



Universidad de San Carlos de Guatemala
Facultad de Ingeniería
Escuela de Ingeniería Química

**ADAPTACIÓN DE UNA METODOLOGÍA PARA LA CARACTERIZACIÓN
FISICOQUÍMICA Y MICROBIOLÓGICA DE HELADO DE YOGUR**

Blanca Yesenia Imuchac Gil

Asesorado por la Inga. Hilda Palma de Martini

Guatemala, febrero de 2018

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA



FACULTAD DE INGENIERÍA

**ADAPTACIÓN DE UNA METODOLOGÍA PARA LA CARACTERIZACIÓN
FISICOQUÍMICA Y MICROBIOLÓGICA DE HELADO DE YOGUR**

TRABAJO DE GRADUACIÓN

PRESENTADO A LA JUNTA DIRECTIVA DE LA
FACULTAD DE INGENIERÍA

POR

BLANCA YESENIAI IMUCHAC GIL

ASESORADO POR LA INGA. HILDA PALMA DE MARTINI

AL CONFERÍRSELE EL TÍTULO DE

INGENIERA QUÍMICA

GUATEMALA, FEBRERO DE 2018

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE INGENIERÍA



NÓMINA DE JUNTA DIRECTIVA

DECANO	Ing. Pedro Antonio Aguilar Polanco
VOCAL I	Ing. Angel Roberto Sic García
VOCAL II	Ing. Pablo Christian de León Rodríguez
VOCAL III	Ing. José Milton de León Bran
VOCAL IV	Br. Oscar Humberto Galicia Nuñez
VOCAL V	Br. Carlos Enrique Gómez Donis
SECRETARIA	Inga. Lesbia Magalí Herrera López

TRIBUNAL QUE PRACTICÓ EL EXAMEN GENERAL PRIVADO

DECANO	Ing. Murphy Olympo Paiz Recinos
EXAMINADOR	Ing. Williams Guillermo Álvarez Mejía
EXAMINADOR	Ing. Jorge Emilio Godínez Lemus
EXAMINADOR	Ing. Carlos Salvador Wong Davi
SECRETARIO	Ing. Hugo Humberto Rivera Pérez

HONORABLE TRIBUNAL EXAMINADOR

En cumplimiento con los preceptos que establece la ley de la Universidad de San Carlos de Guatemala, presento a su consideración mi trabajo de graduación titulado:

ADAPTACIÓN DE UNA METODOLOGÍA PARA LA CARACTERIZACIÓN FISICOQUÍMICA Y MICROBIOLÓGICA DE HELADO DE YOGUR

Tema que me fuera asignado por la Dirección de la Escuela de Ingeniería Química con fecha 4 de agosto de 2015.



Blanca Yesenia Imuchac Gil



Guatemala, julio 2017

Ingeniero
Carlos Wong
Director de Escuela de Ingeniería Química
Facultad de Ingeniería

Estimada Director

Deseándole que tenga éxitos en sus actividades. Me dirijo a usted informándole que he revisado y aprobado el informe final de trabajo de graduación que se titula: **"ADAPTACIÓN DE UNA METODOLOGÍA PARA LA CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA Y MICROBIOLÓGICA DE HELADO DE YOGUR"** desarrollado por la estudiante de la carrera de Ingeniería Química Blanca Yesenia Imuchac Gil quien se identifica con el CUI 1779300980401 y número de carnet 200924540

Por lo que solicito se brinden las atenciones correspondientes al caso, sin otro particular, me despido de usted.

Atentamente

Ms. Sc. Ing. Hilda Palma de Martini
ASESORA
Colegiado 453

Escuela de Ingeniería Química USAC

4/07/2017

INGA. HILDA PALMA DE MARTINI
COLEGIADO No. 453



Agencia Centroamericana de Acreditación de
Especialidades de la Ingeniería y de la Arquitectura





Guatemala, 16 de octubre de 2017.
Ref. EIQ.TG-IF.042.2017.

Ingeniero
Carlos Salvador Wong Davi
DIRECTOR
Escuela de Ingeniería Química
Facultad de Ingeniería

Estimado Ingeniero Wong:

Como consta en el registro de evaluación del informe final EIQ-PRO-REG-007 correlativo **058-2016** le informo que reunidos los Miembros de la Terna nombrada por la Escuela de Ingeniería Química, se practicó la revisión del:

INFORME FINAL DE TRABAJO DE GRADUACIÓN

Solicitado por la estudiante universitaria: **Blanca Yesenia Imuchac Gil**.
Identificada con número de carné: **2009-24540**.
Previo a optar al título de **INGENIERA QUÍMICA**.

Siguiendo los procedimientos de revisión interna de la Escuela de Ingeniería Química, los Miembros de la Terna han procedido a **APROBARLO** con el siguiente título:

ADAPTACIÓN DE UNA METODOLOGÍA PARA LA CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA Y MICROBIOLÓGICA DE HELADO DE YOGUR

El Trabajo de Graduación ha sido asesorado por la Ingeniera Química: **Hilda Piedad Palma Ramos de Martini**.

Habiendo encontrado el referido informe final del trabajo de graduación **SATISFACTORIO**, se autoriza al estudiante, proceder con los trámites requeridos de acuerdo a las normas y procedimientos establecidos por la Facultad para su autorización e impresión.

“ID Y ENSEÑAD A TODOS”

Ing. Pablo Enrique Morales Paniagua
COORDINADOR DE TERNA
Tribunal de Revisión
Trabajo de Graduación



C.c.: archivo





Ref.EIQ.TG.004.2018

El Director de la Escuela de Ingeniería Química de la Universidad de San Carlos de Guatemala, luego de conocer el dictamen del Asesor y de los Miembros del Tribunal nombrado por la Escuela de Ingeniería Química para revisar el Informe del Trabajo de Graduación de la estudiante, **BLANCA YESENIA IMUCHAC GIL** titulado: **"ADAPTACIÓN DE UNA METODOLOGÍA PARA LA CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA Y MICROBIOLÓGICA DE HELADO DE YOGUR"**. Procede a la autorización del mismo, ya que reúne el rigor, la secuencia, la pertinencia y la coherencia metodológica requerida.

"Id y Enseñad a Todos"

Ing. Carlos Salvador Wong Davi
Director
Escuela de Ingeniería Química



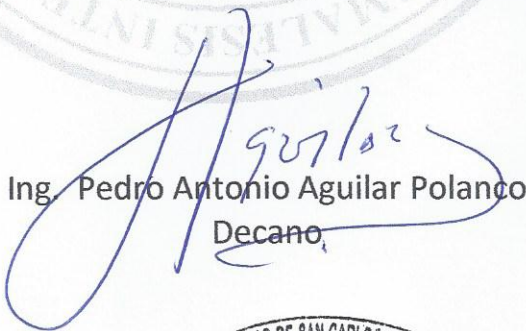
Guatemala, enero 2018

Cc: Archivo
CSWD/kdlq



El Decano de la Facultad de Ingeniería de la Universidad de San Carlos de Guatemala, luego de conocer la aprobación por parte del Director de la Escuela de Ingeniería Química, al Trabajo de Graduación titulado: **ADAPTACIÓN DE UNA METODOLOGÍA PARA LA CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA Y MICROBIOLÓGICA DE HELADO DE YOGUR**, presentado por la estudiante universitaria: **Blanca Yesenia Imuchac Gil**, y después de haber culminado las revisiones previas bajo la responsabilidad de las instancias correspondientes, autoriza la impresión del mismo.

IMPRÍMASE:


Ing. Pedro Antonio Aguilar Polanco
Decano

Guatemala, febrero de 2018

/gdech



ACTO QUE DEDICO A:

Dios	Porque su fidelidad ha sido muy grande en mi vida, por la fortaleza y amor. Por ser el mejor amigo, guía y maestro
Mis padres	Isaías Imuchac y Angelina Gil por su apoyo incondicional y el sacrificio realizado durante mis años de estudio, por sus consejos y todo su amor.
Mis hermanos	Paola y Bryan, por su paciencia, cariño y apoyo incondicional.
Mis tíos	Gerson y Marcos, por su ayuda
Mis amigos	Por las experiencias compartidas en los buenos momentos y en los adversos.

AGRADECIMIENTOS A:

Universidad de San Carlos de Guatemala	Por ser mi casa de estudios, por transmitir tan valiosos conocimientos y por todas las experiencias vividas aquí.
Facultad de Ingeniería	Por ser importante influencia en mi carrera y desarrollo profesional y a los catedráticos cuyas enseñanzas fueron transmitidas sin escatimar.
Laboratorio de Análisis Físicoquímicos y Microbiológicos (LAFYM)	Por su valiosa ayuda y compartir sus conocimientos, especialmente a la licenciada Ana Rodas y a su equipo de trabajo.
Facultad de Farmacia	Por su apoyo y orientación profesional para la realización de este trabajo.
Facultad de Veterinaria y Zootecnia	Por su colaboración para el desarrollo de este trabajo.
Ingeniera Hilda Palma	Por ser de gran ejemplo para mi vida, por compartir sus conocimientos y por orientarme como mi asesora.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES.....	V
LISTA DE SÍMBOLOS	VII
GLOSARIO	IX
RESUMEN.....	XIII
OBJETIVOS.....	XV
INTRODUCCIÓN	XVII
1. ANTECEDENTES	1
2. MARCO TEÓRICO.....	3
2.1. Generalidades sobre helado de yogur.....	3
2.1.1. Materias primas	4
2.1.1.1. Leche.....	4
2.1.1.2. Sólidos de leche no grasos(SLNG).....	5
2.1.1.3. Sólidos grasos	5
2.1.1.4. Azúcar, saborizantes y estabilizantes....	5
2.1.1.5. Cultivo iniciador	6
2.2. Proceso de fabricación	6
2.2.1. Preparación de la mezcla base de helado.....	7
2.2.2. Pasteurización	7
2.2.3. Homogenización	8
2.2.4. Inoculación del cultivo.....	9
2.2.5. Refrigeración y maduración.....	10
2.2.6. Saborización	10
2.2.7. Congelación y batido	10

