada” en lugar de “endulzada”. Podrá ser mencionada la presencia de *Bifidobacterium* siempre que se cumpla con tener un mínimo de 10^6 ufc/ml (19).

A continuación se citará las características más importantes de cada microorganismo empleado:

BIFIDOBACTERIUM:

Desde que en 1900 Tissier descubrió por primera vez las Bifidobacterias, su clasificación ha evolucionado notablemente y hasta junio de 1999 se conocían alrededor de 40 especies. Son bastones gram (+) y anaerobios estrictos, se les reconocen como género separado desde 1974, y de manera general se clasifican en “Humanas o Animales”, según su origen; su tamaño genómico oscila entre 1.5 a 2.1 Mb, y la secuencia es semejante a las proteínas de golpe frío de *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* y el factor de caja-y-humano. La pared celular posee residuos de Galactofuranosa y las subdivisiones residuos de Galactopiranosil, siendo unidades repetidas de trisacáridos (20).

Bifidobacterium longum posee DNA extra cromosomal, y el polimorfismo ribosomal ha sido estudiado y utilizado para diferenciarla entre género y especies. También se ha observado 2 polisacáridos exocelulares compuestos de Glucosa, Galactosa, Acido Urónico y Hexosaminas, de diferentes pesos moleculares; así como dos complejos proteína – polisacáridos fibrilares unidos al lado externo de la pared celular del que depende el efecto bifidogénico (21).

Este género usa la ruta catabólica de Embden-Meyerhof-Parnas para la glucosa, produciendo acetato a partir de CO₂ en la ruta Wood-Ljunghahl y de la ruta del Bifidobacterium. El propionato se forma por la ruta de fijación del CO₂ mientras que el butirato se sintetiza del Acetil CoA (22, 23).

Los medios de cultivo que promueven el crecimiento de bifidobacterias pueden contener estaquiosa, rafinosa, pentanal o n-Hexanal (soya) (24,25) y en general fructooligosacáridos (FOS) y glucooligosacáridos (GOS) (26,27), y se ha observado un buen crecimiento de varias especies con *Klyveromices marxianus* y *Lactobacillus acidophilus* en leche de camella (27). Un estimulador del crecimiento de bifidobacterias es 2-amino-3 carboxi-1,4-naftoquinona producido por *Propionibacterium freudenreichii* (28).

Entre los beneficios que producen se encuentra el regular la composición de microorganismos en el intestino, y reducir la actividad de la nitroreductasa y β -glucuronidasa, enzimas involucradas en el cáncer al colon. También permiten la asimilación del colesterol en presencia de sales biliares trihidroxiconjugadas por precipitación y asimilación (10,11).

Estimulan la producción de citoquinina y salvan energía no digerida así como almidones y oligosacáridos, sintetizando proteínas, vitaminas B y K. También se ha probado que ligan mutágenos y promutágenos, y reducen concentración de amonio (que promueven cáncer de colon), azoximetano, traslocaciones de *Escherichia coli*, y además han sido utilizadas como indicador de contaminación fecal en carnes y productos cárnicos (29,30).

También fue estudiado el consumo de leche no fermentada y adicionada de *Bifidobacterium longum* en relación con la mala absorción de la lactosa en humanos (2). Los resultados indican que este tipo de leche conteniendo únicamente lactosa produjo menos hidrógeno y flatulencia, reduciéndose los síntomas no deseados y notándose el incremento de nivel de betagalactosidasa y la tasa de asimilación de lactosa.

Actualmente se cuenta con numerosos productos con *Bifidobacterium* en su composición, para combatir problemas intestinales como por ejemplo *Bifidobacterium forte*, que contiene la bacteria inmovilizada en carbón, y pueden ser consumidas por niños y adultos (31) ó *Bifidosa*, que previene la constipación y va adicionado de lactulosa, vitaminas, lactosa, hierro y dextrinomaltosa; es muy soluble en agua y de sabor dulce.

STREPTOCOCCUS:

Dentro del género *Streptococcus* se encuentra más de 66 especies, que incluyen a *Streptococcus thermophilus*. Este microorganismo se caracteriza por ser gram (+) de forma esférica, de 0,5 a 2,0 micrómetros de diámetro, sin motilidad, y no forma esporas. El color de la colonia es entre beige y grisáceo. Son catalasa y

ureasa negativa, pero varían en su respuesta de hidrólisis de esculina, arginina hidrolasa y Voges- Proskauer. Se clasifican de acuerdo a sus características bioquímicas, metabólicas, serológicas y al tipo de hemólisis que producen en el agar sangre. En la década de los 30, Rebeca Lancefield identificó 5 grupos: A, B, C, D y E pero actualmente se conocen desde la A hasta la U. Según la hemólisis en agar sangre se dividen en tres grupos: alfa, beta y gamma hemolíticos. En cambio, por su actividad fisiológica y propiedades metabólicas se agrupan en: piogénicos, orales, lácticos, anaeróbicos y otros estreptococos (32).

Como hábitat se reporta la leche y productos lácteos, en alimentos y materiales provenientes de plantas y suelos, se le utiliza como fermento arrancador o “starter” en la industria quesera durante la manufactura de quesos frescos, madurados y también de pasta cocida, a través de siembras directas. La temperatura óptima de crecimiento es entre 40° C y 45° C, pero puede hacerlo hasta 50° C (1).

Son homofermentativos, no toleran más de 4% de sal. Se sabe que hidrolizan la lactosa mediante una β -galactosidasa, a galactosa y glucosa; que posteriormente transforman en ácido láctico L (+) por la vía Embden Meyerhof Parnas (EMP). También fermentan fructosa y sacarosa. Finalmente, son también responsables del aroma agradable del producto, por la formación de compuestos carbonilo tales como acetaldehído y diacetilo (32).

LACTOBACILLUS:

Es un género que presenta especies muy importantes como *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus salivarius subsp. bulgaricus* y *Lactobacillus acidophilus*.

Esta última cepa se caracteriza por ser de forma bastonada, gram (+) y homofermentativa, son aerotolerantes y carecen de citocromos y porfirinas, por esta razón son catalasa (-) y oxidasa (-) captan oxígeno por medio de las oxidasas de las flavoproteínas, oxidación usada para producir peróxido de hidrógeno, o

para oxidar el NADH procedente de la deshidrogenación de los azúcares, fermentan la lactosa a lactato en forma casi exclusiva y se ha reportado que pueden utilizar ampliamente la salicina y celobiosa, en menor proporción fructosa y glucosa, pero muy poca manosa y sorbitol (25).

Se le atribuye como hábitat el intestino y las heces de humanos lactantes y adultos, además de animales (10).

Diversos estudios indican que *Lactobacillus acidophilus* tiene efecto hipocolesterolemio y previene diarreas, además de reducir la incidencia de vaginitis (11).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Materiales:

Materia Prima:

Leche de vaca de la raza Holstein, fresca y entera procedente del establo Venturosa del Callao.

Leche de cabra de la raza anglo nubia, fresca y entera, de la ONG "Procabra".

Leche en polvo descremada para preparación de fermento madre.

Insumos:

Fermento láctico mixto, Bio Rich que contiene cepas bien definidas de *Lactobacillus acidophilus* La- 1 *Bifidobacterium lactis* Bb-12 y *Streptococcus thermophilus*, procedente de Dinamarca (Anexo N° 2).

Instrumentos:

Densímetro de leche calibrado a 15° C, butirómetros, termómetros.

Medios de cultivo:

Agar IM-MRS con sucrosa y púrpura de bromocresol.

Agar IM-MRS con glucosa y solución A (dicloxallín).

Agar tripticasa de soya y extracto de levadura al 2%.

Caldo lactosado verde brillante bilis al 2%.

Agar glucosa con oxitetraciclina.

Agar plate count.

Equipos:

- Pasteurizador en Batch, de laboratorio marca Alfa Laval.
- Potenciómetro marca HANNA
- Centrífuga marca Gerber
- Baño María Gerber

- Incubadora METLER
- Autoclave horizontal Cole Palmer.

3.2 Métodos:

3.2.1. ANÁLISIS DE LA MATERIA PRIMA:

Los análisis físicos, químicos y microbiológicos, efectuados a la leche de cabra, de vaca así como a la mezcla de ambas leches en la proporción (1:1) fueron los siguientes:

a) Análisis físicos y Químicos:

- ❖ Determinación de densidad: método usual, NTP 202.008.
- ❖ Acidez: NTP 202.009.
- ❖ Grasa: método Gerber, NTP 202.028.
- ❖ Sólidos no grasos y sólidos totales: método usual, NTP 202.118.
- ❖ PH, para 10 mililitros de muestra con buffer 7, método potenciométrico.
- ❖ Prueba del alcohol, NTP202.030 y Veisseyre (21, 1).
- ❖ Prueba del azul de metileno, NTP 202.014 y Veisseyre (21,1)

b) Análisis Microbiológico:

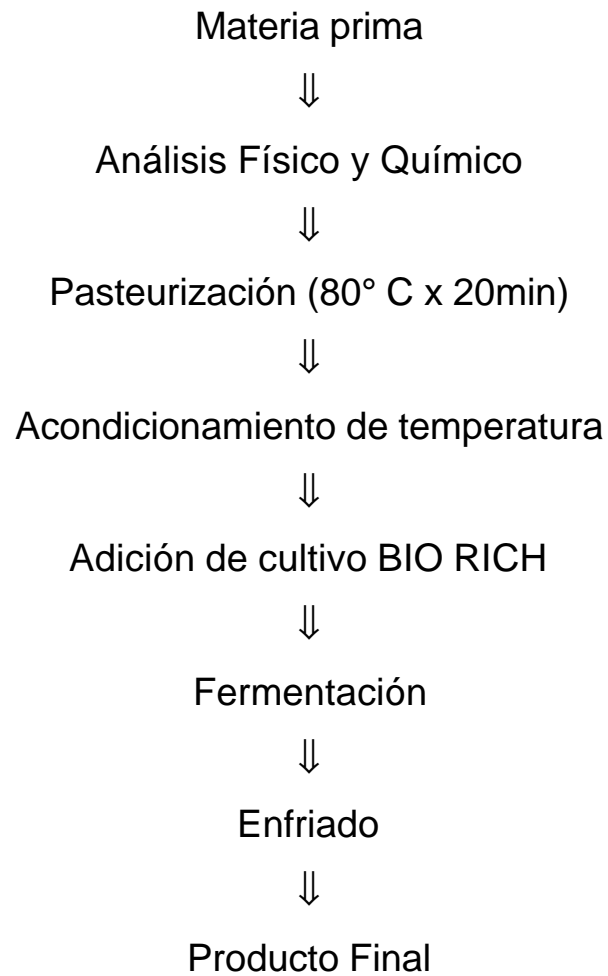
- ❖ Recuento de aerobios mesófilos (21, 33).
- ❖ Recuento de coliformes NTP 202.083.

3.2.2. FERMENTACIÓN:

Para la producción de leche fermentada empleando leche de cabra, de vaca y la mezcla de ambas leches en partes iguales (1:1) se desarrolló el flujo general de operaciones que se expone en el Diagrama N° 1 y las condiciones de experimentación que se señalan en los incisos a), b), c), d), e) f),g) del acápite

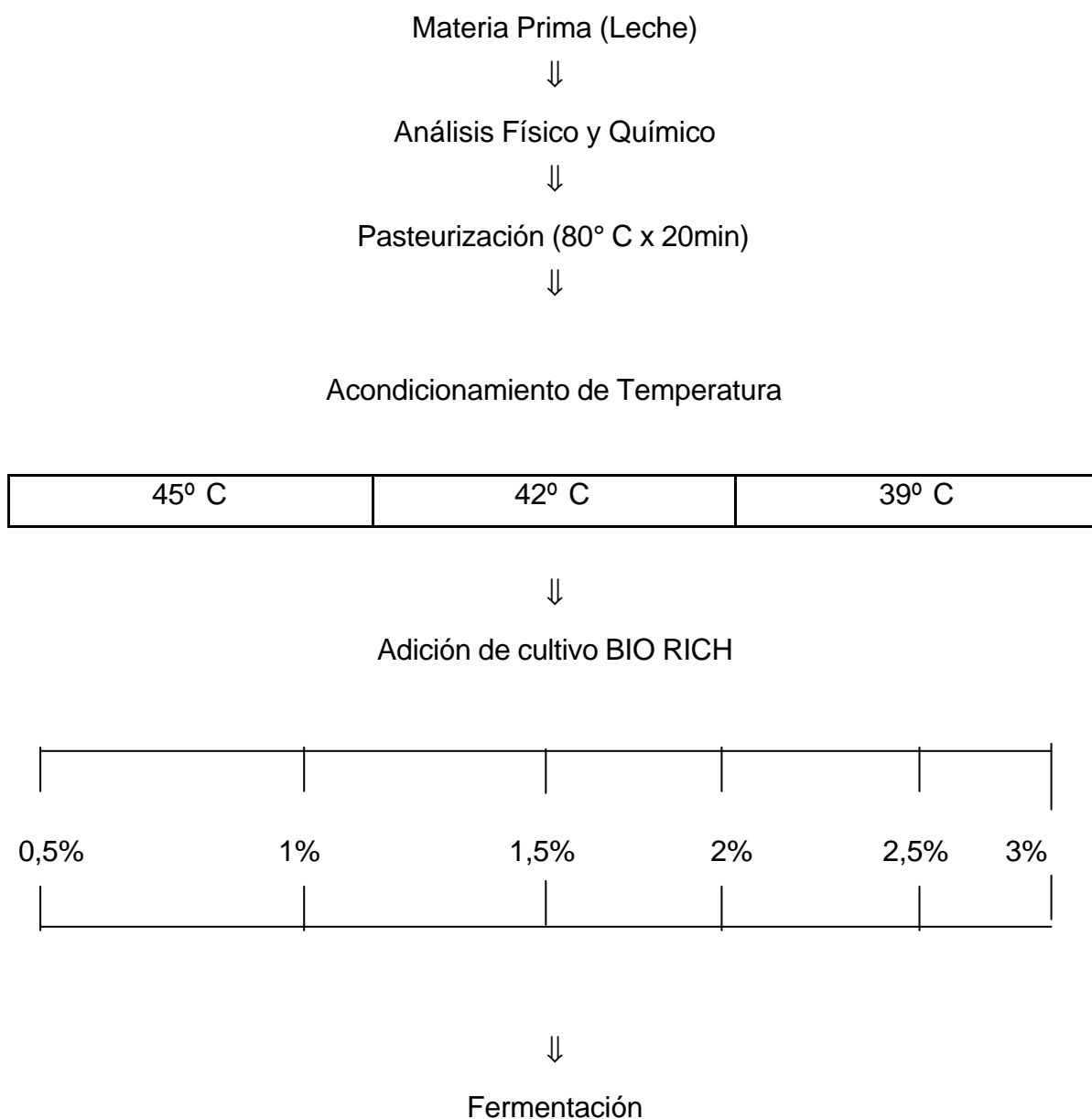
3.2.2. correspondiente a fermentación:

DIAGRAMA N° 1
FLUJO GENERAL PARA LA PRODUCCIÓN DE LECHE
FERMENTADA



a) Se desarrolló cada ensayo experimental de fermentación a las temperaturas de 45° C, 42° C y 39° C con adición del cultivo mixto Bio Rich en porcentajes de inóculo comprendidos entre 0.5 % y 3%, y pH final de proceso de 4,5; de acuerdo al Diagrama N° 2:

DIAGRAMA N° 2
PRUEBAS PARA LA TEMPERATURA DE FERMENTACIÓN Y EL
PORCENTAJE DE INÓCULO



En cada proceso de fermentación experimental se determinó:

- ❖ Acidez (expresada en grados Dornic), NTP 202.009.
- ❖ PH, empleando potenciómetro.
- ❖ Consistencia del gel lácteo (cm.), para una muestra equivalente a 5 mililitros ó 5 gramos, midiendo el grado de desparramamiento, y por triplicado (34).

b) Tiempo de Fermentación: con los resultados obtenidos en el ítem a) en los procesos de fermentación se determinó el tiempo de fermentación total, a pH constante e igual a 4,5 (punto isoeléctrico de las proteínas lácteas).

c) Análisis Sensorial Descriptivo: Se efectuó la evaluación de la calidad estética de los productos fermentados y enfriados a 4^o C de temperatura, en cuanto a las características de olor, sabor, color y consistencia, empleando un método Descriptivo, el cual fue desarrollado por un panel entrenado constituido por 5 jueces.

d) Recuento de Bacterias benéficas: se efectuó los recuentos de *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium lactis* y *Streptococcus thermophilus* (Anexo N^o 1) para determinar la temperatura de proceso a la que dichas bacterias se encontraban en cantidades apropiadas de acuerdo a la norma (19).

e) Análisis de Varianza: mediante un análisis de varianza (ANVA) efectuado a todas las muestras provenientes del ítem d) se pudo determinar si los promedios de la producción de acidez generada a la temperatura de proceso óptima eran iguales o diferían entre sí.

f) Análisis Sensorial de Ranking: El porcentaje óptimo de fermento Bio Rich fue determinado mediante la prueba Sensorial de Ranking, aplicada a 8 jueces entrenados. Las características sensoriales evaluadas fueron sabor, aroma color y consistencia, a un nivel de significación del 5%.

g) Producto final: las mejores muestras resultantes del análisis sensorial de Ranking fueron analizadas en cuanto a sus características físicas, químicas y microbiológicas:

g.1.) Análisis Físico y Químico del producto final: Se analizó en cada producto final:

- ❖ Acidez , NTP 202.009 (21)
- ❖ PH , mediante potenciómetro.
- ❖ Grasa, técnica Gerber , NTP 202.028 (21).
- ❖ Consistencia (34).

g.2.) Análisis microbiológico del producto final: mediante los siguientes análisis:

- ❖ Recuento de *Lactobacillus acidophilus*, ufc/ ml.
- ❖ Recuento de *Streptococcus thermophilus*, ufc/ ml.
- ❖ Recuento de *Bifidobacterium lactis*, ufc/ ml.
- ❖ Coliformes, NTP 202.083
- ❖ Hongos y levaduras, NTP 202.083

Esta secuencia de trabajo se desarrolló en leche de cabra, de vaca y en la mezcla de ambas en la proporción (1:1) con los resultados que se citan a continuación.

IV. RESULTADOS:

4.1 ANÁLISIS DE LA MATERIA PRIMA:

a) ANÁLISIS FÍSICO Y QUÍMICO DE LA MATERIA PRIMA:

La leche de cabra, de vaca y la mezcla de ambas leches en proporción de (1:1) tuvieron los siguientes resultados físico químicos:

CUADRO N° 1: ANÁLISIS FÍSICO Y QUÍMICO DE LA MATERIA PRIMA

CARACTERÍSTICA EVALUADA	TIPO DE LECHE		MEZCLA(1:1)
	CABRA	VACA	CABRA:VACA
Densidad (g / ml.) a 15° C	1,040	1,032	1,035
Acidez (° Dornic)	16	16	16
Grasa (g /100g)	4,3	3,2	3,9
Sólido no grasos (g. /100g)	9,0	8,5	8,6
Sólidos totales (g /100 g)	13,3	11,7	12,5
pH	6,7	6,7	6,7
Prueba del alcohol (68%)	Estable	Estable	Estable
Prueba azul metileno	Buena	Buena	Buena

b) ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE LA MATERIA PRIMA: Los resultados del análisis microbiológico se muestran en el Cuadro N° 2:

CUADRO N° 2: ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE LA MATERIA PRIMA

TIPO DE LECHE	NUMERACIÓN DE AEROBIOS MESÓFILOS VIABLES x 10 ³ (ufc/ml)	COLIFORMES (NMP/g)
Leche de Vaca	340	39
Leche de Cabra	320	75
Leche de Cabra y de Vaca (1:1)	480	93

En cuanto a la numeración de aerobios mesófilos viables se obtuvo valores menores de $1,5 \times 10^6$ ufc/ml (21), en todas las muestras de leche de cabra, de vaca, y la mezcla de ambas en proporción de (1:1), al igual que en coliformes (máximo 10^3 ufc/ml.,según norma INDECOPI 202.001) .

4.2. FERMENTACIÓN:

Durante el proceso de fermentación empleando leche de cabra, de vaca y la mezcla de ambas leches en partes iguales se obtuvo los siguientes resultados:

A) CON LECHE DE CABRA:

En los cuadros siguientes (N° 3 al N° 11) podemos observar los resultados obtenidos al utilizar 0,5%, 1%, 1,5%, 2%, 2,5% y 3% de inóculo del fermento Bio Rich a las temperaturas estudiadas de 45° C, 42° C y 39° C, en términos de la acidez (expresada en grados Dornic), el descenso del pH y la consistencia del gel lácteo.

**CUADRO N° 3:
 PRODUCCION DE ACIDEZ (° D) CON DIFERENTES PORCENTAJES DE
 INÓCULO DEL FERMENTO BIO RICH, EN LECHE DE CABRA A 45° C**

% INÓCULO TIEMPO (minutos)	% INÓCULO					
	0,5	1	1,5	2	2,5	3
0	16,5	16,5	16,5	16,5	16,5	16,5
60	26	27	27	28	28	32
180	65	74	75	82	86	89
270	101	101	102	107	108	103

El rango de acidez obtenida al procesar a 45° C estuvo comprendido entre **101° Dornic** y **108° Dornic**, al variar el porcentaje de inóculo de **0,5% a 3%**, siendo notable la producción de acidez generada por el fermento Bio Rich a la temperatura de proceso del experimento.

CUADRO Nº 4
VARIACIÓN DEL pH CON DIFERENTES PORCENTAJES DE INÓCULO DEL
FERMENTO BIO RICH, EN LECHE DE CABRA A 45° C

TIEMPO (minutos) \ % INÓCULO	0,5	1	1,5	2	2,5	3
0	6,7	6,7	6,7	6,7	6,7	6,7
60	6,5	6,3	6,2	6,1	6,0	6,0
180	5,7	5,4	5	4,9	4,8	4,8
270	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5

El tiempo necesario para que el gel lácteo llegue a pH de 4,5 fue de 270 minutos en todas las muestras, dándose por concluido el proceso de fermentación.

CUADRO Nº 5
VARIACIÓN DE LA CONSISTENCIA (cm.) DE LECHE DE CABRA
FERMENTADA CON DIFERENTES PORCENTAJES DE INÓCULO DEL
FERMENTO BIO RICH, A 45° C

% INÓCULO TIEMPO (minutos)	0,5	1	1,5	2	2,5	3
	0	15	15	15	15	15
60	10,5	10,5	10	10	8	9,5
180	10	10	9,5	8	8,2	7,6
270	6,9	7,5	7	6,8	6,8	6,5

Con leche de cabra fermentada a 45° C la consistencia del gel varió entre 6,5 cm. y 7,5 cm.

Los geles obtenidos fueron blancos y bien estructurados, especialmente cuando el porcentaje de inóculo fue mayor a **1,5%** de cultivo Bio Rich.

CUADRO Nº 6**PRODUCCIÓN DE ACIDEZ (º D) CON DIFERENTES PORCENTAJES DE INÓCULO DEL FERMENTO BIO RICH EN LECHE DE CABRA, A 42º C**

% INÓCULO TIEMPO (minutos)	0,5	1	1,5	2	2,5	3
0	15,5	15,5	15,5	15,5	15,5	15,5
60	18	19	20,5	22	27	31
120	26	28.5	32	36	44	45
240	58	67	71	83	93	91,5
420	95	96	98	100	105	104

En las muestras fermentadas con leche de cabra a 42º C de temperatura e inoculadas con el cultivo Bio Rich entre **0,5% y 3%** se produjo acidez en un rango comprendido entre **95º Dornic** y **105º Dornic**. Se puede observar que el rango de acidez alcanzada fue más bajo que en las muestras procesadas a 45º C y que de 2% a 3% de inóculo del cultivo selecto, la acidez fue igual o superior a 100º Dornic.

CUADRO N° 7
VARIACIÓN DEL pH CON DIFERENTES PORCENTAJES DE INÓCULO
DEL FERMENTO BIO RICH, EN LECHE DE CABRA A 42° C

TIEMPO (minutos)	% INÓCULO					
	0,5	1	1,5	2	2,5	3
0	6,7	6,7	6,7	6,7	6,7	6,7
60	6,6	6,6	6,5	6,5	6,5	6,5
120	6,3	6,1	6,0	5,8	5,9	5,9
240	5,6	5,4	5	5	4,9	4,9
420	4,7	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5

Las muestras mejores que llegaron a pH de corte de 4,5 fueron las adicionadas con **1%** a **3%** de cultivo Bio Rich, conformando geles bien estructurados.

CUADRO Nº 8**VARIACIÓN DE LA CONSISTENCIA (cm.) DE LECHE DE CABRA, FEMENTADA CON DIFERENTES PORCENTAJES DE INÓCULO DEL FERMENTO BIO RICH, A 42º C**

% INÓCULO TIEMPO (minutos)	% INÓCULO					
	0,5	1	1,5	2	2,5	3
0	16	16	15	15	15	15
60	15	15	15	15	15	15
120	11	9,8	9	10,8	9,8	9,7
240	10,8	8,5	6,7	6,7	6,6	6,8
420	7,8	6,7	6,8	6,8	7,0	7,1

A 42º C de temperatura de proceso, la consistencia de los geles lácteos osciló entre 6,7 cm. y 7,8 cm.