2.2.8.	Empaquetamiento y endurecimiento	11
2.3.	Control de Calidad.....	12
2.3.1.	Microbiológico	12
2.3.2.	Bacterias ácido-lácticas, Streptococcus thermophilus y Lactobacillus bulgaricus	15
2.3.3.	Análisis fisicoquímico	16
2.4.	Legislación	19
2.4.1.	Códex Stan 243-2003	19
2.4.2.	Norma NTE INEN 706-2013.....	20
3.	DISEÑO METODOLÓGICO.....	23
3.1.	Variables	23
3.1.1.	Variables de control.....	23
3.1.2.	Variables dependientes y respuesta	23
3.1.3.	Variables de medición	24
3.2.	Delimitación del campo de estudio.....	24
3.3.	Recursos humanos disponibles	25
3.4.	Recursos materiales disponibles.....	26
3.5.	Técnica cualitativa y cuantitativa	28
3.5.1.	Diagrama de flujo de proceso.....	29
3.5.1.1.	Bacterias ácido-lácticas.....	29
3.5.1.2.	Escherichia coli	30
3.5.1.3.	Staphylococcus aureus	33
3.5.1.4.	Salmonella ssp	37
3.5.1.5.	Listeria monocytogenes.....	38
3.5.1.6.	Análisis de proteína	39
3.5.1.7.	Análisis de acidez.....	40
3.5.1.8.	Análisis de sólidos totales	41
3.5.1.9.	Análisis de grasa	42

3.6.	Recolección y ordenamiento de la información	43
3.7.	Tabulación, ordenamiento y procesamiento de la información	43
3.8.	Análisis estadístico	46
4.	RESULTADOS	51
4.1.	Condiciones aplicadas para el ensayo de adaptación del método de enumeración diferencial para conteo de bacterias ácido-lácticas.	51
4.2.	Bacterias ácido-lácticas totales	53
5.	INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS.....	57
	CONCLUSIONES	61
	RECOMENDACIONES.....	63
	BIBLIOGRAFÍA.....	65
	APÉNDICES	69

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

FIGURAS

1.	Pasteurizador HTST.....	8
2.	Cocimiento, homogenización e inoculación	9
3.	Saborización, congelación, batido y empaquetamiento	12
4.	Medio de Agar Lee.....	16
5.	Etapas del método Kjeldahl.....	17
6.	Diagrama de flujo análisis de bacterias ácido-lácticas	29
7.	Diagrama de flujo de análisis de <i>E. coli</i>	31
8.	Diagrama de flujo análisis de proteína	39
9.	Diagrama de flujo análisis de % de ácido láctico	40
10.	Diagrama de flujo análisis sólidos totales.....	41
11.	Conteo final promedio de <i>Streptococcus thermophilus</i> y <i>Lactobacillus bulgaricus</i>	53
12.	Comparación de resultados de acidez y proteína	54
13.	Comparación de resultados de sólidos totales.....	54
14.	Comparación de resultados de análisis de grasa.....	55

TABLAS

I.	Tipos de pasteurización	7
II.	Características de crecimiento en medio selectivo agar Lee	16
III.	Parámetros fisicoquímicos para el yogur o yogur a base de cultivos alternativos y leche acidófila	20
IV.	Requisitos fisicoquímicos para helados y mezclas de helados	21

V.	Requisitos microbiológicos para helados o mezclas para helados concentrada o líquida.....	21
VI.	Determinación de variables de control a escala laboratorio.....	23
VII.	Determinación de las variables dependientes a escala laboratorio	23
VIII.	Determinación de las variables de medición.....	24
IX.	Resultados según pruebas confirmativas	37
X.	Determinación de diluciones óptimas para conteo de bacterias ácido-lácticas	44
XI.	Colonias de bacterias de yogur, muestra A	45
XII.	Colonias de bacterias de yogur, muestra B	45
XIII.	Colonias de bacterias de yogur, muestra C	45
XIV.	Conteo total de bacterias ácido-lácticas	46
XV.	Caracterización fisicoquímica de helado de yogur.....	46
XVI.	Desviación estándar entre tratamientos.....	48
XVII.	Promedio y desviación estándar de conteo de bacterias <i>Lactobacillus bulgaricus</i> y <i>Streptococcus thermophilus</i> por factor de dilución y muestra	48
XVIII.	Comparación de las características fisicoquímicas del helado versus establecido en las normas consultadas.....	49
XIX.	Condiciones ambientales y de preparación de la muestra para conteo de bacterias ácido-lácticas.....	51
XX.	Condiciones ambientales y de la muestra, para determinación de propiedades microbiológicas y fisicoquímicas	52
XXI.	Propiedades microbiológicas	55

LISTA DE SÍMBOLOS

Símbolo	Significado
Ssp	Algunas especies
HTST	Alta temperatura, tiempo corto
BAL	Bacterias Ácido-lácticas
BLEB	Base amortiguada enriquecida para listeria
°C	Grado Celsius
g	Gramo
INEN	Instituto Ecuatoriano de Normalización
meg	Mili equivalente gramo
mL	Mililitro
min	Minuto
MNPC	Muy numeroso para contar
NTE	Norma Técnica Ecuatoriana
NMP	Número más probable
VAT	Pasteurización por lote
%A	Porcentaje de acidez
%w/w	Porcentaje en peso sobre peso
pH	Potencial de hidrógeno
RTCA	Reglamento Técnico Centroamericano
SLNG	Sólidos lácticos no grasos
ST	Sólidos totales
Subsp.	Sub especie
UHT	Ultra alta temperatura
UFC	Unidad formadora de colonia

GLOSARIO

Ácido láctico	Compuesto químico que desempeña un papel importante en los procesos bioquímicos, su nomenclatura oficial es ácido 2-hidroxi-propanoico o ácido α -hidroxi-propanóico, se obtiene por lo general de un proceso de fermentación de la lactosa, se encuentra presente en el yogur
Aerobio	Organismo que requiere oxígeno para vivir.
Anaerobio	Organismo que no necesita oxígeno libre para realizar su catabolismo.
Anaerobio facultativo	Microrganismo que puede adaptar a vivir con y sin la presencia de oxígeno atmosférico.
Autoclave	Aparato utilizado para esterilizar materiales mediante calor húmedo a presión.
Bacteriófago	Virus que parasita las bacterias de forma específica. Su ciclo vital puede desarrollarse ya sea infectando y destruyendo a la bacteria o reproduciéndose sincrónicamente con ella.
Biofilm	Es una comunidad microbiana de células en forma de película, adheridas a una superficie en que las

células se mantienen unidas gracias a una matriz extracelular.

Caldo BPLS Caldo verde brillante rojo fenol lactosa sacarosa, se utiliza para el aislamiento de *Salmonellas*.

Caldo XLD Caldo xilosa lisina desoxicolato, se utiliza para aislar enterobacterias patógenas como *Salmonella* y *Shigella*.

Caldo BHI Caldo infusión cerebro corazón, empleado en el análisis de *Staphylococcus aureus*

Cultivos iniciadores Son aquellos organismos que inician la fermentación ácido láctica en la leche, como *Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*, entre otros.

Dilución Reducción de la concentración de una sustancia, consiste en rebajar la cantidad de soluto por unidad de volumen de dilución.

Enterotoxina Toxina producida por algunas cepas de la bacteria *Staphylococcus aureus*. La ingestión de la toxina por alimentos contaminados (crema y helados) produce náuseas, vómitos y diarrea.

Fermentación Proceso bioquímico anaeróbico, en el que una materia orgánica se oxida parcialmente. Permite

obtener energía metabólica y un producto menos oxidado que el compuesto inicial.

Incubación	Período de latencia para que el agente infeccioso manifieste efectos en el organismo infectado.
Inoculación	Introducción de un organismo de forma accidental o voluntaria en un medio.
Listeriosis	Infección seria causada por la ingesta de alimentos contaminados con la bacteria <i>Listeria monocytogenes</i> .
<i>Live and active culture</i>	Se refiere a los organismos <i>Lactobacillus bulgaricus</i> y <i>Streptococcus thermophilus</i> , los cuales convierten la leche pasteurizada en yogur durante la fermentación y se encuentran vivos al momento de su ingesta como producto final.
Microrganismo	Organismo microscópico que no se puede observar a simple vista, sino solo a través de un microscopio. Se incluyen virus, bacterias, levaduras y mohos.
Patógenos	Agente o situación que causa una enfermedad.
Piógeno	Microrganismo que determina una respuesta inflamatoria en la que produce pus.

Yogur

Derivado lácteo, de consistencia cremosa que se obtiene de la fermentación de la lactosa presente en la leche a través de *Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus* entre otros cultivos.

RESUMEN

En este estudio se adaptaron metodologías conocidas para la caracterización fisicoquímica y microbiológica de tres muestras de helado de yogur. Se tomó como base el Codex Alimentarius CODEX STAN 243:2003 y la Norma Técnica Ecuatoriana INEN 706:2013, por lo que se evaluaron los parámetros de calidad para helado de yogur que se mencionan en ellas.

Se realizó el conteo total bacterias ácido-lácticas de yogur *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus*, sobre placa de agar Lee, se determinó que la dilución óptima está entre 10^{-06} y 10^{-08} . A partir de ello, se concluyó que las muestras cumplen y sobrepasan la cantidad mínima de 1^{08} requerida por el Codex. Para la caracterización microbiológica de patógenos, se analizó y cuantificó *Escherichia coli*, por la técnica Número Más Probable, se determinó en cada muestra un resultado de $<3\text{NMP/g}$, *Staphylococcus aureus*, $<10\text{UFC/g}$ en cada muestra. *Salmonella ssp* y *Listeria monocytogenes* cuyo resultado fue ausencia en cada muestra.

La caracterización fisicoquímica incluyó la cuantificación de proteína por el método de Kjeldahl, acidez total por titulación volumétrica, grasa por el método de Babcock y sólidos totales por desecadora. Los resultados indican que las propiedades anteriores están en el rango especificado en el Codex y la NTE INEN consultadas. Con excepción de la grasa en las muestras B y C, igual que para los sólidos totales, los resultados no cumplen para ninguna de las normas mencionadas.

OBJETIVOS

General

Adaptar metodologías para caracterizar fisicoquímica y microbiológicamente helado de yogur como producto terminado

Específicos

1. Determinar las condiciones necesarias para ajustar un método de conteo de bacterias ácido-lácticas de yogur en helado de yogur a partir del cual, cuantificar las bacterias *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus* totales.
2. Caracterizar fisicoquímicamente por cuantificación de proteína láctea, grasa total, sólidos totales y acidez como ácido láctico, cada muestra.
3. Aplicar una metodología de fácil desarrollo para el análisis de *E. Coli*, *Staphylococcus Aureus*, *Salmonella ssp* y *Listeria monocytogenes*.
4. Categorizar las muestras analizadas por comparación de sus características fisicoquímicas y microbiológicas con los parámetros establecidos en las normas Codex para Leches fermentadas 243-2003, Norma Ecuatoriana NTE INEN 706:2013.