CUADRO Nº 9

PRODUCCIÓN DE ACIDEZ (º D) CON DIFERENTES PORCENTAJES DE INÓCULO DEL FERMENTO BIO RICH, EN LECHE DE CABRA A 39 º C

% INÓCULO TIEMPO (minutos)	0,5	1	1,5	2	2,5	3
0	16,5	16,5	16,5	16,5	16,5	16,5
60	17,5	18	19,5	22	23	23
120	27	28	30	29	33	38
300	74	82	86	90	89	91
460	91	93	96	101	103	104

A la temperatura de 39º C la acidez de las muestras varió entre **91º Dornic y 104º Dornic**. La acidez generada por el cultivo mixto a pesar de ser inferior al rango obtenido a 45º C, fue también considerable especialmente entre 2% y 3% de fermento Bio Rich.

CUADRO Nº 10
VARIACIÓN DEL pH CON DIFERENTES PORCENTAJES DE INÓCULO
DEL FERMENTO BIO RICH, EN LECHE DE CABRA A 39º C

INÓCULO % TIEMPO (minutos)	0,5	1	1,5	2	2,5	3
0	6,7	6,7	6,7	6,7	6,7	6,7
60	6,5	6,5	6,5	6,4	6,4	6,4
120	6	6	6	6	6	6
300	5,5	5,3	5,1	5	4,9	4,6
460	4,7	4,7	4,6	4,5	4,5	4,5

En las muestras se logró llegar a pH de corte (4,5) empleando porcentajes de inóculo entre **2% y 3%** en un tiempo de proceso de 460 minutos.

CUADRO N° 11
VARIACION DE LA CONSISTENCIA (cm.) DE LECHE DE CABRA
FERMENTADA CON DIFERENTES PORCENTAJES DE INÓCULO DEL
FERMENTO BIO RICH, A 39° C.

% INÓCULO TIEMPO (minutos)	0,5	1	1,5	2	2,5	3
0	15	15	15	15	16	15
60	14	15	15	14,5	15	15
120	10,4	9,5	10,3	9,8	10,6	11
300	8,8	7,2	8,8	7,8	7,5	7,1
460	7,2	6,8	6,8	7	6,8	6,7

Las muestras procesadas a 39° C con leche de cabra, tuvieron una consistencia que varió entre 6,7 cm. y 7,2 cm.

Seguidamente se muestra el cuadro resumen de los resultados finales de acidez generada por el cultivo Bio Rich en los procesos de fermentación con leche de cabra:

**CUADRO N° 12
ACIDEZ (° D) GENERADA EN EL PRODUCTO FINAL UTILIZANDO LECHE DE CABRA COMO MATERIA PRIMA:**

%INÓCULO	0,5%	1%	1,5%	2%	2,5%	3%
45° C	101	101	102	107	108	103
42° C	95	96	98	100	105	104
39° C	91	93	96	101	103	104

Del cuadro resumen anterior se puede concluir que la mayor acidez fue generada en el producto final al fermentar a 45° C y que cuando la temperatura de proceso descende la acidez es menor, especialmente al adicionar el fermento Bio Rich en bajos porcentajes. Por otro lado, con un porcentaje de inóculo superior a 1,5%, la acidez fue elevada en las tres temperaturas de estudio citadas.

**CUADRO N° 13:
CONSISTENCIA (cm.) DE LOS GELES LÁCTEOS AL FINALIZAR LA FERMENTACIÓN CON LECHE DE CABRA:**

%INÓCULO	0,5%	1%	1,5%	2%	2,5%	3%
45° C	6,9	7,5	7,0	6,8	6,8	6,5
42° C	7,8	6,7	6,8	6,8	7,0	7,1
39° C	7,2	6,8	6,8	7,0	6,8	6,7

De acuerdo a los resultados del cuadro resumen los geles obtenidos fueron mejor estructurados a 45° C que a temperaturas de 42° C y 39° C, mostrando tendencia a romperse y disgregarse.

b) Tiempo de fermentación: Estuvo determinado por el tiempo necesario para llegar al pH de 4,5 llamado pH de corte. Los resultados para las diferentes temperaturas experimentales se citan a continuación:

**CUADRO N° 14:
VARIACIÓN DEL TIEMPO DE FERMENTACIÓN RESPECTO A LA
TEMPERATURA DEL PROCESO (° C) CON LECHE DE CABRA.**

Temperatura de Proceso	Tiempo promedio de Fermentación
45° C	4 horas 30 minutos
42° C	7 horas
39° C	7 horas 40 minutos

Como se puede observar en el cuadro N° 14 a medida que desciende la temperatura de proceso de 45° C hasta 39° C, el tiempo necesario para llegar al pH final de fermentación se incrementa en forma considerable, aproximadamente en un 70%.

c) ANÁLISIS SENSORIAL DESCRIPTIVO: La evaluación sensorial descriptiva se hizo en cuanto a las características de sabor, consistencia, olor y color, con los siguientes resultados.

El **sabor** fue ácido suave y se percibió sensación cremosa en porcentajes de 0,5% y 1% de inóculo en las muestras procesadas con las temperaturas experimentales; siendo más acentuada a 45° C para los inóculos de 1,5% a 3%. Además, la percepción de mayor acidez magnifica el sabor típico de la leche de cabra.

La **consistencia** del gel lácteo fue firme y estructurado cuando se usó las temperaturas de trabajo de 45° C, 42° C y 39° C con inóculos entre 1% y 3% observándose sinéresis de color amarilla.

En cuanto al **olor**, todas las leches fermentadas fueron levemente aromáticas percibiéndose diacetilo, como también el aroma característico de leche de cabra.

Finalmente, el **color** fue blanco en todas las muestras.

d) RECuento DE BACTERIAS BENÉFICAS: En los resultados obtenidos para las tres temperaturas de trabajo y con todos los porcentajes de inóculos se efectuó el recuento de *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium lactis* y *Streptococcus thermophilus*, con los siguientes resultados:

CUADRO Nº 15:
RECuento DE BACTERIAS BENÉFICAS EN LECHE FERMENTADA DE CABRA CON DIFERENTES TEMPERATURAS DE FERMENTACIÓN Y PORCENTAJE DE INÓCULO

%INÓCULO	0,5	1	1,5	2	2,5	3
L.acidophilus (*) °TF=45°C	+	+	+	+	+	+
S.thermophilus(**) °TF=45°C	+	+	+	+	+	+
B.lactis (***) °TF=45°C	-	-	-	-	-	-
L.acidophilus(*) °TF=42°C	+	+	+	+	+	+
S.thermophilus(**) °TF=42°C	+	+	+	+	+	+
B. lactis (***) °TF=42°C	-	+	+	+	+	+
L.acidophilus(*) °TF=39°C	+	+	+	+	+	+
S.thermophilus(**) °TF=39°C	+	+	+	+	+	+
B. lactis (***) °TF=39°C	-	+	+	+	+	+

(*) *Lactobacillus acidophilus*, recuento mayor o igual a 10^7 ufc/ml.

(**) *Streptococcus thermophilus*, recuento mayor o igual a 10^9 ufc/ml.

(***) *Bifidobacterium lactis*, recuento mayor o igual a 10^6 ufc/ml.

°TF : temperatura de fermentación.

De los resultados obtenidos se puede indicar que la temperatura a la que se obtuvo el recuento adecuado de cada bacteria que compone el cultivo Bio Rich en el menor tiempo de proceso fue de 42° C.

e) ANÁLISIS DE VARIANZA: Se desarrolló el análisis de varianza de los procesos que cumplieran con todos los requisitos de las leches fermentadas en el menor tiempo de proceso y pH de 4,5 que para el efecto fue a la temperatura de 42° C; utilizando leche de cabra como materia prima con los siguientes resultados para tres repeticiones:

CUADRO Nº 16
ANVA DE LA PRODUCCIÓN DE ACIDEZ (º D) CON PORCENTAJES DE FERMENTO BIO RICH ENTRE 0,5% Y 3% EN LECHE DE CABRA, A 42º C

Fuente de Variación	Suma Cuadrados	Grados Libertad	Cuadrado Medio	F
Entre Tratamientos	500,46	5	100,09	Fc = 200,18
Dentro Tratamientos	6,04	12	0.50	Ft = 3,11
Total	506,50			

Del análisis de varianza y la Prueba de F se concluye que el promedio de la acidez producida en las muestras procesadas a 42° C, con porcentajes de inóculo entre 0,5% y 3% no fueron iguales, con un nivel de significación del 5%. La prueba tstudent determinó que el promedio de la acidez de las muestras con 2,5% y 3% eran iguales, mientras que los promedios de acidez de las muestras adicionadas con 0,5%, 1%, 1,5% y 2% eran diferentes, con un nivel de significación del 5%.

f) ANÁLISIS SENSORIAL DE RANKING: Con las muestras procesadas a 42° C se determinó el porcentaje óptimo de fermento Bio Rich añadido a leche de cabra. El análisis estético fue desarrollado de acuerdo a los aspectos sabor, consistencia, color y aroma, por 8 jueces entrenados aplicando el método de Ranking.

CUADRO Nº 17
EVALUACIÓN SENSORIAL DE LECHE DE CABRA FERMENTADA A 42° C
CON DIFERENTES PORCENTAJES DE FERMENTO BIO RICH, MEDIANTE EL
MÉTODO DE RANKING.

% inóculo \ Característica	0,5%	1%	1,5%	2%	2,5%	3%
Sabor	17	13	18	34	39	47
Consistencia	18	15	15	36	39	45
Aroma	18	14	16	38	38	44
Color	16	16	16	35	39	46

En la tabla de Ranking con un nivel de significación del 5% correspondió el par 17 – 39, para 6 tratamientos y 8 repeticiones. La evaluación de los jueces indicó que la mejor muestra fue aquella procesada con 1% de fermento Bio Rich por presentar valores inferiores a 17 en todas las características evaluadas.

g) PRODUCTO FINAL: Las mejores muestras de leche de cabra fermentada a 42° C y adicionadas de 1% de fermento Bio Rich tuvieron las siguientes características:

g.1) ANÁLISIS FÍSICO QUÍMICO: Los resultados de la evaluación fisicoquímica se muestran en el siguiente cuadro.

CUADRO N° 18
ANÁLISIS FÍSICO QUÍMICO DE LECHE DE CABRA FERMENTADA A 42° C Y
1 % DE FERMENTO BIO RICH.

ITEM	RESULTADO
Acidez (° Dornic)	93
pH	4,5
Grasa (%)	4,5
Consistencia del Gel (cm.)	6,7

De los resultados obtenidos se puede decir que la mejor muestra cumple con los requisitos obligados por las normas internacionales (19).

g.2) ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO: La calidad microbiológica de las muestras de leche de cabra fermentadas a 42° C y 1% de cultivo Bio Rich fueron analizadas en cuanto a las bacterias probióticas: *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium lactis* además de *Streptococcus thermophilus*. Para evaluar la calidad sanitaria se detectó coliformes, hongos y levaduras, con los resultados siguientes:

CUADRO N° 19
ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE LECHE DE CABRA FERMENTADA A 42° C
CON 1% DE FERMENTO BIO RICH

RECUESTO MICROBIANO	RESULTADO
Hongos y Levaduras	Ausencia
Coliformes (NMP)	<3 UFC / ml.
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	2,4x 10 ⁷ ufc/ml
<i>Streptococcus thermophilus</i>	3 x 10 ⁹ ufc/ml
<i>Bifidobacterium lactis</i>	10 ⁶ ufc/ml

De los resultados obtenidos en el cuadro anterior se puede concluir que la muestra procesada a 42° C y 1% de fermento Bio Rich contenía las bacterias probióticas en cantidades adecuadas y de acuerdo a las normas internacionales, encontrándose libre de microorganismos que representen peligro para la salud del consumidor (19, 21).

B. CON LECHE DE VACA:

Se ensayó los siguientes porcentajes de inóculo: 0,5%, 1%, 1,5%, 2%, 2,5% y 3% en los procesos de fermentación con temperatura constante e igual a 45° C, 42° C y 39° C.

En los cuadros N° 20 al Cuadro N° 28, se detalla la acidez generada (expresada en ° Dornic), el descenso del pH y la consistencia del gel lácteo.