INTRODUCCIÓN

El consumo de helado de yogur se ha intensificado en los últimos años, aunque sus inicios se remontan a los años setenta en Europa y Estados Unidos. La industria de alimentos provee una amplia gama de postres basados en ideas extranjeras, sin embargo, la legislación nacional en control de alimentos no va al mismo paso de la diversidad en la industria de alimentos.

Para este estudio, se tomó como referencia el Codex Stan 243-2003 y la NTE INEN 706:2013. A partir de ello, se buscaron métodos de análisis de patógenos y parámetros fisicoquímicos allí mencionados. El helado de yogur se clasifica como derivado lácteo, con propiedades parecidas a las del yogur fresco. A partir de ello, se aplicó metodologías para yogur fresco.

El agar Lee es un medio práctico para cuantificación total de bacterias ácido-lácticas *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus* por lo cual se tomó en cuenta para este estudio. Entre las propiedades fisicoquímicas se analizó proteína, acidez total, grasa y sólidos totales. El análisis de patógenos incluyó *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella ssp/25g* y *Listeria monocytogenes*.

Para cada método se determinaron las condiciones necesarias tanto de la muestra como ambientales para el análisis de las propiedades mencionadas, los métodos empleados fueron prácticos en desarrollo y costo, ya que requirieron materiales ampliamente usados en los laboratorios de análisis de alimentos.

1. ANTECEDENTES

Hasta ahora, no existen estudios publicados que especifiquen los parámetros característicos de una mezcla de helado de yogur en Guatemala. Pero para el yogur blando, refrigerado existen algunas, por lo que se tomaron como referencia. Aunque algunas organizaciones y artículos sobre yogur fresco abarcan al helado de yogur, como se describe a continuación

“The International Frozen Yogurt Association, fundada en 2013 es una asociación que promueve la calidad y consumo del helado de yogur. Proporciona información y recursos útiles para la industria y para el consumidor. Introduce la expresión “Live and active culture” que se refiere a cuantos microorganismos ácido-lácticos debe contener un gramo de helado, para denominarse helado de yogur. La fundación posee un sello con este término, el cual reconoce que el helado es de buena calidad y contiene bacterias ácido-lácticas vivas y activas en la concentración mínima o mayor a la mencionada.

Esta misma asociación, está vinculada a The National Yogurt Association. El artículo “Live & Active Culture Yogurt” menciona que el yogur no debe ser tratado térmicamente después del cultivo y debe contener, al menos, 100 millones de bacterias (*Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*) por gramo al fabricarse en yogur refrigerado y, al menos, 10 millones si se trata de helado de yogur.

En el año 2006, la tesis *Determinación del contenido de grasa en yogurt entero y descremado de marcas comerciales expandidas en la ciudad capital* presentado por la estudiante de química farmacéutica María Marta Rosales

Valenzuela enlista normas internacionales sobre el contenido de grasa para yogures enteros y descremados. Mide y compara la grasa por el método de Babcock, en 20 muestras de yogures comerciales con las normas citadas, determina que solo el 50 % de los yogures cumplen con lo mencionado en su etiqueta, y que los yogures descremados contienen más grasa que la declarada.

En el año 2009, la estudiante de Química Farmacéutica Margarita Ortiz presenta la tesis Metodología De Análisis Microbiológico Para El Yogurt Que Se Comercializa En Guatemala. – Aporte parcial para la elaboración de una norma oficial guatemalteca para el yogurt. En ella, establece una metodología para el análisis fisicoquímico de yogur comercializado en Guatemala, basado en revisiones documentales de control de calidad microbiológico internacional, el cual incluye bacterias iniciadoras, *Lactobacillus delbrueckii* Subsp. *bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus* por conteo en placa Agar Lee, *E. coli* por el método del número más probable (NMP) y, por último, la determinación de patógenos *Staphylococcus Aureus* (Método de Baird-Parker).

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Generalidades sobre helado de yogur

El yogur es un postre a base de leche fermentada, con una textura semisólida que depende de la cantidad de sólidos presentes en la leche inicial. Se originó hace siglos y ha cobrado popularidad alrededor del mundo en las últimas décadas. Su nombre proviene del vocablo turco *yogun* que significa grueso. La consistencia, sabor y aroma del producto, dependen de la región donde se prepare, aunque los ingredientes básicos son los mismos, puede haber variantes en el proceso que den como resultado un yogur con distintas características.

El helado de yogur posee características similares a las del yogur refrigerado. Ambos son cultivados con los mismos microorganismos. Es un postre refrescante y ácido, que combina la textura de un helado, con bajo contenido de grasa, bajo o libre de lactosa. El yogur helado es relativamente nuevo, ya que se inventó durante la década de 1970 como un postre suave, al inicio conocido como *Frogurt*, comercializado por HP Hood, una operadora láctea en Nueva Inglaterra. Con ello, años más tarde se conoció como producto alternativo a los helados

Con las mejoras tecnológicas en la década de 1848, se patentó el primer congelador, tiempo después en Estados Unidos, Jacob Fussell de Baltimore abrió la primera fábrica de helados industrial, se integraron máquinas y homogeneizadores con lo que mejoró la salubridad y textura del helado.

La invención del congelador de expansión directa, el auge de los procesos continuos y los refrigeradores de baja temperatura durante 1940 amplió la industria del postre helado, se abrieron nuevos mercados. Por último, a finales de 1960 y 1970, se desarrolló equipo de alta tecnología que fue capaz de procesar volúmenes más grandes y abrió paso prosperó a esta industria.

Más adelante, con las mejoras en la estabilidad y sabor del yogur, se ha logrado mayor aceptación del mercado por su versatilidad, como un helado cremoso. Puede servirse en cono y copas, con cobertura, en crepas, con *siropes*, *toppings* y distintas combinaciones, es un producto saludable que estimula la salud intestinal y bajo en calorías. Yogur helado, yogur congelado, *Frozen yogurt*, son algunas denominaciones para el postre congelado hecho de o que contiene yogur. El helado de yogur contiene en forma general, leche, cultivos de yogur y edulcorantes naturales o artificiales.

2.1.1. Materias primas

2.1.1.1. Leche

Puede ser entera, descremada, parcialmente descremada, leche entera enriquecida o modificada, ya sea en líquido o polvo. A nivel industrial se usa únicamente leche de vaca, para materias en polvo se usa agua como reconstituyente. La obtención de yogur de buena calidad se da a partir del cumplimiento de los siguientes criterios

- Bajo conteo patógeno bacteriano total
- Libre de antibióticos
- Libre de contaminación por bacteriófagos

La grasa láctea, toma en cuenta la grasa tanto de la leche como de los sólidos que se agreguen. Esta grasa representa entre el 0,5 % al 6,0 % de los ingredientes y en función de este contenido puede catalogarse un yogur sin grasa, bajo en grasa o regular.

2.1.1.2. Sólidos de leche no grasos(SLNG)

La mezcla también es enriquecida con productos lácteos tales como leche concentrada descremada, leche descremada en polvo, suero de leche y lactosa, se emplean para aumentar el contenido de sólidos no grasos. Se reconstituyen con agua, puede usarse para estandarizar el porcentaje de sólidos presentes en la leche por fermentar, al final estos darán como resultado un yogur líquido o uno de mayor consistencia. Esta proporción representa entre el 8-14 %.

2.1.1.3. Sólidos grasos

Parte de los sólidos totales, lo conforman la grasa que se adiciona a la mezcla que se fermentará para el helado de yogur, sin esta no se podría obtener la cremosidad característica de un helado, además de la suavidad, con una correcta proporción de emulsificante, los sólidos grasos y no grasos dan consistencia, cremosidad y cuerpo al producto final.

2.1.1.4. Azúcar, saborizantes y estabilizantes

El azúcar constituye entre el 15-17 % de los ingredientes. La sacarosa es el edulcorante primario y natural. Aunque se mezclan edulcorantes artificiales. El azúcar adquiere importancia porque aporta dulzura y mejora el cuerpo, la viscosidad y aumenta la concentración de sólidos totales en el producto.

Entre los estabilizantes se incluyen la carboximetilcelulosa, goma de algarrobo, guar, alginatos, carrageninas y proteínas de suero que reducen la cristalización, obstaculizan la fusión y mejoran las propiedades de manejo del producto final. Los emulsificantes mejoran la emulsión entre el aire, los sólidos y la grasa

2.1.1.5. Cultivo iniciador

En el proceso de fabricación del yogur, la leche debe ser fermentada hasta la acidez deseada. En este punto se espera tener la mayor cantidad de bacterias ácido-lácticas. debe contener *Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*, para que pueda considerarse yogur. La inoculación se lleva a cabo a temperaturas entre 35-45° C, rango de condición de crecimiento óptimo de las bacterias. El cultivo iniciador es una mezcla simbiótica de *Streptococcus thermophilus* (ST), *Lactobacillus bulgaricus* (LB) principalmente, para los yogures comunes a base de cultivos alternativos contienen *Streptococcus thermophilus* y toda especie *Lactobacillus*.

El crecimiento de las bacterias es independiente, pero al unirse en el mismo medio, la producción de ácido láctico es mucho mayor. Los *Streptococcus thermophilus* producen ácido y dióxido de carbono durante su crecimiento. El dióxido de carbono producido estimula el crecimiento de los *Lactobacillus bulgaricus* lo que, a su vez, produce péptidos estimuladores y aminoácidos para los *Streptococcus thermophilus*.

2.2. Proceso de fabricación

La manufactura del helado de yogur es muy similar a la fabricación de un helado cremoso normal, con excepción de que el yogur o base de yogur se

agrega a la mezcla de helado y dado que no hay estándares gubernamentales para identificar un helado de yogur, su composición puede variar dependiendo de la marca.

2.2.1. Preparación de la mezcla base de helado

El helado de yogur se compone de dos mezclas, una que es la base de helado y la base cultivo de yogur, la cual contiene los microorganismos ácido-lácticos. De acuerdo con la formulación usada, en general se miden y mezclan los ingredientes secos y líquidos por separado. La mezcla de líquidos debe calentarse y, posteriormente, se le agregan los sólidos. Se realiza en este orden para mejorar la disolución, activar los estabilizantes y mejorar la emulsión 50 y 60° C.

2.2.2. Pasteurización

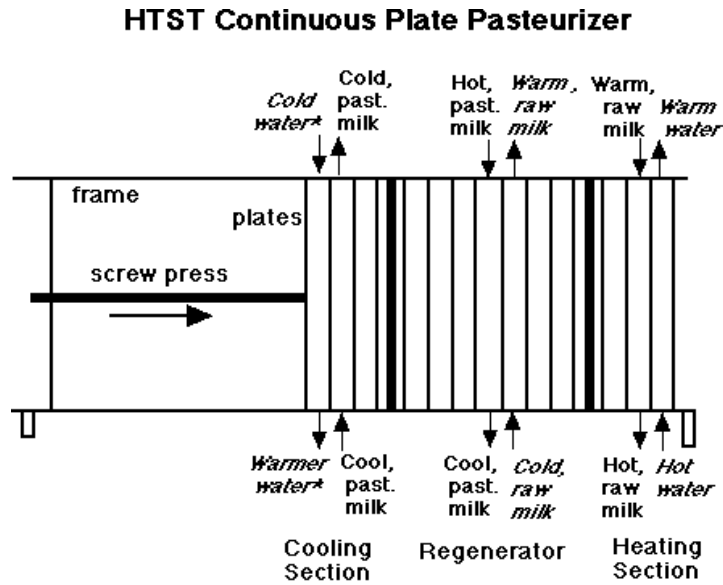
Este paso se realiza para la mezcla base de helado y para la base de cultivo. La pasteurización consiste en elevar rápidamente la temperatura del fluido y enfriarlo rápidamente. El método de pasteurización depende de la temperatura alcanzada, por lo general cuanto mayor sea la temperatura requerirá menor tiempo, como se describe en la siguiente tabla:

Tabla I. **Tipos de pasteurización**

Proceso	Temperatura (°C)	Tiempo
VAT(Pasteurización lenta)	63	30 minutos
Proceso HTST (Alta Temperatura, Corto Tiempo)	72	15 segundos
UHT(Ultra Alta Temperatura)	138	1 – 2 segundos

Fuente: <http://es.wikipedia.org/wiki/Pasteurizaci%C3%B3n>. Consulta: 17 de junio de 2015.

Figura 1. **Pasteurizador HTST**



Fuente: <https://www.uoguelph.ca/foodscience/book-page/htst-milk-flow-overview>. Consulta: 2 de octubre de 2016.

Luego, es importante reducir la temperatura rápidamente hasta alcanzar 4° C o 5° C, para conservar la mezcla.

2.2.3. **Homogenización**

A pesar de que la mezcla ha sido diluida y se le ha aplicado temperatura para mejorar la miscibilidad de los ingredientes, aún quedan grumos de material sin disolver o pequeños glóbulos de grasa. El objetivo de la homogenización es disminuir el tamaño de esas partículas grasas a menos de dos micrómetros.

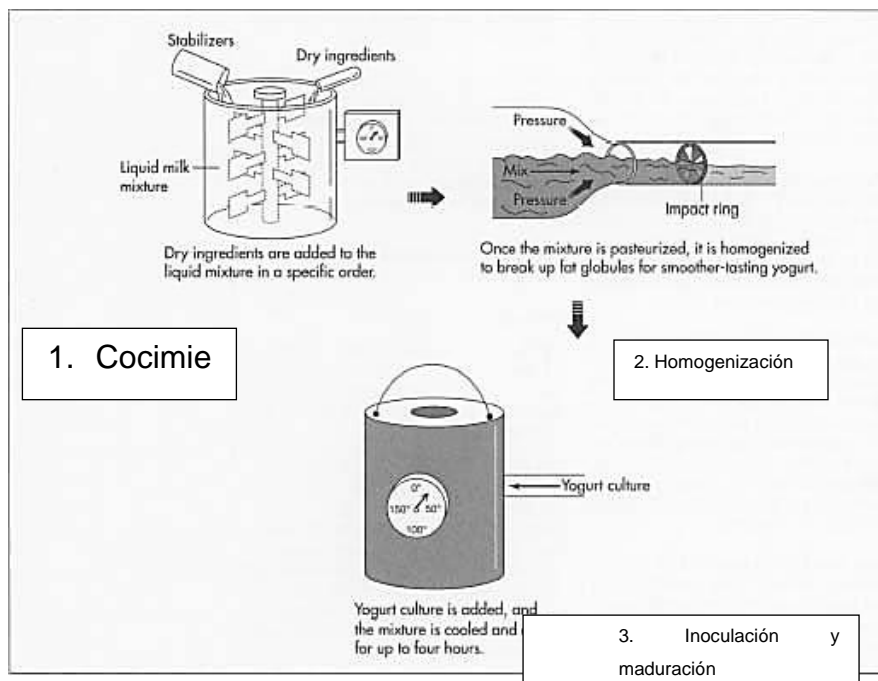
El proceso de homogeneización consiste en bombear el lote a través de una pequeña válvula que tiene en contra un anillo de impacto. A medida que la mezcla pasa a alta velocidad (3 000 pie/min por lo general) a través de la

válvula, las fuerzas de corte van rompiendo las partículas de grasa. El anillo de impacto rompe la grasa adicional y para completar el proceso, ocurre cavitación, donde las burbujas de vapor crean presión por descarga repentina.

2.2.4. Inoculación del cultivo

La leche de la base cultivo de yogur, se mezcla con los ingredientes y estabilizantes según los requerimientos del cultivo. El cultivo generalmente es distribuido por firmas como Danisco y otras. Cada sobre del producto debería incluir una ficha de especificaciones donde mencione los requerimientos de la leche para inocular, así como el tiempo y la temperatura optima, por lo general el tiempo está entre 4 a 6 horas, entre una temperatura de 35 ° C – 45° C.

Figura 2. **Cocimiento, homogenización e inoculación**



Fuente: <http://www.madehow.com/Volume-2/Frozen-Yogurt.html>. Consulta: 25 de junio de 2015.

2.2.5. Refrigeración y maduración

Durante la refrigeración, ocurre también la maduración de la mezcla. Para ello se recomienda 4 horas como mínimo para aportar consistencia y acentuar el sabor del yogur. La temperatura debe mantenerse a menos de 4° C.

2.2.6. Saborización

Consiste en agregar los ingredientes finales a la mezcla de helado de yogur, estos incluyen:

- Edulcorantes
- Colorantes
- Aromatizantes
- Otras bases de leche para enriquecer el producto
- Frutas

Esto se agrega al final para no alterar el crecimiento de las bacterias del yogur.

2.2.7. Congelación y batido

Mientras el producto se congela, se aplica agitación para incorporar aire a la mezcla, este efecto se denomina *over-run* o incremento de volumen. Esta adición de aire también le da consistencia cremosa y suave. Dependiendo del incremento de volumen deseado, se batirá en frío un volumen inicial, con la siguiente relación:

Calculo de *over-run* para un helado cremoso

$$Over - run = \frac{(V_f - V_i) * 100}{V_i} \quad [\text{Ecuación 1. Referencia. 17}]$$

Donde:

Over-run: exceso de aire [%]

V_f : Volumen final de helado de yogur deseado [mL]

V_i : Volumen inicial de mezcla [mL]

El producto es en sí, una emulsión y espuma. La emulsión está formada por la grasa de la leche dispersa en una fase acuosa que contiene, azúcar, ácido y otros sólidos. Lo espumoso se forma por pequeños sacos de aire que se dispersan a través de la emulsión y se estabilizan por colisión de las moléculas de grasa.

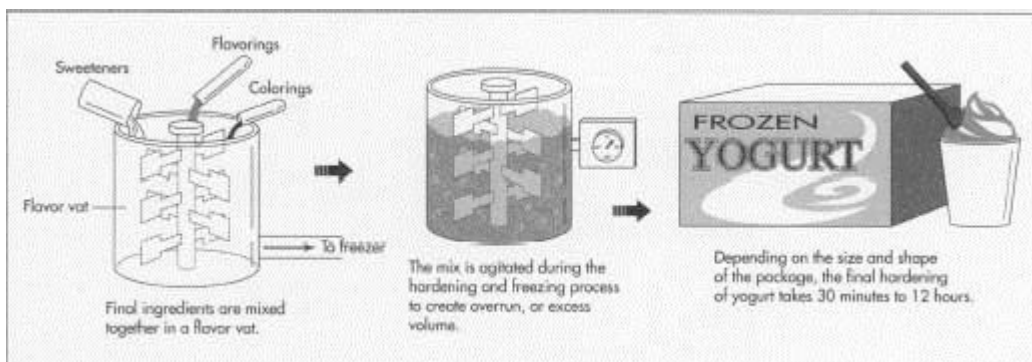
2.2.8. Empaquetamiento y endurecimiento

Cuando se ha incorporado el *overrun* deseado, el producto se lleva inmediatamente a congelación para que conserve la consistencia y el aire incorporado durante el batido. La temperatura mínima de congelación debe ser -18° C, pero idealmente a -26°C. Para mejores resultados, el proceso de congelación debe ser rápido, para que la mezcla no forme cristales grandes de hielo. Para el almacenamiento puede ser en continuo o por lotes. Dependiendo del tipo de congelador, tamaño y forma de paquete. El endurecimiento final tarda entre 30 minutos a 12 horas.

En este punto, el yogur puede ser.

- Helado de yogur envasado batido: como un helado de leche común, de consistencia cremosa, con frutas y saborizantes naturales o artificiales.
- Helado de yogur extruido sin saborizante: para preparación posterior con frutas o saborizantes en un punto de venta.
- Helado de yogur extruido con sabor: como una paleta helada que contiene fruta o aditivos.
- Mezcla base helado de yogur: para ser batida y saborizada en el punto de venta como novedades.

Figura 3. **Saborización, congelación, batido y empaquetamiento**



Fuente: <http://www.madehow.com/Volume-2/Frozen-Yogurt.html>. Consulta: 2 de diciembre de 2016.

2.3. Control de Calidad

2.3.1. Microbiológico

Inicialmente, los microorganismos patógenos para el ser humano, no se encuentran en los alimentos, pero puede ingresar a los mismos a través del aire

o personas portadoras, resisten temperaturas de 25° C e inferiores. El tiempo de sobrevivencia varía según el alimento de que se trate. Este postre lácteo puede ser susceptible a los siguientes patógenos.

- *Staphylococcus* o Estafilococos

Pertenecen a la familia de los *Micrococcaceae* y se distinguen tres especies: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermis* y *Staphylococcus saprophiticus*. Son cocos de 0,5-1 micras de diámetro, agrupados en racimos, son Gram positivos, no móviles. Crecen bien en cultivos ordinarios en condiciones aerobias, forman colonias grandes y cremosas de 13 mm

El resultado de *Staphylococcus aureus* es un indicador de los métodos de limpieza y desinfección usados en la industria de alimentos. La presencia de *Staphylococcus aureus* en un alimento por sí sola no es la causa de un brote de intoxicación alimentaria. Es conveniente demostrar la presencia de otras enterotoxinas. En alimentos manipulados contaminados, el periodo de incubación será menor a cuatro horas después de la ingestión (diarreas, deshidratación y vómitos). La presencia de *Staphylococcus aureus* en ciertos alimentos reviste importancia por tratarse de un microorganismo parásito del hombre y animales superiores.