CUADRO Nº 20
PRODUCCIÓN DE ACIDEZ (º D) CON DIFERENTES PORCENTAJES DE
INÓCULO DEL FERMENTO BIO RICH, EN LECHE DE VACA A 45º C

% INÓCULO	0,5	1	1,5	2	2,5	3
TIEMPO (minutos)						
0	16	16	16	16	16	16
60	19	19	20	26	33	39
120	29	34	37	39	47	56
210	70	72	76	76	78	82

De los resultados obtenidos se observa que empleando leche de vaca adicionada con fermento Bio Rich a 45º C como temperatura de proceso, el cultivo produjo acidez en un rango comprendido entre 70º Dornic y 82º Dornic.

CUADRO N° 21
VALORES DE pH CON DIFERENTES PORCENTAJES DE INÓCULO DEL
FERMENTO BIO RICH, EN LECHE DE VACA A 45° C

TIEMPO (minutos) \ INÓCULO %	0,5	1	1,5	2	2,5	3
0	6,7	6,7	6,7	6,7	6,6	6,6
60	6,5	6,6	6,3	6,4	6,3	6,0
120	6,12	5,8	5,9	5,6	5,4	5,3
210	4.83	4.8	4.7	4.5	4.5	4.5

El valor de pH de **4,5** determinó el final del proceso de fermentación, que a la temperatura de 45° C correspondió aproximadamente a 210 minutos.

CUADRO N° 22

VARIACIÓN DE LA CONSISTENCIA (cm.) DE LECHE DE VACA FERMENTADA CON DIFERENTES PORCENTAJES DE INÓCULO DEL FERMENTO BIO RICH, A 45° C.

TIEMPO (minutos) \ INÓCULO %	0,5	1	1,5	2	2,5	3
0	15	15	15	15	15	15
60	14	14,2	13,8	13,6	13,4	13,2
120	10,9	11,3	11,5	10,5	8,5	6,0
210	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,2

Al concluir el proceso de fermentación, los geles correspondientes a las muestras procesadas con leche de vaca a 45° C estuvieron muy bien estructurados y consistentes, en un rango comprendido entre 4,5 cm. y 4,2 cm. siendo de color crema.

CUADRO N° 23**PRODUCCIÓN DE ACIDEZ (° D) CON DIFERENTES PORCENTAJES DE INÓCULO DEL FERMENTO BIO RICH, EN LECHE DE VACA A 42° C**

% INÓCULO TIEMPO (minutos)	0,5	1	1,5	2	2,5	3
0	16	16	16	16	16,5	16,5
120	19	21	22	22	23	25
180	34	36	35	35	40	48,5
240	54	61	63	63	62	68

En el presente cuadro podemos apreciar que el rango de acidez generado cuando se fermentó leche de vaca adicionada del cultivo Bio Rich _ entre 0,5% y 3% _ y a la temperatura de 42° C fue de 54° Dornic a 68° Dornic.

CUADRO Nº 24**VALORES DE pH CON DIFERENTES PORCENTAJES DE INÓCULO DEL FERMENTO BIO RICH EN LECHE DE VACA, A 42º C**

% INÓCULO TIEMPO (minutos)	0,5	1	1,5	2	2,5	3
0	6,7	6,7	6,7	6,7	6,7	6,7
120	6,3	6,2	6,2	6,0	6,0	6,0
180	5,6	5,5	5,5	5,4	5,4	5,3
240	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5

Las muestras procesadas a 42º C llegaron a pH de corte de 4,5 transcurridos 240 minutos de tiempo de proceso, constituyendo geles muy bien estructurados.

CUADRO Nº 25**VARIACIÓN DE LA CONSISTENCIA (cm.) DE LECHE DE VACA FERMENTADA CON DIFERENTES PORCENTAJES DE INÓCULO DEL FERMENTO BIO RICH, A 42° C**

TIEMPO (minutos) \ % INÓCULO	0,5	1	1,5	2	2,5	3
0	14,5	15	15	14	14	14
120	13	13	13	12	12	12
180	6,8	6,8	6,7	6,3	5,9	5,8
240	5,5	5,5	5,3	5,6	6,0	5,8

Cuando se empleó como temperatura de proceso 42° C la consistencia de los geles lácteos varió entre 5,3 cm. y 6,0 cm.

CUADRO Nº 26

PRODUCCIÓN DE ACIDEZ (º D) CON DIFERENTES PORCENTAJES DE INÓCULO DEL FERMENTO BIO RICH EN LECHE DE VACA, A 39º C

TIEMPO (minutos)	% INÓCULO					
	0,5	1	1,5	2	2,5	3
0	16	16	16	16,5	16,5	16,5
120	19	19	22	23	29	32
180	43	44	47	46	50	54
240	56	61	60	63	65	66

Como puede observarse en las muestras procesadas con leche de vaca a la temperatura de 39º C, el rango de acidez desarrollado por el fermento Bio Rich fue de 56º Dornic a 66º Dornic.

CUADRO Nº 27**VALORES DE pH CON DIFERENTES PORCENTAJES DE INÓCULO DEL FERMENTO BIO RICH EN LECHE DE VACA, A 39° C**

% INÓCULO TIEMPO (minutos)	0,5	1	1,5	2	2,5	3
0	6,7	6,7	6,7	6,7	6,7	6,7
120	6,5	6,5	6,5	6,4	5,8	5,5
180	5,4	5,4	5,3	5,0	5,0	4,8
240	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5

El pH de corte de 4,5 se produjo en aproximadamente 240 minutos, siendo este el tiempo de proceso a 39° C.

CUADRO Nº 28**VARIACIÓN DE LA CONSISTENCIA (cm.) DE LECHE DE VACA FERMENTADA CON DIFERENTES PORCENTAJES DE INÓCULO DEL FERMENTO BIO RICH, A 39º C**

TIEMPO (minutos) \ % INÓCULO	0,5	1	1,5	2	2,5	3
0	15	15	15	15	15	15
120	13	13	14	13	13	13
180	10,3	10	9,5	9,3	8,7	8,5
240	8	7,5	6,8	5,9	5,8	6,4

La consistencia obtenida en las muestras de leche de vaca fermentada a 39º C varió de 5,8 cm. a 8 cm. En estas muestras los geles estuvieron bien estructurados, sin embargo al hacer las mediciones de la consistencia, tendían a romperse con más facilidad que a las otras dos temperaturas de trabajo estudiadas.

A continuación se presenta el cuadro resumen de los resultados finales para la acidez y la consistencia del gel lácteo formado al procesar con leche de vaca.

CUADRO N° 29
ACIDEZ (° D) GENERADA EN EL PRODUCTO FINAL UTILIZANDO LECHE DE VACA COMO MATERIA PRIMA

%INÓCULO	0,5%	1%	1,5%	2%	2,5%	3%
45° C	70	72	76	76	78	82
42° C	54	61	63	63	62	68
39° C	56	61	60	63	65	66

De los datos del cuadro anterior se concluye que la acidez generada a 45° C sobrepasa ampliamente el valor mínimo de acidez recomendado en el producto final que es de 60° Dornic (19), pero no así al adicionar 0,5% de fermento Bio Rich a 42° C y 39° C.

CUADRO N° 30
CONSISTENCIA (cm.) DE LOS GELES LÁCTEOS AL FINALIZAR LA FERMENTACIÓN CON LECHE DE VACA

%INÓCULO	0,5%	1%	1,5%	2%	2,5%	3%
45° C	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,2
42° C	5,5	5,5	5,3	5,6	6,0	5,8
39° C	8,0	7,5	6,8	5,9	5,8	6,4

En este cuadro resumen se puede observar que al descender la temperatura de proceso de 45° C a 39° C los geles a pesar de estar muy bien estructurados muestran tendencia a la ruptura, por lo que las lecturas de consistencia presentan un rango mayor.

b) TIEMPO DE FERMENTACIÓN: El proceso de fermentación de leche de vaca a las diferentes temperaturas de trabajo y porcentajes de inóculo del fermento selecto _ de 0,5% a 3%_ fue concluido a pH de corte de 4,5. El tiempo de fermentación varió de acuerdo a la temperatura del experimento tal como se indican a continuación:

CUADRO N° 31
VARIACIÓN DEL TIEMPO DE FERMENTACIÓN RESPECTO A LA
TEMPERATURA DEL PROCESO (° C), CON LECHE DE VACA

Temperatura del proceso (° C)	Tiempo promedio de fermentación
45° C	3 horas 30 minutos
42° C	4 horas
39° C	4 horas

En el cuadro anterior podemos observar que variando la temperatura de trabajo de 42° C a 39° C el proceso de fermentación transcurrió en 4 horas mientras que a 45° C de temperatura el tiempo requerido se redujo en media hora.

c) ANÁLISIS SENSORIAL DESCRIPTIVO: La evaluación de las características de sabor, olor, consistencia y color correspondientes a la calidad estética del producto fue determinada por 5 jueces entrenados, mediante el método descriptivo. Los resultados se indican a continuación:

El **sabor** fue evaluado a través de la acidez, la cual fue suave con 0,5% de fermento y para todas las temperaturas de proceso. Cremosas y de acidez persistente en el paladar a 45° C y 42° C con porcentajes de inóculo entre 1% y 3%; y de acidez acentuada entre 1% y 3% a 39° C.

En cuanto a la **consistencia** el gel fue muy bien conformado y con sinéresis amarilla a temperaturas de 45° C y 42° C desde 1,5% a 3% de fermento Bio Rich, y a 39° C entre 2% y 3%; siendo frágiles entre 0,5% y 1% en todas las temperaturas; sin observarse sinéresis.

El **aroma** fue a diacetilo en todos los porcentajes experimentados a temperaturas entre 39° C y 45° C.

Finalmente, el **color** de las leches fermentadas fue crema en todos los casos.

d) RECUENTO DE BACTERIAS BENÉFICAS:

En los resultados obtenidos para las tres temperaturas de trabajo y con todos los porcentajes de inóculos se efectuó el recuento de *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium lactis* y *Streptococcus thermophilus*, con los siguientes resultados:

**CUADRO Nº 32:
RECUENTO DE BACTERIAS BENÉFICAS EN LECHE FERMENTADA DE VACA CON DIFERENTES TEMPERATURAS DE FERMENTACIÓN Y PORCENTAJE DE INÓCULO**

%INÓCULO	0,5	1	1,5	2	2,5	3
L.acidophilus (*) °TF=45° C	-	-	-	+	-	+
S.thermophilus(**) °TF=45° C	-	-	-	-	-	-
B.lactis (***) °TF=45° C	-	-	-	+	+	+
L.acidophilus(*) °TF=42° C	-	+	+	+	+	+
S.thermophilus(**) °TF=42° C	-	-	-	-	-	-
B. lactis (***) °TF=42° C	-	-	+	+	+	+
L.acidophilus(*) °TF=39° C	+	+	+	+	+	+
S.thermophilus(**) °TF=39° C	+	+	+	+	+	+
B. lactis (***) °TF=39° C	+	+	+	+	+	+

(*) *Lactobacillus acidophilus*, recuento mayor o igual a 10^7 ufc/ml.

(**) *Streptococcus thermophilus*, recuento mayor o igual a 10^9 ufc/ml.

(***) *Bifidobacterium lactis*, recuento mayor o igual a 10^6 ufc/ml.

°TF : Temperatura de fermentación.

De los resultados obtenidos se observa que la temperatura que permitió el crecimiento adecuado de las tres bacterias benéficas empleadas fue de 39° C.

e) ANÁLISIS DE VARIANZA: El análisis de varianza de las muestras procesadas con leche de vaca a 39° C, tuvo los siguientes resultados:

CUADRO N° 33
ANVA DE LA PRODUCCIÓN DE ACIDEZ (° D) CON PORCENTAJES DE
FERMENTO BIO RICH ENTRE 0,5% Y 3%, EN LECHE DE VACA A 39° C

Fuente de Variación	Suma Cuadrados	Grados Libertad	Cuadrado Medio	F
Entre Tratamientos	200,46	5	40,09	Fc =121,48
Dentro Tratamientos	4,04	12	0,33	Ft =3,11
Total	204,50			

Como la prueba de F correspondiente resultó significativa ($\alpha = 5\%$) se evaluó cada par de medias con la distribución t- student con un nivel de significación del 5%. Los resultados del análisis de cada par de medias determinó que el promedio de la acidez generada con 2,5% y 3% de fermento eran iguales, así como el promedio de acidez producido al adicionar 1% y 1,5% de cultivo Bio Rich;

pero diferían entre sí los promedios de acidez obtenidos al adicionar 0,5% y 1%, 1,5% y 2%, 2% y 2,5% de cultivo Bio Rich, con un nivel de significación del 5%.

f) ANÁLISIS SENSORIAL DE RANKING: Posteriormente, las muestras resultantes del proceso de fermentación a 39° C y con adición de cultivo Bio Rich entre 0,5% y 3%, fueron evaluadas sensorialmente por el método de Ranking, a fin de que los jueces determinen el porcentaje óptimo de adición de cultivo Bio Rich. Los resultados se presentan a continuación:

CUADRO Nº 34
EVALUACIÓN SENSORIAL DE LECHE DE VACA FERMENTADA A 39° C CON DIFERENTES PORCENTAJES DE FERMENTO BIO RICH, MEDIANTE EL MÉTODO DE RANKING

% INÓCULO CARACT.	0,5%	1%	1,5%	2%	2,5%	3%
Sabor	46	40	34	14	15	18
Consistencia	46	35	39	12	15	21
Aroma	46	36	38	14	14	20
Color	46	39	35	14	15	19

Con la tabla de Ranking y un nivel de significación del 5%, se ubicó el par (17-39) para 6 tratamientos y 8 repeticiones. Los puntajes asignados por los jueces, determinó que la mejor muestra fue la procesada con leche de vaca, a 39° C y adicionada de 2% de fermento Bio Rich.

g) PRODUCTO FINAL: Los resultados de la evaluación físico química y microbiológica de las muestras procesadas con el porcentaje óptimo de inóculo fueron los siguientes:

g.1) ANÁLISIS FÍSICO QUÍMICO: En el Cuadro N° 35 se detalla los resultados de las evaluaciones físicas y químicas de las muestras de leche de vaca fermentada con 2% de cultivo Bio Rich a 39° C.

CUADRO N° 35
ANÁLISIS FÍSICO QUÍMICO DE LECHE DE VACA FERMENTADA A 39° C
ADICIONADA DE 2% DE FERMENTO BIO RICH.

CARACTERÍSTICA	RESULTADO
Acidez (°D)	63
pH	4,5
Grasa (%)	3,2
Consistencia del Gel (cm.)	5,9

Como se observa del cuadro anterior la leche de vaca procesada a 39° C y adicionada de 2% de cultivo Bio Rich cumple con el requisito físico químico de acidez mayor a 60° Dornic, pH de 4,5 lo que indica que se concluyó el proceso de fermentación, 3,2% de grasa correspondiente a un producto entero o integral y de buena consistencia.

g.2) ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO: La calidad microbiológica de las muestras de leche de vaca fermentadas a 39° C y adicionadas de 2% de cultivo Bio Rich fue analizada en cuanto a coliformes, hongos y levaduras, así como a las bacterias benéficas presentes en el fermento Bio Rich con los siguientes resultados:

CUADRO N° 36

ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE LECHE DE VACA FERMENTADA A 39° C ADICIONADA DE 2% DE FERMENTO BIO RICH

RECUENTO MICROBIANO	RESULTADO
Hongos y Levaduras	Ausencia
Coliformes	< 3 ufc/ml
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	8×10^7 ufc/ml
<i>Streptococcus thermophilus</i>	8×10^9 ufc/ml
<i>Bifidobacterium lactis</i>	5×10^6 ufc/ml

De los resultados microbiológicos obtenidos se puede indicar que la leche de vaca fermentada con 2% de cultivo Bio Rich a 39° C cumple con los requisitos microbiológicos recomendados por las normas internacionales y posee la cantidad de microorganismos benéficos suficientes para ser denominada leche fermentada de vaca (19).

C. CON MEZCLA DE LECHE DE CABRA Y VACA (1:1):

La mezcla de leches de cabra y vaca en partes iguales fue inoculada con fermento Bio Rich (entre 0,5% a 3%), a las temperaturas de 45° C, 42° C, y 39° C. La evolución de la acidez, pH y consistencia de los productos resultantes se exponen a continuación en los Cuadros N° 37 al Cuadro N° 45.

CUADRO Nº 37
PRODUCCIÓN DE ACIDEZ (º D) CON DIFERENTES PORCENTAJES DE
INÓCULO DEL FERMENTO BIO RICH EN LECHE DE CABRA Y VACA (1:1), A
45º C

INÓCULO % TIEMPO (minutos)	0,5	1	1,5	2	2,5	3
0	16	16	16	16	16	16,5
60	27	26	27	27	26	30
120	46	41	49	44	45	53
180	77	69	84	81	77	76
240	82	82	86	91	96	98

La mezcla de leche de cabra y vaca en proporciones iguales y fermentada a 45º C con el cultivo Bio Rich produjo entre 82º Dornic y 98º Dornic de acidez.

CUADRO Nº 38
VALORES DE pH CON DIFERENTES PORCENTAJES DE INÓCULO DEL
FERMENTO BIO RICH EN LECHE DE CABRA Y VACA (1:1), A 45º C

INÓCULO % TIEMPO (minutos)	0,5	1	1,5	2	2,5	3
0	6,7	6,7	6,7	6,7	6,7	6,6
60	6,2	6,2	6,1	6,2	6,2	6,1
120	5,7	5,6	5,5	5,6	5,6	5,4
180	4,9	5,1	4,8	4,9	5,0	4,9
240	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5

Como se puede observar en el cuadro anterior, todas las muestras procesadas a 45° C llegaron a pH de 4,5 en 240 minutos.

CUADRO Nº 39
VARIACIÓN DE LA CONSISTENCIA (cm.) DE LECHE DE CABRA Y VACA
(1:1) FERMENTADA CON DIFERENTES PORCENTAJES DE INÓCULO DEL
FERMENTO BIO RICH, A 45° C

% INÓCULO TIEMPO (minutos)	0,5	1	1,5	2	2,5	3
0	16	15,8	16,3	16	15,9	15,5
60	14,9	15,3	15,7	14,9	15,7	15,0
120	12,6	12,9	13,1	12,3	11,4	10
180	10	7,7	8,1	8,1	8,3	8,2
240	6,5	6,0	6,2	6,1	6,5	6,5

De acuerdo al cuadro anterior el rango de consistencia definido por las muestras procesadas a 45° C osciló entre 6,0 cm. y 6,5 cm.

CUADRO Nº 40
PRODUCCIÓN DE ACIDEZ (º D) CON DIFERENTES PORCENTAJES DE
INÓCULO DEL FERMENTO BIO RICH EN LECHE DE CABRA Y VACA (1:1), A
42º C

TIEMPO (minutos)	% INÓCULO					
	0,5	1	1,5	2	2,5	3
0	16	16	16	16	16	16,5
60	20,5	22	25	24	24	25
120	25	26	32	38	38	43
240	74	81	82	87	88	84

Al fermentar leche de cabra y de vaca en iguales proporciones a 42º C con el cultivo Bio Rich se produjo acidez en un rango comprendido entre 74º Dornic y 88º Dornic .

CUADRO Nº 41
VALORES DE pH CON DIFERENTES PORCENTAJES DE INÓCULO DEL
FERMENTO BIO RICH EN LECHE DE CABRA Y VACA (1:1) , A 42º C

TIEMPO (minutos)	% INÓCULO					
	0,5	1	1,5	2	2,5	3
0	6,7	6,7	6,7	6,7	6,7	6,7
60	6,2	6,2	6,1	6,1	6,0	6,1
120	6,1	6,1	5,9	5,7	5,5	5,8
240	4,8	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5

En el cuadro anterior podemos apreciar que las muestras fermentadas a 42º C con porcentajes de inóculo del fermento Bio Rich entre 1% y 3%, llegaron a pH de corte de **4,5** en 240 minutos.

CUADRO Nº 42
VARIACIÓN DE LA CONSISTENCIA (cm.) DE LECHE DE CABRA Y VACA
(1:1) FERMENTADA CON DIFERENTES PORCENTAJES DE INÓCULO DEL
FERMENTO BIO RICH, A 42° C

% INÓCULO TIEMPO (minutos)	0,5	1	1,5	2	2,5	3
0	16,3	16,1	15,9	15,8	16,2	16
60	15,8	15,7	15,9	16,1	16,3	16,1
120	14,8	14,9	15,2	14,7	14,5	14,8
240	7,7	6,4	6,0	6,0	6,5	6,0

En este caso y de los resultados obtenidos podemos establecer que al procesar leche de cabra y de vaca mezcladas en proporciones iguales y a 42° C con el cultivo selecto, el rango de consistencia fue de 7,7 cm. a 6,0 cm.

CUADRO Nº 43
PRODUCCIÓN DE ACIDEZ (° D) CON DIFERENTES PORCENTAJES DE
INÓCULO DEL FERMENTO BIO RICH EN LECHE DE CABRA Y VACA (1:1), A
39° C

% INÓCULO TIEMPO (minutos)	0,5	1	1,5	2	2,5	3
0	16	16	16	16	16	16,5
60	18	21	22	23	22	24
120	21,5	27	29	28	32	37
180	38	53	61	57	63	68
265	71	78	76	79	88	86

Por los resultados obtenidos en el cuadro anterior se puede decir que el rango de acidez conseguido al procesar a 39° C leche de cabra y de vaca en iguales proporciones fue de 71° Dornic a 88° Dornic.

CUADRO N° 44
VALORES DE pH CON DIFERENTES PORCENTAJES DE INÓCULO DEL
FERMENTO BIO RICH EN LECHE DE CABRA Y VACA (1:1), A 39° C

% INÓCULO TIEMPO (minutos)	0,5	1	1,5	2	2,5	3
0	6,7	6,7	6,7	6,7	6,7	6,7
60	6,6	6,2	6,2	6,2	6,2	6,1
120	6,1	5,9	5,8	5,9	5,8	5,5
180	5,6	5,0	4,9	5,0	4,8	4,7
265	4,7	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5

En el cuadro N° 42 puede observarse que las muestras de leche fermentada de cabra y vaca (1:1) adicionadas con cultivo Bio Rich entre 1% y 3% llegaron a pH de **4,5** en 265 minutos.

CUADRO N° 45
VARIACIÓN DE LA CONSISTENCIA (cm.) DE LECHE DE CABRA Y VACA
(1:1) FERMENTADA CON DIFERENTES PORCENTAJES DE INÓCULO DEL
FERMENTO BIO RICH, A 39° C

TIEMPO (minutos)	% INÓCULO					
	0,5	1	1,5	2	2,5	3
0	15	15	15	15	15	15
60	15	15	15,3	15,4	15	15
120	13	13	14	14	13	10,1
180	9,3	10	11	11	9,0	7,0
265	7,7	7,2	7,5	7,2	6,2	6,0

De acuerdo al presente cuadro la consistencia de los geles lácteos de las muestras varió entre 7,7,cm. y 6,0 cm. al ser procesadas a 39° C.

A continuación se muestra los cuadros resumen que contienen los resultados finales para la generación de acidez y consistencia de los geles lácteos.

CUADRO N° 46
ACIDEZ (° D) GENERADA EN EL PRODUCTO FINAL UTILIZANDO LECHE DE
CABRA Y VACA (1:1) COMO MATERIA PRIMA

%INÓCULO	0,5%	1%	1,5%	2%	2,5%	3%
45° C	82	82	86	91	96	98
42° C	74	81	82	87	88	84
39° C	71	78	76	79	88	86

Como podemos apreciar se obtuvo en las muestras finales valores de acidez mayores a 60° Dornic, con las tres temperaturas de trabajo y los diferentes porcentajes de cultivo Bio Rich.

CUADRO N° 47**CONSISTENCIA (cm.) DE LOS GELES LÁCTEOS AL FINALIZAR LA FERMENTACIÓN CON LECHE DE CABRA Y VACA (1:1)**

%INÓCULO	0,5%	1%	1,5%	2%	2,5%	3%
45° C	6,5	6,0	6,2	6,1	6,5	6,5
42° C	7,7	6,4	6,0	6,0	6,5	6,0
39° C	7,7	7,2	7,5	7,2	6,2	6,0

En estos casos la consistencia de los geles lácteos fue mayor y mejor estructurado a 45° C, pero también cuando el porcentaje de inóculo añadido a la leche a fermentarse varió de 2% a 3%.

b) TIEMPO DE FERMENTACIÓN: Por otro lado el tiempo de proceso requerido para llegar al pH de 4,5 a las diferentes temperaturas de trabajo, se citan en el siguiente cuadro.

CUADRO N° 48**VARIACIÓN DEL TIEMPO DE FERMENTACIÓN RESPECTO A LA TEMPERATURA DEL PROCESO (° C) CON LECHE DE CABRA Y VACA (1:1)**

Temperatura de Proceso	Tiempo promedio de Fermentación
45° C	4 horas
42° C	4 horas
39° C	4 horas 25 minutos

En este cuadro podemos observar que a 45° C y 42° C el tiempo de proceso fue de 4 horas, mientras que a 39° C requirió aproximadamente 25 minutos más.

c) ANÁLISIS SENSORIAL DESCRIPTIVO: Con los resultados obtenidos empleando las diferentes temperaturas y porcentajes de fermento Bio Rich se desarrolló la evaluación sensorial Descriptiva de acuerdo a las características ya propuestas, como son: sabor, consistencia, olor y color.