Cuando se pone de manifiesto en algún alimento, se puede asociar este hecho con una exposición a la contaminación por humanos durante su manejo y de modo eventual a una contaminación de origen, si el animal de donde proviene el alimento sufría alguna infección piógena.

- Coliformes

Los coliformes son microorganismos bacilo Gram negativos, aerobios o anaerobios, no esporulados, pueden fermentar la lactosa con producción de ácido y gas, dependiendo de la especie. Por lo general están presentes en la flora del tracto intestinal del humano y de los animales, y son expulsados en las heces. Los coliformes son ampliamente analizados en la microbiología de la industria de alimentos, ya que es un indicador de prácticas higiénicas inadecuadas, en especial la *Escherichia coli*.

- *Listeria monocytogenes*

Es una bacteria Gram positiva y catalasa positiva, no esporógena, anaerobia facultativa, con forma de bacilos cortos. Su tamaño varía entre 0,5 a 2 micras de largo por 0,5 micras de ancho. Esta bacteria presenta una motilidad tipo “tumbling” entre 20 a 25° C, pero a 35° C es inmóvil, generalmente la *Listeria monocytogenes* es resistente a condiciones severas de congelación, acidez y estrés gracias a que produce biofilms.

En el humano, produce la enfermedad llamada listeriosis, afecta la vía intestinal, provoca gastroenteritis, diarrea, náuseas, dolor de cabeza, fatiga y mialgia dentro de 9 a 32 horas. Los alimentos pueden contaminarse con esta bacteria al ser preparados en ambientes húmedos y fríos, en condiciones de congelamiento hasta -18° C.

- *Salmonella ssp*

La bacteria, se caracteriza por ser Gram negativo. Pertenece a la familia *Enterobacteriáceas*, anaerobia facultativa, no forma esporas y presenta

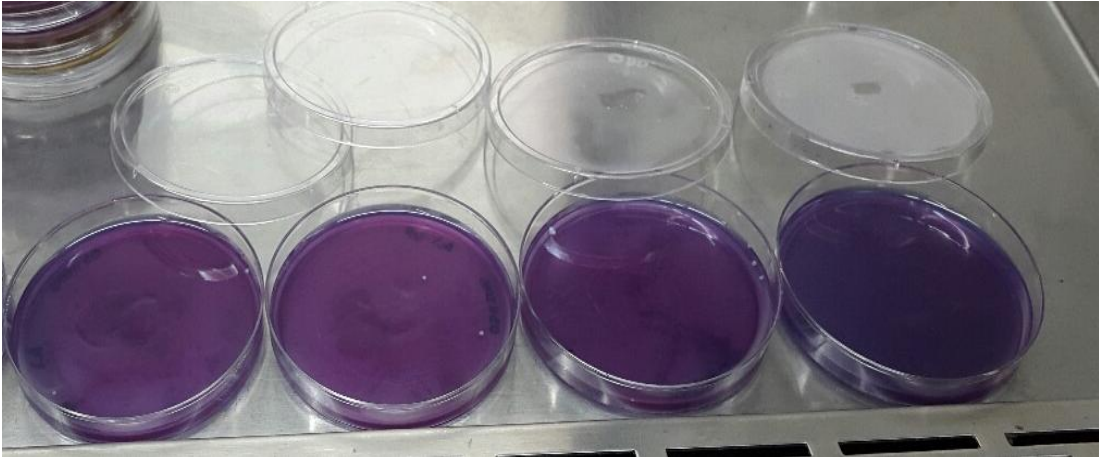
movilidad debido a los flagelos peritricos que posee. Sobreviven a severas condiciones ambientales como la congelación y refrigeración, pero mueren por calentamiento a más de 70° C. Puede transmitirse a través de heces, alimentos, agua contaminada, materiales y utensilios de cocina. Provoca salmonelosis, una enfermedad no sistemática o gastroenteritis, tiene un periodo de incubación de 12 a 17 horas, puede presentar síntomas iniciales como fiebre ligera, náuseas, vómitos, dolor abdominal y diarrea.

Luego, puede presentar fiebre tifoidea entérica y paratifoidea, sensibilidad abdominal, manchas en la piel y perforaciones en el intestino causando peritonitis.

2.3.2. Bacterias ácido-lácticas, *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus*

Streptococcus thermophilus es una bacteria gram positiva, anaerobio facultativo y catalasa positiva. No posee motilidad, tampoco forma esporas. Su temperatura de crecimiento optimo se da entre 35° C y 42° C mientras que *Lactobacillus* crece entre 43° C y 46° C, *Lactobacillus bulgaricus* posee las mismas características que *Streptococcus thermophilus* excepto que su pH de crecimiento oscila entre 4.6 a 5.4. Estas bacterias desarrollan una relación simbiótica, ya que *Streptococcus thermophilus* produce ácido fólico y ácido fórmico, los cuales favorecen el crecimiento de *Lactobacillus bulgaricus*. Estas bacterias fermentan la leche y transforman la lactosa en ácido láctico.

Figura 4. Medio de Agar Lee



Fuente: elaboración propia.

Tabla II. Características de crecimiento en medio selectivo agar Lee

Características	<i>Streptococcus thermophilus</i>	<i>Lactobacillus bulgaricus</i>
Medio de Agar de Lee	Colonias traslucidas y amarillas	Colonias Blancas

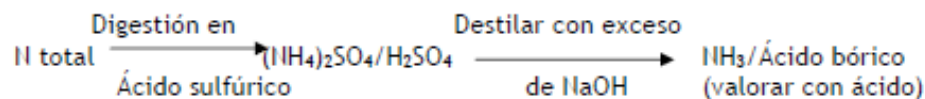
Fuente: A.Y. Tamime, R.K. Robinson. Yogur, Ciencia y Tecnología, página 334.

2.3.3. Análisis fisicoquímico

- Proteína láctea

La proteína es de origen lácteo en este tipo de producto, puede ser del suero de leche o la caseína. La proteína de suero es la que se encuentra disuelta en agua mientras que la proteína insoluble, se llama caseína, ambas se forman de gran cantidad de aminoácidos esenciales que son de fácil digestión.

Figura 5. Etapas del método Kjeldahl



Fuente: Fundamentos y técnicas de análisis de alimentos.

http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/FUNDAMENTOSYTECNICASDEANALISISDEALIMENTOS_12286.pdf. Consulta: 3 de febrero de 2017

El método de análisis de proteína se basa en la destrucción de la materia orgánica con ácido sulfúrico concentrado, como consecuencia se forma sulfato de amonio que, en presencia de hidróxido de sodio, libera amoníaco, este se destila y se recibe en solución de ácido bórico con indicador mixto. Luego, se valora el sulfato de amonio presente en solución, con un estándar, ya sea HCl o H₂SO₃ 0,1N. El método Kjeldahl para proteínas es ampliamente reconocido.

La fórmula para su cálculo es:

$$\%Proteína = \left(\frac{14 \cdot C \cdot V}{10 \cdot m} \right) \cdot f \quad [Ecuación 2 Ref. 16]$$

Donde:

- C: Concentración del titulante [N]
- V: Volumen de titulante [mL]
- m: Masa de la muestra [g]
- f: 6,38 factor para lácteos y derivados

- Sólidos totales

Su análisis se realiza por medio de mufla y desecador. Se coloca una muestra previamente pesada en el desecador, el cual reduce la humedad hasta 40%, por último, se coloca 48 horas en la mufla donde se extrae el resto de humedad, el resultado son los sólidos totales.

- Acidez y pH

En la elaboración de la base cultivo de yogur, la lactosa se descompone y forma galactosa y glucosa. A partir de la glucosa se produce el ácido láctico, que da el sabor característico al yogur y productos lácteos fermentados. La acidez expresada en % y el pH, son propiedades ligadas y muy importantes ya que son indicadores de la cantidad de microorganismos que pueden estar presentes en el yogur.

El pH es una propiedad principal, ya que durante la producción se busca disminuir el pH de la leche. Estas propiedades influyen en el sabor y la textura del helado final. La acidez expresada como ácido láctico se mide por titulación alcalino-métrica con NaOH 0,1N valorada y con fenolftaleína como indicador:

Procedimiento.

- Pesar 18
- g de muestra y adicionar 2 veces el peso de la misma en agua, agitar vigorosamente.
- Agregar 0,5 ml de indicador de fenolftaleína.
- Titular con solución de hidróxido de sodio 0,1N hasta la aparición de color rosa permanente por al menos 30 segundos.

$$\% \text{ Acidez (expresada como ácido láctico)} = \frac{V * N * 90}{M}$$

[Ecuación 3. Referencia 2]

Donde:

V = Volumen de titulación [mL]

N = Normalidad de la solución de NaOH [meg/mL]

M = Volumen o peso de la muestra [mL]

90 = Peso molecular del ácido que predomina en el producto

- Porcentaje de grasa

Generalmente, constituido por grasa butírica o de origen lácteo, la cual es complementada con grasa vegetal en la mayoría de casos. El contenido de grasa depende del tipo de leche con que se preparó. El contenido puede variar entre 0,4 % hasta el 3,3 %, puede ser grasa saturada como mono insaturado. Se constituye de una amplia gama de ácidos grasos. Para su análisis, el método se basa en la separación de la grasa de la mezcla, por medio de un disolvente ácido fuerte. Luego, se forman dos fases en el frasco Babcock, la fase superior es el contenido de grasa de la muestra.

2.4. Legislación

2.4.1. Códex Stan 243-2003

Para el yogur refrigerado la composición del producto final deber ser:

Tabla III. **Parámetros fisicoquímicos para el yogur o yogur a base de cultivos alternativos y leche acidófila**

Característica	Parámetro
Proteína láctea (%w/w)	>2,7
Grasa Láctea (%w/w)	<15
Ácido valorable cómo % de ácido láctico (%w/w)	>0,6
Cultivos simbióticos de <i>Streptococcus thermophilus</i> y <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subesp. <i>Bulgaricus</i> .	≥10,0 ⁷ UFC/g
Microorganismos etiquetados	≥10,0 ⁶ UFC/g
Ingredientes no lácteos (%)	<50
a El contenido en proteínas es 6,38 multiplicado por el nitrógeno Kjeldahl total determinado.	