El **sabor** se percibió ácido y cremoso en porcentajes de 0,5% y 1% empleando la temperatura de proceso de 45° C y hasta el porcentaje de 1,5% a 42° C. Sin embargo se sintieron más ácidos, cremosos y con sabor a leche de cabra cuando

el porcentaje de inóculo fue entre 2% y 3% al procesar a 45° C, 42° C y entre 2,5% y 3% de fermento selecto a 39° C. Estos resultados indicarían que al generar valores de acidez mayores es posible detectar el típico sabor de la leche de cabra, empleando mezclas de leches (cabra y vaca al 50%), lo que no ocurrió al añadir el porcentaje de fermento de 1%.

En cuanto al ítem **consistencia**, el gel lácteo estuvo muy bien estructurado en las muestras procesadas a 45° C, valorándose como bien estructuradas aquellas que fueron trabajadas con inóculos entre 0,5% y 3% a 45° C, y de 1% a 3% las fermentadas a 42° C, así como aquellas adicionadas de 2% a 3% de fermento y cultivadas a 39° C. A temperaturas de 39° C y entre 0,5% y 1,5%, los geles fueron frágiles; con suero amarillo claro cuando el porcentaje de inóculo osciló entre 2% y 3%, e incoloro cuando el inóculo fue igual o menor a 1,5% en todas las temperaturas de trabajo.

Por otro lado, el **aroma** fue a ácido y a diacetilo en todas las muestras procesadas a 45° C y 42° C, tornándose más tenues en las muestras fermentadas a 39° C.

Finalmente, todos los geles evaluados fueron de **color** blanco.

d) RECuento DE BACTERIAS BENÉFICAS: En los resultados obtenidos para las tres temperaturas de trabajo y con todos los porcentajes de inóculo se efectuó el recuento de *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium lactis* y *Streptococcus thermophilus*, con los siguientes resultados:

**CUADRO N° 32:
 RECUENTO DE BACTERIAS BENÉFICAS EN MEZCLA DE LECHE DE CABRA
 Y DE VACA (1:1) FERMENTADA A DIFERENTES TEMPERATURAS DE
 FERMENTACIÓN Y PORCENTAJE DE INÓCULO**

%INÓCULO	0,5	1	1,5	2	2,5	3
L.acidophilus (*) °TF=45° C	-	-	+	+	+	+
S.thermophilus(**) °TF=45° C	-	+	+	+	+	+
B.lactis (***) °TF=45° C	-	-	-	+	+	+
L.acidophilus(*) °TF=42° C	+	+	+	+	+	+
S.thermophilus(**) °TF=42° C	+	+	+	+	+	+
B. lactis (***) °TF=42° C	+	+	+	+	+	+
L.acidophilus(*) °TF=39° C	+	+	+	+	+	+
S.thermophilus(**) °TF=39° C	+	+	+	+	+	+
B. lactis (***) °TF=39° C	+	+	+	+	+	+

(*) *Lactobacillus acidophilus*, recuento mayor o igual a 10^7 ufc/ml.

(**) *Streptococcus thermophilus*, recuento mayor o igual a 10^9 ufc/ml.

(***) *Bifidobacterium lactis*, recuento mayor o igual a 10^6 ufc/ml.

°TF : temperatura de fermentación.

De los datos obtenidos se puede indicar que la temperatura óptima de proceso fue de 42° C, por permitir el crecimiento adecuado de las tres bacterias benéficas en el menor tiempo de proceso.

e) ANÁLISIS DE VARIANZA: El análisis de varianza fue desarrollado al proceso efectuado a 42° C utilizando como materia prima leche de cabra y vaca en iguales proporciones, con los siguientes resultados para tres repeticiones:

CUADRO N° 50
ANVA DE LA PRODUCCIÓN DE ACIDEZ (º D) CON PORCENTAJES DE
FERMENTO BIO RICH ENTRE 0,5% Y 3% EN LECHE DE CABRA Y VACA
(1:1), A 42º C

Fuente de Variación	Suma Cuadrados	Grados Libertad	Cuadrado Medio	F
Entre Tratamientos	382	5	76,4	Fc=152,8
Dentro Tratamientos	6	12	0,5	Ft=3,11
Total	388			

En el análisis de varianza y la prueba de F, con un nivel de significación del 5% se determinó estadísticamente que los promedios de la acidez generados en las mezclas de leche de cabra y de vaca en la proporción (1:1) fermentadas a 42º C y adicionadas de cultivo Bio Rich entre 0,5% y 3% no fueron iguales. Mediante la prueba t-student se determinó estadísticamente que los promedios de acidez obtenidos con 1% y 1,5% de fermento eran iguales así como los promedios de acidez obtenidos al adicionar 2% y 2,5% de fermento Bio Rich siendo diferentes los promedios de acidez conseguidos en las muestras procesadas con 0,5% y 3%.

f) ANÁLISIS SENSORIAL DE RANKING:

El análisis sensorial fue desarrollado para determinar el porcentaje óptimo de cultivo Bio Rich de todas las muestras procesadas con la mezcla de leche de cabra y de vaca (1:1) a 42º C. Esta prueba estuvo a cargo de 8 jueces entrenados, quienes aplicaron el método de Ranking según las características más relevantes para el producto como son: sabor, consistencia, color y aroma.

CUADRO N° 51
EVALUACIÓN SENSORIAL DE LECHE DE CABRA Y VACA (1:1)
FERMENTADA A 42° C CON DIFERENTES PORCENTAJES DE FERMENTO
BIO RICH, MEDIANTE EL MÉTODO DE RANKING

% inóculo	0,5%	1%	1,5%	2%	2,5%	3%
Característica						
Sabor	33	8	17	25	38	47
Consistencia	37	11	15	25	36	44
Aroma	27	10	17	28	39	47
Color	34	8	17	27	38	44

En la tabla de Ranking con un nivel de significación del 5% correspondió el par 17-39, para 6 tratamientos y 8 repeticiones. Este análisis demostró que la muestra mejor calificada por los panelistas fue aquella procesada con leche de cabra y vaca en iguales proporciones (1:1), fermentada a 42° C y adicionada de 1% de cultivo Bio Rich.

g) PRODUCTO FINAL: Los resultados del análisis físico químico y microbiológico efectuado a las mejores muestras se citan a continuación:

g.1) ANÁLISIS FÍSICO QUÍMICO: En el Cuadro N° 52 se detalla los resultados del análisis físico químico de la leche de cabra y vaca (1:1) fermentada con 1% de fermento Bio Rich y temperatura de 42° C .

CUADRO N° 52
ANÁLISIS FÍSICO QUÍMICO DE LECHE DE CABRA Y VACA (1:1)
FERMENTADA A 42° C Y 1% DE FERMENTO BIO RICH

ITEM	RESULTADO
Acidez (° Dornic)	81
pH	4,5
Grasa (%)	4
Consistencia del Gel (cm.)	6,4

Con los resultados obtenidos en el cuadro anterior podemos decir que la mejor muestra tuvo una adecuada acidez (81° Dornic) al concluir el proceso de fermentación (pH de 4,5) y el tenor graso correspondiente para considerar al producto como leche fermentada entera o integral, además de poseer buena consistencia (19) .

g.2) ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO: El análisis microbiológico de la mezcla de leches de cabra y vaca en proporciones iguales, fermentada a 42° C y adicionada de 1% de cultivo Bio Rich, fue realizada en base a los recuentos de coliformes, hongos y levaduras, así como de las bacterias benéficas *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium lactis* y *Streptococcus thermophilus*, con los siguientes resultados:

CUADRO Nº 53
ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE LECHE DE CABRA Y VACA (1:1)
FERMENTADA A 42° C Y ADICIONADA DE 1% DE FERMENTO BIO RICH

RECUESTO MICROBIANO	RESULTADO
Hongos y levaduras	Ausencia
Coliformes, (NMP)	<3 ufc/ml
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	1,5x10 ⁷ ufc/ml
<i>Streptococcus thermophilus</i>	3,5 x 10 ⁹ ufc/ml
<i>Bifidobacterium lactis</i>	2x10 ⁶ ufc/ml

Del cuadro anterior se concluye que las bacterias benéficas presentaron recuentos que permitieron catalogar al producto obtenido como leche fermentada, además de comprobarse que cumplía con las normas microbiológicas internacionales (19).

V. DISCUSIÓN

Al analizar la leche de vaca antes de iniciar la fase experimental se pudo determinar de acuerdo a cada característica evaluada que cumplía con los valores establecidos por la Norma Técnica Nacional para leche cruda (21). Cabe indicar que los valores de sólidos no grasos y sólidos totales estuvieron por encima de los mínimos recomendados, así como la densidad.

En Chile se ha reportado valores de 3,52% para el contenido de grasa y 12,04% de sólidos totales en leche de ganado vacuno (9). En cuanto a la prueba del alcohol, las muestras de leche de vaca no coagularon antes de las 4 horas siendo catalogadas como buenas (1). Asimismo la prueba del azul de metileno dio un tiempo de decoloración por la acción reductora de los microbios de más de 3 horas considerándosele como buena o satisfactoria (1).

Por otro lado la leche de cabra tuvo también buen contenido de grasa, sólidos no grasos, sólidos totales y densidad. En nuestro país no existe data sobre análisis de leche de cabra pero se puede indicar que los valores hallados se encuentran dentro de los rangos reportados por investigadores chilenos; así tenemos en cuanto a sólidos totales un promedio de 14,80% (máx. 18,18% y mín. 11,43%), 5,57% de materia grasa (máx. 7,9% y mín. 3,25%) en leche de ganado caprino del sur de ese país (4). La acidez (0,15 g./100g. de leche), densidad (1,040 g./ml) y pH de 6,7 se encuentran dentro de los parámetros en hatos caprinos españoles y consignados en la bibliografía (6).

De igual manera en la prueba del alcohol con leche de cabra, se observó la formación de copos caseosos de tamaño muy pequeño después de 4 horas.

Es posible que la leche de cabra tenga mayor densidad ya que el extracto seco total puede ser mayor así como el contenido graso, la caseína, albúminas y globulinas con respecto a la leche de vaca (1); lo que puede observarse en los

resultados obtenidos; pero también se sabe que oscilan por influencia de factores como son raza del animal, época de lactación, tipo de alimentación, etc.

Finalmente, las numeraciones de aerobios mesófilos así como de coliformes en leche de cabra, de vaca y en la mezcla fueron menores a lo indicado por la norma (21, 33) porque dieron resultado las medidas de higiene durante el recojo de la leche tales como: ordeño de animales sanos, lavado y desinfección de ubres y pezones, desinfección de las máquinas ordeñadoras, acopio de la leche en envases lavados, limpieza del área de ordeño, manipuladores uniformados y con manos limpias. Mejoras en la calidad microbiológica de la leche de cabra, también han sido reportadas en Chile empleando estrategias semejantes (35) siendo percibidas en la reducción del número de coliformes y en la prueba del azul de metileno. Por otro lado además del bajo recuento bacteriano la leche debe proceder de animales sanos, libre de antibióticos, sin adición de sustancias neutralizantes, calostro, o mezcla con leches guardadas o mastíticas.

El flujo de operaciones desarrollado en base a la utilización de leches crudas de vaca o cabra o la mezcla de ambas en partes iguales, fue tendiente a efectuar el proceso sobre un sustrato de buena calidad microbiológica, de preferencia estéril debido a que *Lactobacillus acidophilus* crece muy lentamente en la leche y así evitar que otros microorganismos dominen en la fermentación. En las citas bibliográficas aparecen, al igual que para el caso del yogurt, diferentes tiempos y temperaturas de calentamiento como por ejemplo de 120 ° C por 15 a 20 minutos, o por ciclos de calentamiento de 95 a 98 ° C por 30 a 60 minutos (36) o también el uso de leche pasteurizada a 85° C (1), o sometida a calentamiento de 115° C por unos segundos. El otro motivo que es válido para el proceso tan drástico de tratamiento térmico es que la leche acidófila (procesada únicamente con *Lactobacillus acidophilus*) es considerada una bebida terapéutica. En nuestro caso la temperatura de 80° C por 20 minutos dio excelentes resultados en el producto final pero no debe olvidarse que la carga bacteriana inicial fue poco numerosa; es decir el tratamiento térmico debe estar en relación con la cantidad y calidad de la carga microbiana inicial de la leche y el tiempo de vida del producto

procesado. El procesamiento de las leches fermentadas concluye normalmente a una acidez titulable mínima de 0,60% (32), posteriormente se enfría entre 22° C y 24° C para frenar el desarrollo de la acidez con agitación y producir una mezcla homogénea, brillante y viscosa (8), refrigerando a no más de 5° C (36).