Fuente: CODEX STAN 243-2003.

Los criterios de la tabla anterior no se aplican para productos tratados térmicamente luego de la fermentación y su cumplimiento deberá verificarse hasta la fecha de caducidad del producto, después de que ha sido almacenado como se especifica en la etiqueta. Aunque la tabla III hace referencia a yogur y no a helado de yogur específicamente, el inciso 7.1.1. Aclara: “Los términos específicos anteriores podrán ser empleados en conexión con el término “congelado” siempre y cuando (i) el producto a ser congelado cumpla con los requisitos de esta Norma, (ii) los cultivos específicos puedan ser reactivados en cantidades razonables por descongelado y (iii) el producto congelado sea denominado como tal.”

2.4.2. Norma NTE INEN 706-2013

El Instituto Ecuatoriano de Normalización INEN, ha establecido la Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 706:2013. Define como helado de yogur al producto donde todos, o parte de los ingredientes lácteos, son inoculados y

fermentados con un cultivo característico de microorganismos productores de ácido láctico (*Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*) y probióticos, los cuales deben ser abundantes y viables en el producto final.

Tabla IV. **Requisitos fisicoquímicos para helados y mezclas de helados**

Característica	Parámetro
Grasa total (láctea y vegetal) (%w/w)	>3,00
Sólidos totales (%w/w)	>25
Proteína láctea (%w/w) ⁹	>1,8
Ensayo de fosfatasa alcalina	Negativo
Peso/Volumen (g/L)	> 475
Acidez como ácido láctico (%w/w)	>0,25
Colorantes	Ausencia/presencia

Fuente: NTE INEN 706:2013.

Tabla V. **Requisitos microbiológicos para helados o mezclas para helados concentrada o líquida**

Requisito	Nivel de aceptación	Nivel de rechazo
<i>Escherichia coli</i> NMP/g	< 3	<10
<i>Staphylococcus aureus</i> UFC /g	< 10	10
<i>Salmonella ssp</i> /25g	Ausencia	Ausencia
<i>Listeria monocytogenes</i> /25g	Ausencia	Ausencia

Fuente: NTE INEN 706:2013. Tabla 2.

3. DISEÑO METODOLÓGICO

3.1. Variables

3.1.1. Variables de control

Tabla VI. **Determinación de variables de control a escala laboratorio**

Variable	Dimensional		Factor potencial de diseño		Factores Perturbadores	
			Constante	Variable	Controlable	No Controlable
Temperatura	Celsius	°C	X		x	
Factor de dilución	Adimensional	--		X	X	

Fuente: elaboración propia.

3.1.2. Variables dependientes y respuesta

Tabla VII. **Determinación de las variables dependientes a escala laboratorio**

Variable	Dimensional		Factor potencial de diseño		Factores perturbadores	
			Constantes	Variables	Controlable	No Controlable
Bacterias ácido-lácticas	Unidades formadoras de colonias por gramo	UFC/g		X		X

Fuente: elaboración propia.

3.1.3. Variables de medición

Tabla VIII. Determinación de las variables de medición

Variable	Dimensional		Instrumento de medición
Bacterias iniciadoras (Streptococcus thermophilus y <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subespecie <i>bulgaricus</i>)	Unidades formadoras de colonias por gramo	UFC/g	Conteo en placa
Acidez de la muestra	%Acidez	% A	No aplica
Grasa	Porcentaje	%	Método de Babcock
Proteína	% Proteína	%	Método Kjeldahl
Sólidos totales	% Sólidos	%	Método de mufla
Variable	Dimensional		Instrumento de medición
<i>Staphylococcus aureus</i>	Unidades formadoras de colonias por gramo	Adimensional	Conteo en placa
<i>Listeria monocytogenes</i>	Número más probable	Adimensional	Conteo en placa
<i>Salmonella ssp/25g</i>	Unidades por cada 25 gramos	Adimensional	Ausencia/presencia en caldo Rappaport
<i>Escherichia coli</i>	Número más probable	Adimensional	Conteo en placa

Fuente: elaboración propia.

3.2. Delimitación del campo de estudio

Área: Tecnología de los Alimentos

Industria: Alimenticia, control de calidad

Línea de Investigación: microbiología de alimentos, helado de yogur

Proceso

Se adaptó metodologías conocidas para el análisis de calidad en helado de yogur que incluyó cuantificación de bacterias iniciadoras del yogur

(*Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii* subespecie *bulgaricus*) por medio de conteo en placa sobre agar, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella ssp*, *Staphylococcus aureus* y proteína láctea, grasa, sólidos totales y acidez como propiedades fisicoquímicas.

Ubicación

El desarrollo experimental, incluyendo las actividades de investigación y recolección de muestras se llevó a cabo de la siguiente manera

- Recolección de muestras de helado de yogur para el análisis, se realizó en un centro comercial de la ciudad de Guatemala.
- Análisis microbiológico de patógenos y bacterias de yogur en el Laboratorio de Análisis Fisicoquímico y Microbiológico LAFYM, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Zona 1, Guatemala, Guatemala.
- Análisis fisicoquímico en el Laboratorio de Bromatología, Facultad de Veterinaria, Universidad de San Carlos.

3.3. Recursos humanos disponibles

Los recursos humanos involucrados en la investigación además de la investigadora y asesora, incluyó a los colaboradores de los laboratorios donde se desarrolló la parte experimental.

Investigador: Blanca Yesenia Imuchac Gil

Asesora: Ms. Sc. Ing. Hilda Palma de Martini

3.4. Recursos materiales disponibles

Los recursos físicos de la parte experimental fueron seleccionados con base a la disponibilidad de equipos para cada método que se evaluó. Para ello se presentó la propuesta del ensayo previo a la aprobación del uso de instalaciones y equipo. El análisis microbiológico se realizó en el Laboratorio de Análisis Físicoquímico y Microbiológico de la facultad de Farmacia, ubicado en la zona 1, ciudad de Guatemala. El análisis y caracterización fisicoquímica se llevó a cabo en el laboratorio de Bromatología, facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad de San Carlos de Guatemala.

Material Orgánico

- Helado de yogur
- Agar bismuto sulfito
- Agar Byrd Parker
- Agar Lee
- Agar Oxford
- Caldo bilis verde brillante
- Caldo lactosado
- Caldo listeria
- Caldo TS

Material inorgánico:

- Ácido sulfúrico concentrado
- Solución de hidróxido de sodio 40 %
- Ácido bórico 4 %
- Rojo de metilo

- Ácido bórico
- Compuesto para medio anaerobio
- Sulfato de potasio
- Sulfato de cobre

Cristalería y Equipo

- Equipo Kjeldhal
- Mechero de Bunsen
- Balanza analítica
- Balanza analítica, capacidad de 3 000 g, lectura mínima de 0,01 g
- Balón aforado de 50 y 100 mL
- Beakers
- Bureta de 200 mL
- *Tips* o puntas para pipeta automática 1 mL
- Azas desechables
- Tubos de ensayo
- Frasco de 250 mL con tapa
- Paletas desechables
- Pipeta graduada de 2 mL
- Pipetas automáticas de 25 micro litros a 1 mL
- Plancha de calentamiento
- Porta objetos
- Potenciómetro
- Probetas
- Termómetros
- Tubos de ensayo
- Tubos estériles con tapón de rosca

- Autoclave
- Campana de extracción
- Frasco para medio anaerobio
- Incubadora
- Congelador

3.5. Técnica cualitativa y cuantitativa

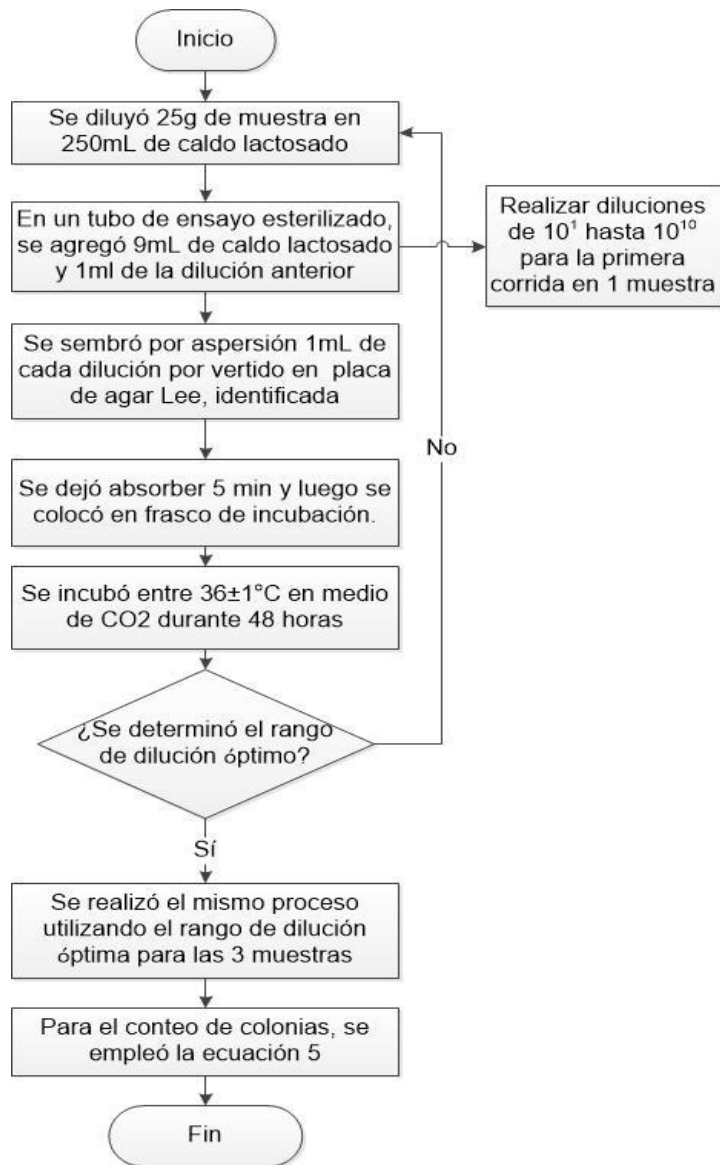
El método fue una adaptación de técnicas que han sido aplicadas a otros alimentos de esta índole, se aplicó metodologías de control de calidad fisicoquímico y microbiológico usados en otros alimentos lácteos, en este caso para helado de yogur.