En los resultados experimentales se pudo observar claramente que la mayor cantidad de ácido producida en la leche de cabra, de vaca y en la mezcla de leches de cabra y de vaca en partes iguales (CUADROS N° 3, 20 y 37), se produjo a la temperatura de trabajo de 45° C. A las temperaturas de 42° C y 39° C los rangos fueron menores pero bastante cercanos entre ellos para cada tipo de leche. En las referencias bibliográficas de leche acidófila se indica que en el proceso de fermentación se genera entre 60° Dornic y 100° Dornic de acidez (36), lo cual concuerda con los resultados obtenidos. También se refiere que al adicionar inóculos entre 2% y 5% es posible obtener leche acidófila con acidez de 150° Dornic (1).

Con respecto al pH final de proceso fue de 4,5, semejante a la producción de yogurt por tratarse del mismo sustrato a fermentar (8). La modificación del pH por fermentación láctica, provoca la destrucción de las micelas y la neutralización de su carga sin fraccionar la caseína, que precipita en forma total a pH de 4,6. En cuanto al fenómeno de sinéresis, este se hizo evidente cuando el producto fue procesado a temperaturas de 45° C, 42° C y 39° C; siendo además de color amarillo tenue al emplear como materia prima leche de cabra, vaca o la mezcla de ambas leches. Este fenómeno también se produce en el yogurt, posiblemente porque el gel lácteo deja escapar una fracción del líquido intersticial espontáneamente, por contracción de la red, debida a la disminución gradual de la hidratación de las micelas que reducen sus dimensiones y logran dispersarse más (4).

En cuanto a la consistencia los mejores resultados se consiguieron con leche de vaca a temperaturas de 45° C y 42° C (CUADRO N° 31), siendo menos estructurados a 39° C mientras que con leche de cabra los geles fueron frágiles inclusive a temperaturas de 45° C, conformándose mejor al adicionar inóculo entre 2% y 3%. A medida que se redujo la temperatura de trabajo, los geles de leche de

cabra fueron también más frágiles. Al mezclar ambas leches se observó que la consistencia de las muestras mejoró con respecto a los resultados obtenidos con leche de cabra (CUADRO N° 48).

El tiempo de proceso fue el tiempo en el que se formó el gel lácteo y para que ello ocurra las caseínas deben estar neutras e insolubles. Esto se cumple en la leche a pH de aproximadamente 4,5. En los experimentos efectuados se observó un mayor tiempo en la producción del gel lácteo empleando leche de cabra (entre 4 horas 30 minutos y 7 horas 40 minutos) que en la mezcla de leche de vaca y cabra en la proporción de (1:1) el cual fue de 4 horas a 4 horas 25 minutos, mientras que con leche de vaca el tiempo de proceso fue menor (3 horas 30 minutos a 4 horas) (CUADROS N° 12, 46 y 29).

A manera de referencia se puede decir que en la industria del yogurt se prefiere usar un corto período de tiempo de procesamiento para lo cual se adopta la temperatura y cantidad de inóculo siguientes: entre 42° C y 45° C con 2% a 3% de fermento para un proceso de aproximadamente 4 horas (8,1). Referencias bibliográficas indican que en la producción de leche acidófila el tiempo de proceso es de 24 horas (36) por lo que la mezcla de estos tres microorganismos a la temperatura de trabajo experimentada redujeron considerablemente el tiempo requerido.

Al desarrollar la evaluación sensorial Objetiva de la leche de cabra, de vaca y la mezcla en proporción (1:1) fermentadas con los diferentes porcentajes de fermento Bio Rich y en las distintas temperaturas ensayadas, se halló que las características sensoriales de cada una de ellas eran las siguientes:

Leche fermentada de cabra y con la mezcla de leche de vaca y de cabra en proporción (1:1)

Sabor: ácido y cremoso, que acentúa el sabor típico de la leche de cabra.

Consistencia: gel firme y estructurado a bien estructurado en la mezcla de leches, pudiendo presentarse sinéresis.

Aroma: a diacetilo y a leche de cabra.

Color: blanco.

Leche fermentada de vaca:

Sabor: ácido y cremoso.

Consistencia: firme y muy bien estructurado, pudiendo presentarse sinéresis.

Aroma: a ácido y a diacetilo.

Color: crema.

Las características sensoriales de las leches fermentadas producidas con leche de cabra, de vaca y con la mezcla de ambas leches en proporciones iguales, coinciden con las que obligan las normas internacionales de Mercosur (19).

Si se considera la clasificación de acuerdo al tenor graso, se les puede clasificar como leches fermentadas o cultivadas enteras o integrales de vaca, cabra o la mezcla en proporciones (1:1), por contener más de 2,9 g/100 g de grasa (19).

También se desarrolló el análisis de varianza y la Prueba de F correspondiente, para las muestras en las que se había generado no solo acidez sino la cantidad de microorganismos de acuerdo a lo que indica la norma para leches fermentadas. En cuanto a la leche de cabra, de vaca así como en la mezcla de ambas en la proporción (1:1) se rechazó la hipótesis que todas las medias de la producción de acidez obtenida con los diferentes porcentajes de inóculo del fermento Bio Rich, procesadas a 42° C y 39° C que cumplían con los recuentos de las bacterias benéficas fueran iguales, con un nivel de significación del 5%. (CUADROS N° 16, 33 y 50).

En la evaluación sensorial de las leches fermentadas que cumplían todos los requisitos físicos, químicos y microbiológicos de las leches fermentadas, y empleando el método de Ranking con un nivel de significación del 5%, los jueces concluyeron que las mejores muestras eran las procesadas con leche de cabra y la mezcla de leche de cabra y de vaca (1:1) adicionadas con 1% de cultivo Bio Rich y fermentadas a 42° C, mientras que con leche de vaca las mejores

muestras fueron procesadas a 39° C e inoculadas con 2% de fermento selecto Bio Rich (CUADROS N° 17, 51 y 34).

De los análisis físicos y químicos obtenidos al evaluar los mejores productos con leche de cabra, de vaca y la mezcla en proporciones iguales se puede aseverar que pueden ser clasificadas como leches fermentadas o cultivadas enteras o integrales por los contenidos de acidez, grasa y pH de los productos (CUADROS N° 18, 35 y 52) (19).

De los resultados hallados en los recuentos bacterianos podemos decir que *Lactobacillus acidophilus* tuvo buen crecimiento microbiano de 10^7 ufc/ml. en leche de vaca, cabra y la mezcla de ambas en iguales proporciones, que es la cantidad límite recomendada por las normas para el bacilo empleado en la producción de yogurt (19). Se pudo observar que la temperatura influyó en el crecimiento de este microorganismo especialmente en leche de vaca, por lo que la temperatura óptima de proceso fue de 39° C en este caso. Con *Bifidobacterium lactis* se obtuvo recuentos de 10^6 ufc/ml. en ambas leches así como en la mezcla de leche de cabra y de vaca; la cantidad mínima de esta bacteria obligada por norma se detectó en las muestras procesadas a 42° C en leche de cabra y desde 39° C en leche de vaca (19). Por el contrario *Streptococcus thermophilus* fue ampliamente superior en leche de cabra y en la mezcla de ambas leches procesadas entre 45° C y 39° C (10^9 ufc/ml) mientras que en leche de vaca obtuvo crecimiento semejante a partir de 39° C. Parece ser que al emplear leche de cabra o la mezcla de ambas como sustrato, su crecimiento es óptimo y no se ve influenciado por el porcentaje de fermento Bio Rich o la temperatura de proceso; lo cual no ocurrió en leche de vaca. La mezcla de los tres microorganismos del fermento Bio Rich se estimulan mutuamente en relación posiblemente protooperativa. Se sabe que los bacilos y los estreptococos requieren fuentes adicionales de aminoácidos que los consiguen a través de actividad proteolítica ubicada en la pared celular pudiendo generar mayor suministro de aminoácidos y por tanto desarrollar mayor acidez, tal como puede apreciarse en los productos procesados con leche de cabra y que también pueden suscitarse en otros tipos de leche (27). Además se ha comprobado que *Streptococcus thermophilus* también produce bióxido de

carbono que es estimulante del crecimiento de bacilos y ácido fórmico, precursor de la purina que promueve la síntesis de ARN; lo cual conlleva a la mayor producción de ácido láctico y acetaldehído (36). Por otro lado, Radke Mitchell y Sandine reportaron que independientemente de la temperatura de fermentación, en el yogurt siempre se registran recuentos microbianos mayores de estreptococos que de bacilos; lo cual también se observó en el presente trabajo (36). Cuando la fermentación concluye la proporción de bacilos a cocos puede ser entre 1:1 y 1:8. En las leches fermentadas experimentales analizadas se obtuvo la proporción de *Bifidobacterium lactis*, *Lactobacillus acidophilus* y *Streptococcus thermophilus* de 1:10:1000. De los resultados obtenidos se puede aseverar que la leche de cabra, de vaca o la mezcla en partes iguales fermentadas con el cultivo Bio Rich pueden ser definidas o clasificadas como leches enteras o integrales, fermentadas o cultivadas con *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium lactis* y *Streptococcus salivarius subsp thermophilus* (19).

Las bacterias probióticas no solo poseen efecto anti oncogénico y sintetizan sustancias inmuno moduladoras, sino que también producen varios tipos de antibióticos otorgando protección limitada ya que no está exenta de la invasión de hongos (36,37, 38) motivo por el cual no se encontró bacterias contaminantes en proporciones que puedan afectar la salud humana y también porque los experimentos se desarrollaron inmediatamente después del ordeño.

VI. CONCLUSIONES

1. Las condiciones óptimas de temperatura de fermentación y porcentaje de inóculo para el procesamiento de leche fermentada fueron: 42° C y 1% de cultivo Bio Rich con leche de cabra y la mezcla de leche de vaca y de cabra en partes iguales y, temperatura de proceso de 39° C y 2 % de inóculo con leche de vaca. El tiempo de proceso con leche de vaca, leche de cabra y con la mezcla de leches de cabra y de vaca (1:1) fue de 4 horas, 7 horas y 4 horas respectivamente.
2. La prueba sensorial de Ranking estableció con un nivel de significación del 5%, que las mejores muestras empleando leche de cabra o la mezcla de leche de vaca y de cabra (1:1) eran las procesadas a 42° C y 1% de inóculo; y con leche de vaca las muestras fermentadas a 39° C y 2% de fermento Bio Rich.
3. Mediante la adición del cultivo mixto Bio Rich a leche de cabra y de vaca, así como a la mezcla de ambas en proporciones (1:1) fue posible obtener leche fermentada o cultivada por su contenido de acidez mayor a 60° Dornic, entera o integral, por el tenor graso (4,3% en leche de cabra, 3,2% en leche de vaca y 3,9% en la mezcla de ambas leches) así como al crecimiento de las bacterias probióticas *Lactobacillus acidophilus* (10^7 ufc/ml), *Bifidobacterium lactis* (10^6 ufc/ml) además de *Streptococcus thermophilus* (10^9 ufc/ml) en leche de cabra, de vaca y en la mezcla de ambas leches en iguales proporciones.
4. El análisis sensorial Descriptivo determinó que la leche fermentada de cabra y la mezcla de leche de cabra y de vaca en proporción (1:1) presentaban las siguientes características: sabor ácido, cremoso y a leche de cabra, consistencia firme y estructurada, aroma típico a la leche de cabra y a diacetilo y, color blanco.

Sabor ácido y cremoso, consistencia de los geles firmes y bien estructurados, aroma a ácido y diacetilo, y color crema, en las muestras de leche fermentada de vaca.

5. La buena calidad sanitaria de las leches fermentadas se vieron reflejadas en la ausencia de microorganismos dañinos para la salud y, por ende, en el cumplimiento de las normas internacionales para leches fermentadas o cultivadas.