A la vez se aplicó la técnica cuantitativa ya que se desarrolló una propuesta para el conteo de bacterias ácido-lácticas de yogur (*Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii* subespecie *bulgaricus*) y se realizó una revisión documental que enlista los parámetros fisicoquímicos y microbiológicos que debe cumplir un helado de yogur, los cuales fueron % de acidez, solidos totales, proteína y grasa total. Se analizaron patógenos, como *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* y *Salmonella ssp.* Por lo que el estudio fue cuantitativo y cualitativo.

3.5.1. Diagrama de flujo de proceso

3.5.1.1. Bacterias ácido-lácticas

Figura 6. Diagrama de flujo análisis de bacterias ácido-lácticas



Fuente: elaboración propia. Microsoft Visio 2010.

3.5.1.2. Escherichia coli

Se realizó por la técnica del Numero Más Probable

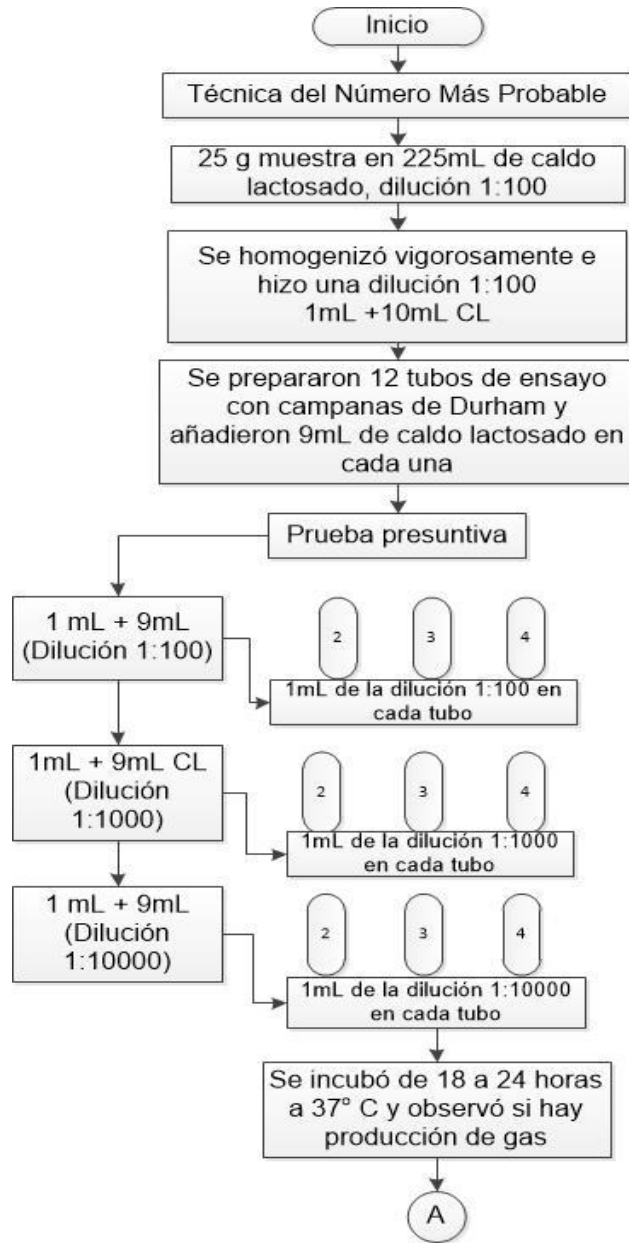
$$\frac{NMP}{g} = \frac{NMP \text{ de la tabla}}{g \text{ de muestra}} \quad [\text{Ecuación 4, referencia 1}]$$

Donde:

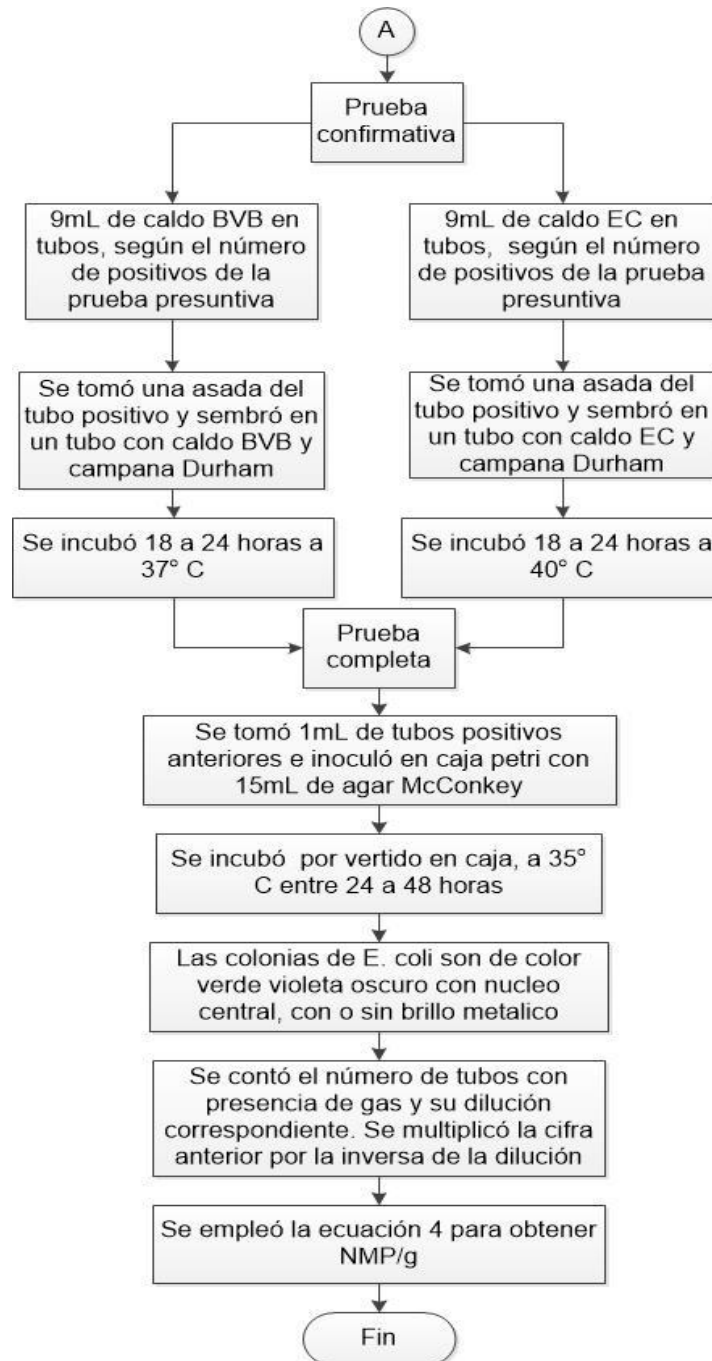
NMP/g: Numero más probable por gramo de muestra

NMP de la tabla: Ver anexo 1

Figura 7. Diagrama de flujo de análisis de *E. coli*



Continuación de la figura 7



Fuente: elaboración propia. Microsoft Visio 2010.

3.5.1.3. Staphylococcus aureus

- Aislamiento y numeración
 - Se diluyeron 25g de muestra en 225mL de caldo lactosado bien homogeneizado.
 - Se transfirió asépticamente 1mL de la suspensión de la muestra a 3 cajas de Agar Baird Parker, distribuir 1mL de inóculo equivalente en 3 cajas (0,4, 0,3y 0,3mL)
 - Se esparció el inóculo sobre la superficie del agar usando azas estériles de vidrio doblado.
 - Se retuvieron las cajas en posición hacia arriba hasta que el inóculo se absorbió (aproximadamente 10 min)
 - Se invirtieron e incubaron las cajas, de 45 a 48 horas a 35° C. Se seleccionaron las cajas con 20 a 200 colonias con características típicas de *Staphylococcus aureus*. (estas son circulares, suaves, convexas, húmedas, de 2 a 3mm de diámetro, no muy pobladas, de color gris o negro, con un margen ligeramente coloreado, rodeadas por una zona opaca y frecuentemente con una zona clara afuera). Poseen consistencia pegajosa cuando se toca con un asa.
 - Si los resultados fuesen positivos, se realizaría la prueba de confirmación, se toman el criterio de conteo de colonias (20-200).
 - Si la caja con dilución mejor posee <20 colonias, se puede usar como prueba de confirmación.

- Prueba de confirmación, coagulasa
 - Se seleccionó una colonia de cada tipo, características similares.

- Se agregó el número de colonias en cajas por triplicado representado por colonias que dan pruebas de coagulasa positiva y multiplicarlo por el factor de dilución de la muestra.
 - Se reportaría ese número como resultado de *Staphylococcus aureus*/g de alimento analizado.
 - Las colonias sospechosas de *Staphylococcus aureus* se transfirieron a tubos pequeños con 4mL a 5mL de caldo BHI y se emulsificó completamente.
 - Con lo anterior, se inoculó agar tripticasa soya con un asa llena de suspensión de BHI.
 - Se incubó la suspensión del cultivo de BHI y el agar durante 18 a 24 horas a 35° C
 - Si los resultados en el agar son positivos, retener el cultivo.
 - Se agregó 0,5mL de plasma con EDTA reconstituido al cultivo BHI y se mezcló vigorosamente.
 - Se incubó a 35 °C e inspeccionó periódicamente sobre un periodo de 6 horas para la formación del coagulo.
 - Para el criterio de aceptabilidad, se tomó únicamente el coagulo firme y completo que está en su lugar cuando el tubo se mueve o se invierte, ese fue el resultado positivo de *Staphylococcus aureus*.
- Prueba de la catalasa
 - Se usó el crecimiento de slant en TSA para la prueba catalasa.
 - Iluminar apropiadamente para observar la producción de burbujas de gas.
 - Para ello, se empleó
 - Peróxido de hidrogeno al 30 % refrigerado en frasco ámbar.

- Tubos con agar en slant con un cultivo puro de 18-24 horas del organismo en estudio.
 - Con una aguja o palillo aplicador, se transfirió células de colonia bien aislada a la superficie de un portaobjetos.
 - Se añadió 1 o 2 gotas de peróxido de hidrogeno al 3 %.
 - El criterio de resultado positivo fue la aparición de burbujas de gas o efervescencia.
 - Se emplearon como control positivo muestras aisladas de *Staphylococcus aureus*.
- Utilización anaeróbica de la glucosa
 - Se inocularon tubos de medio de fermentación de carbohidratos, conteniendo glucosa al 0,5 %.
 - Inmediatamente se inoculó cada tubo densamente con un asa hasta el fondo.
 - Se cubrió la superficie del agar con una capa de aceite de parafina estéril.
 - Se incubó durante 5 días a 37° C.
 - Si el indicador cambia amarillo, el cual es producto anaerobio, se toma como positiva la presencia de *Staphylococcus aureus*.