VII. BIBLIOGRAFÍA:

1. Veisseyre, Roger. LACTOLOGÍA TÉCNICA, España: Ed. Acribia, 1986.
2. Jiang, T et al. Improvement of lactose digestion in humans by ingestion of unfermented milk containing *B. longum*, Journal of Dairy Science, 1996, may 79 (5) : 750 – 7.
3. Jiang , T. Modification of colonic fermentation by bifidobacteria and pH in vitro. Impact on lactose metabolism, short chain fatty acid, and lactate production. Dig-Dis-Sci., 1997, November 42 (11):2370-7.
4. Santos Armando. LECHE Y SUS DERIVADOS. Méjico, Ed. Trillas, 1987.
5. Walstra, P y Jenes, R QUÍMICA Y FÍSICA LACTOLÓGICA. España: Ed. Acribia 1987.
6. Buxade. C ZOOTECNIA: Base de Producción Animal: Bases de Producción Caprina, España Ed. Acribia, 1998.
7. Ministerio de Agricultura. ESTADÍSTICA AGRARIA: Producción, Lima Perú, Oficina de Investigación Agraria 1997.
8. Valdivia Juan INDUSTRIAS LÁCTEAS. Lima, Perú , UNALM – FIAL,1992.
9. Brito, C. Miti-Miti: nueva variedad de queso de cabra. Alimentos, 1989, Vol. 14, Nº 4, 7:15.
10. Hansen Christian, INFORMACIÓN TÉCNICA, Dinamarca, 2000.
11. Tahri, K, et al. Effects of three strains of Bifidobacterias on cholesterol. Letters of applied microbiology 1995, September 21 (3) : 149 – 51.
12. Abdelali, H. et al. Effect of dairy products on initiation of precursor lesion of colon cancer in rats. Nutrition & Cancer, 1995 Vol. 24 (2) 121 – 32.
13. Gallaher, D. Probiotics, cecal microflora and aberrant crypts in the rat colon. Journal nutrition, 1996, May 126 (5): 1362 – 71.
14. Klinge, Germán. INFORMACIÓN TÉCNICA: TERMOFILOS DE PASTA COCIDA. Holanda Ezal (Grupo Rhone – Poulenc), 1999.
15. Susuki, T. et. al. Inhibition of bacterial translocation from the gastrointestinal tract of mice by oral administration of a culture condensate of *B. longum*. Journal of Veterinary Medical Science, 1997, August 59 (8): 665 – 9.

16. Takahashi, T. et al. Effects of orally ingested *Bifidobacterium longum* on the mucosal Ig A response of mice to dietary antigens. Bioscience-Biotechnology-Biochemistry, 1998, January 62 (1): 10 – 5.
17. Racchumi, E. et al. Elaboración de yogurt a partir de leche de soya (*Glycine max*) utilizando dos cultivos starter de Bacterias ácido lácticas. Libro de Resúmenes del II Congreso Peruano de Biotecnología y Bioingeniería. 2001.
18. Orondo, R et al. Biotecnología de Yogurt enriquecido con calcio, Libro de Resúmenes del II Congreso Peruano de Biotecnología y Bioingeniería, 2001.
19. Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca, Reglamento Técnico MERCOSUR de Identidad y Calidad de Leches Fermentadas, Montevideo, Uruguay: MGC, 1997.
20. Nagasha, M., et al. Structured studies on a cell wall polysaccharide from *Bifidobacterium longum*. Carbohydrates Research, 1995, September 8: 245 – 9.
21. INDECOPI: Normas Técnicas Nacionales:
 - .Leche cruda: requisitos; NTP 202.001:2003
 - .Determinación de Densidad, método usual, NTP 202.008.
 - .Grasa: técnica Gerber, NTP 202.028:1998.
 - .Sólidos no grasos y sólidos totales, método usual, NTP 202.011: 1998.
 - .Prueba del alcohol, NTP 202.030: 1998.
 - .Prueba del azul de metileno, NTP 202.014:1998.
 - .Acidez: NTP 202.009.
 - .Ensayos microbiológicos: NTP 202.083: 1991.
22. Gibson, G. Dietary modulation of the human gut microflora using prebiotics. Bromatology Journal Nutrition 1998, October 80 (4): 5209 – 12.
23. Marteau, P. et al. Survival of lactic acid bacteria in a dynamic model of the stomach and small intestine: validation and the effects of bile. Journal of dairy science, 1997, June 80 (6) : 1031-7.
24. Hayakawa, K. et al. Effects of Soya milk on plasma and liver lipids, and faecal steroids in hamsters fed on cholesterol free or cholesterol enriched diet. Bromatology Journal Nutrition, 1998, January 79 (1): 97 – 105.
25. Shah, N. Symposium of probiotic bacteria. J. Dairy-Sci., 2000, Jun,83(4):894-907.

26. Catala, I. et. al. Oligofructose contributes to the protective role of Bifidobacteria in experimental necrotizing enterocolitis in quails. Journal of medical Microbiology, 1999, January 48 (1): 89 – 94.
27. Abu-Taraboush, H. al-Dagal, M.al Royli,M. Growth, viability, and proteolytic activity of bifidobacteria in whole camel milk. J. Dairy-Sci., 1998, Feb,81(2):354-61.
28. Wolin, M. NMR Detection of ^{13}C ^{13}C COOH from 3-13- glucose: a signature for Bifidobacterium fermentation in the intestinal tract. Journal Nutrition, 1998, January 128 (1): 91-6.
29. Butel, M. et al. Clostridial pathogenicity in experimental necrotizing enterocolitis in gnotobiotic quails and protective role of Bifidobacteria . Journal of medical Microbiology, 1998, May 47 (5): 391 – 9.
30. Fujiwara, S. Proteinaceous factor (s) in culture supernatant fluids of Bifidobacteria which prevents the binding of enterotoxigenic Escherichia coli to gangliotetraosylceramida. Applied Environmental microbiology 1997, February 63 (2): 506- 12.
31. Iakushenko, M. et al. The regulation of microecological disorders of the intestines in newborn infants with perinatal pathology using the new probiotic Bifidobacterium – Forte. Zh –Mikrobiology- Epidemiology – Inmunobiology., 1997, November – December (6) 18-22.
32. Hardy Diagnostics. STREPTOCOCCUS: INFORMACIÓN TÉCNICA. Holanda: HD, 2000.
33. Ministerio de Salud. NUEVO REGLAMENTO SANITARIO DE LOS ALIMENTOS, Santiago de Chile, Chile: Diario Oficial de la República de Chile 1997.
34. García, F. y col., Alteraciones reológicas en procesos fermentativos lácteos. Revista Alimentaria, 1994, Julio – Agosto: 41-8.
35. Molina, C. y col., Calidad higiénica y composicional de leche de cabra sector Bocco (Quillota) V región. (Avance de resultados), 1991 Libro resumen del 9º Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos, Chile, Pág. 48.
36. García, M. y col. BIOTECNOLOGIA ALIMENTARIA, Méjico, Ed. Limusa, 1998.
37. Massa, S. et al. Survival of *Escherichia coli* 0157:H7 in yogurt during preparation and storage at 4º C. Lett-Appl-Microbiol. 1997, May, 24(5): 347-50.

38. Bielecka, M. Biedrizcka, E. Smoragiewicz L. Wsmieszek, M. Interaction of Bifidobacterium and Salmonella during associated growth. Int-J-Food-Microbiol., 1998, Dec 8, 45(2) : 151-5.

VIII. ANEXOS

ANEXO N° 1:

Lactobacillus acidophilus, *Lactobacillus casei* and Bifidobacteria in milk products made with nu-trish cultures.

As use probiotic cultures becomes increasingly popular it becomes ever more important to be able to document that the various bacteria are present in the final products. This guideline describes media and methods for counting of Chr. Hansen's nu-trish cultures in different combinations.

***Lactobacillus acidophilus* as single culture or in AB, ABT or ABY combinations**

Medium	MRS-IM agar with maltose
Technique	Pour plate Anaerobic incubation, 37°C, three days
Comments	All colonies are counted. <i>Streptococcus thermophilus</i> does not grow on MRS-IM agar. Maltose only allows growth of <i>Lactobacillus acidophilus</i> .

***Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* in AC or ABC combinations**

Medium	MRS-IM agar with sucrose and addition of BromCresolPurple (BCP) as indicator.
Technique	Spread plate Aerobic incubation, 37°C, three days <i>Lactobacillus acidophilus</i> gives round, myceloid, flat and white colonies which are easily seen as dim spots on the surface of the agar. <i>Lactobacillus casei</i> gives round, circular, convex and yellow colonies.
Comments	The aerobic conditions prevent Bifidobacteria from growing when counting on an ABC combination.

Bifidobacteria mixed with mesophilic lactic acid bacteria

Medium	MRS-IM agar with glucose and addition of the solutions A
Technique	Pour plate

Anaerobic incubation, 43°C, three days.

Comments All colonies are counted. An incubation temperature of 43°C suppresses the mesophilic flora.

Generally it is recommended to verify some of the colonies by microscopy to make sure that they represent the correct bacteria.

Preparation of MRS-IM agar:

Tryptone	10 g	Oxoid L 42
Yeast extract	5 g	Oxoid L 21
Tween 80	1 g	
di-Potassium hydrogen phosphate	2.6 g	Merck N° 5104
Sodium acetate, 3 H ₂ O	5 g	Merck N° 6267
di-Ammonium hydrogen citrate	2 g	Merck N° 1154
Magnesium sulphate, 7 H ₂ O	0.2 g	Merck N° 5882
Manganese (II)-sulphate, H ₂ O	0.05g	Merck N° 5960
Agar	13 g	SO-BI-GEL

Suspend the ingredients in 1000 ml distilled water. Boil to dissolve the medium completely. Dispense into bottles and sterilize by autoclaving at 121°C for 15 min.

pH after sterilization: 6.9+ -0.1

Preparation of MRS-IM agar with sucrose and BromCresolPurple added
1000 ml MRS-IM agar, which is melted and subsequently cooled to 47°C+-1°C, is added:
50 ml sterile 40% sucrose solution and
100 ml sterile 0.2% BCP solution.

Preparation of 40% (w/v) sucrose solution

Sucrose	40 g
Distilled water to make	100 ml

Sterile by filtration (0.45µm)

Cold storage

Preparation of 0.2% (w/v) BromCresolPurple solution

BromCresolPurple	0.2 g	Merck N° 3025
Ethanol 96%	22 g	
Distilled water to make	100 ml	

Sterilize by filtration (0.45 µm)

Cold storage

Preparation of MRS-IM agar with glucose and solution A added

1000 ml MRS-IM agar, which is melted and subsequently cooled to 47°C +/- 1°C, is added:

100 ml sterile 20% glucose solution

5 ml sterile solution of A

Preparation of 20% (w/v) glucose solution

Glucose 20 g

Distilled water to make 100 ml

Sterilize by filtration (0.45 µm)

Cold storage

Preparation of solution A

Dichloxallin 100 mg Sigma D-9016

Distilled water to make 1000 ml

Sterilize by filtration (0.45 µm)

Cold storage , shelf life max two weeks.

Christian Hansen's Laboratory.

ANEXO N° 2:

FICHA TÉCNICA CHRISTIAN HANSEN (Cultivo BIO RICH)

Fermento láctico mixto, Bio Rich que contiene cepas bien definidas de *Lactobacillus acidophilus* La- 1 *Bifidobacterium lactis* Bb-12 y *Streptococcus thermophilus*, procedente de Dinamarca, con las siguientes características:

Número total de bacterias	:	mínimo 5×10^{10} ufc/g
Actividad	:	67 horas, pH de 4,7 a 5
Producción de gas	:	Negativo
Sensibilidad a la sal	:	100% de inhibición con 3, 5 % de cloruro de sodio
Hongos y levaduras	:	< 10 ufc/g
Coliformes	:	< 10 ufc/g
<i>Staphylococcus aureus</i>	:	< 10 ufc/g
<i>Salmonella</i>	:	negativo en 25 g.
<i>Listeria</i>	:	Negativo en 25 g.

ANEXO Nº 3:

Reglamento Técnico MERCOSUR de Identidad y Calidad de Leches Fermentadas MERCOSUR/GMC/RES nº 47/97

Requisitos para leches fermentadas o cultivadas:

a. Por el contenido de grasa:

Con crema: min. 6g/100g,

entera o integral mín. 3g/100g,

parcialmente descremada máx. 2,9g/100g y

descremada máx. 0,5g/100g.

b. Contenido de Acidez: de 0,6 a 2,0 g/100g (60° Dornic a 200° Dornic).

c. Recuento de microorganismos benéficos: mín. 10^6 ufc/g, en caso de que se mencione el uso de Bifidobacterias el recuento será de un mínimo de 10^6 ufc/g

d. Condiciones de conservación y comercialización: las leches fermentadas deberán conservarse y comercializarse a una temperatura no superior a 10° C.

e. Recuentos de contaminantes microbianos:

coliformes/g (n=5, c=2, m=10, M=100);

hongos y levaduras/g (n=5, c=2, m=50, M=200).