Control positivo: *S. aureus*.

Control negativo: *Streptococcus spp.*

- Utilización anaeróbica del manitol
 - Se repitió el proceso anterior usando manitol como un carbohidrato en el medio *Staphylococcus aureus*.

Control positivo: *Staphylococcus aureus*

Control negativo: *Streptococcus spp.*

- Sensibilidad a *Lysostaphin*
 - Se transfirió la colonia aislada de la caja de agar con un asa inoculada a 0,2mL de buffer de fosfatos salinos y luego se emulsificó.
 - Se transfirió la mitad de las células suspendidas a otro tubo (13x100mm) y mezcló con 0,1mL de buffer de fosfato salino como control.
 - Se Agregó 0,1mL de *lysostaphin* (disuelta en un buffer salino de 0,02N que con NaCl al 0,1%) al tubo original para concentración de 25µg de *lysostaphin*.
 - Se incubó ambos tubos a 35°C por no más de 2 horas.
 - Si la turbidez se aclara en la mezcla de prueba, el resultado es positivo.
 - Si la aclaración no ocurre en 2 horas el resultado es negativo.

Control positivo: *S. aureus*.

Control negativo: *Streptococcus spp.*

Tabla IX. **Resultados según pruebas confirmativas**

Característica	<i>Staphylococcus aureus</i>
Actividad de catalasa	+
Producción de coagulasa	+
Producción de termonucleasa	+
Sensibilidad a lysostaphin	+
Utilización anaeróbica del manitol	+

+ Más del 90% de cepas son positivas.

Fuente: BAM-95.

3.5.1.4. Salmonella ssp

Para el análisis de *Salmonella* se emplearon 25g de muestra y se procedió de la siguiente forma.

- Para el pre enriquecimiento, se diluyó 25g de muestra en 225 mL de caldo Salmocyst e incubó durante 6 horas a 35° C.
- Se agregó 10mL de caldo y 1 pastilla salmocyst en un tubo estéril
- Incubar nuevamente durante 24 horas a 35° C.
- Luego de la incubación, se tomó 1 mL de la muestra e inoculó en Agar Rambach.
- Se incubó 24 horas a 35° C.
- Criterio de aceptación.

Positivo: presencia de colonias rojas.

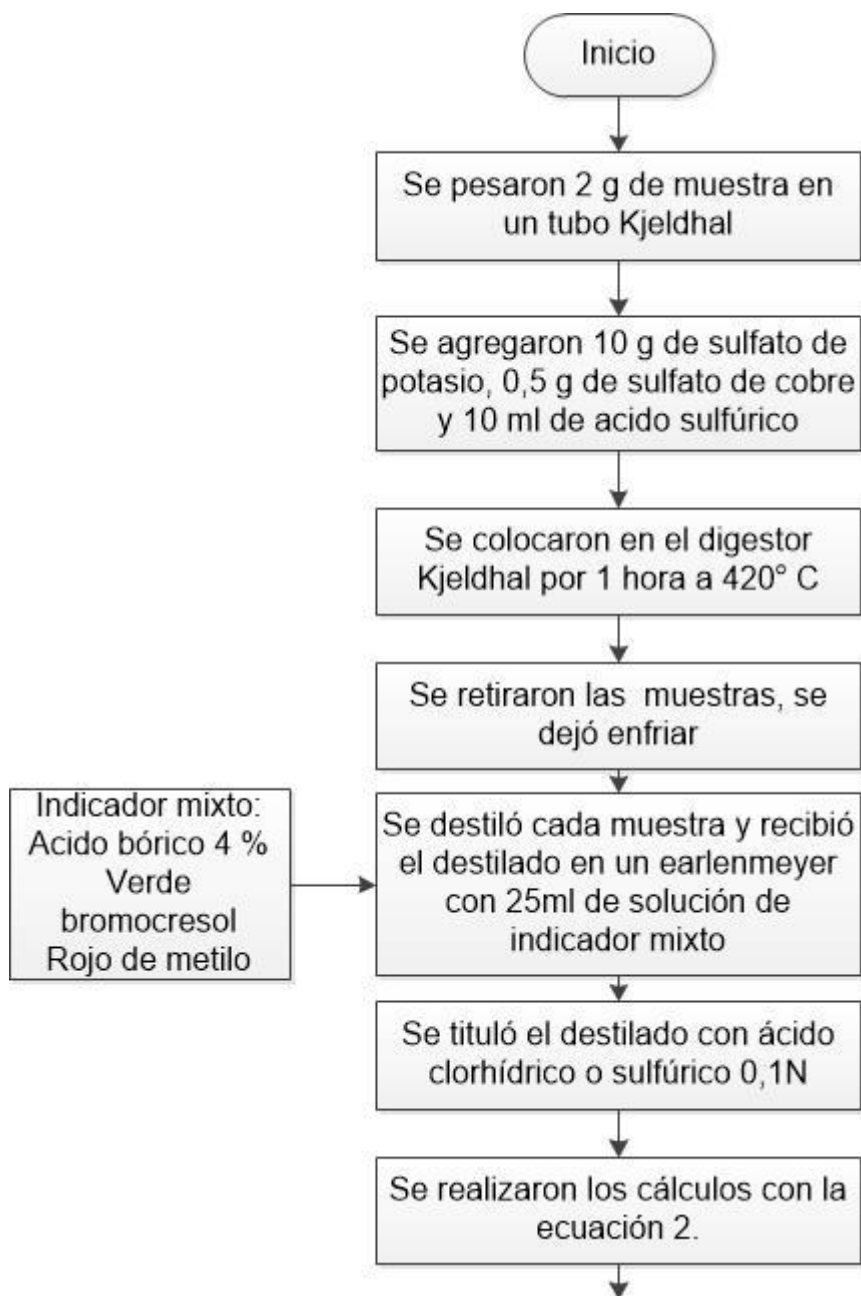
Negativa: ausencia de colonias rojas.

3.5.1.5. *Listeria monocytogenes*

- Temperatura de muestra < 4° C al momento de ser tomada.
- Se tomaron 25g de muestra y se mezcló con 225mL de caldo listeria.
- Para el pre enriquecimiento y enriquecimiento, se incubó por 4 horas a 30° C y continuó la incubación por un total de 48 horas a 30° C, (se añadieron agentes antifúngicos para evitar el crecimiento de mohos y levaduras).
- Se estrió con un asa, un medio selectivo de Oxford-Listeria.
- Se incubó a 35° C de 24 a 48 horas.
- Si se hubiese observado algún crecimiento, realizar la prueba tinción de gram, de haber presencia de *Listeria monocytogenes* se obtendrá un Gram Positivo.
- Realizar una prueba de catalasa, si el resultado es positivo, hay presencia de listeria. En este caso no se observó presencia de listeria.

3.5.1.6. Análisis de proteína

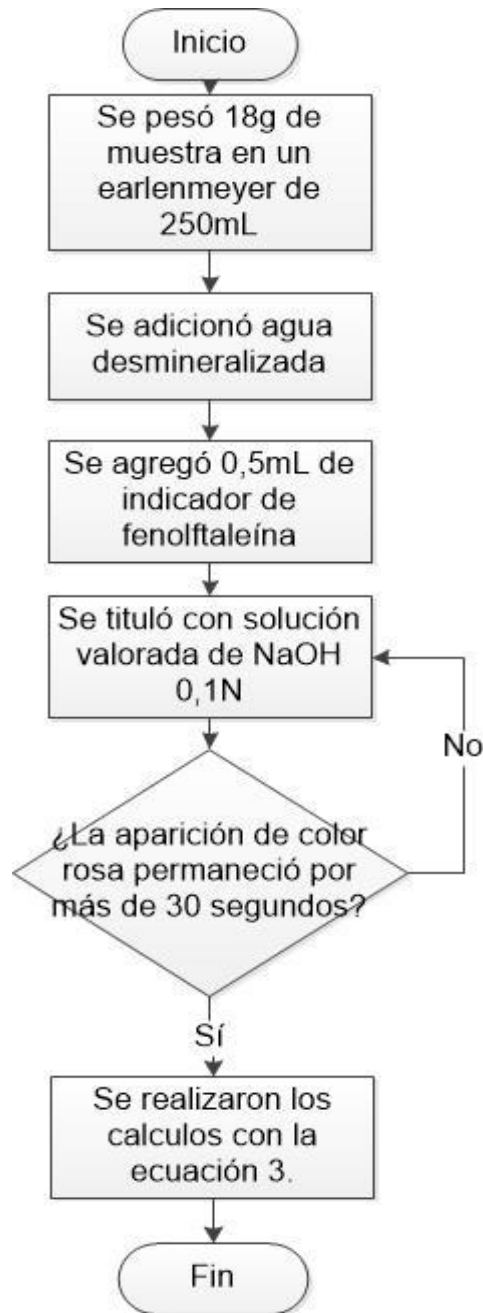
Figura 8. Diagrama de flujo análisis de proteína



Fuente: elaboración propia. Microsoft Visio 2010.

3.5.1.7. Análisis de acidez

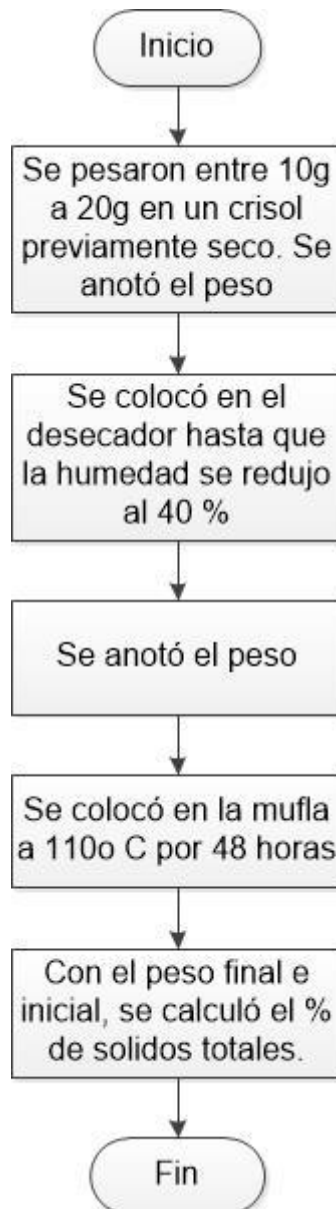
Figura 9. Diagrama de flujo análisis de % de ácido láctico



Fuente: elaboración propia. Microsoft Visio 2010.

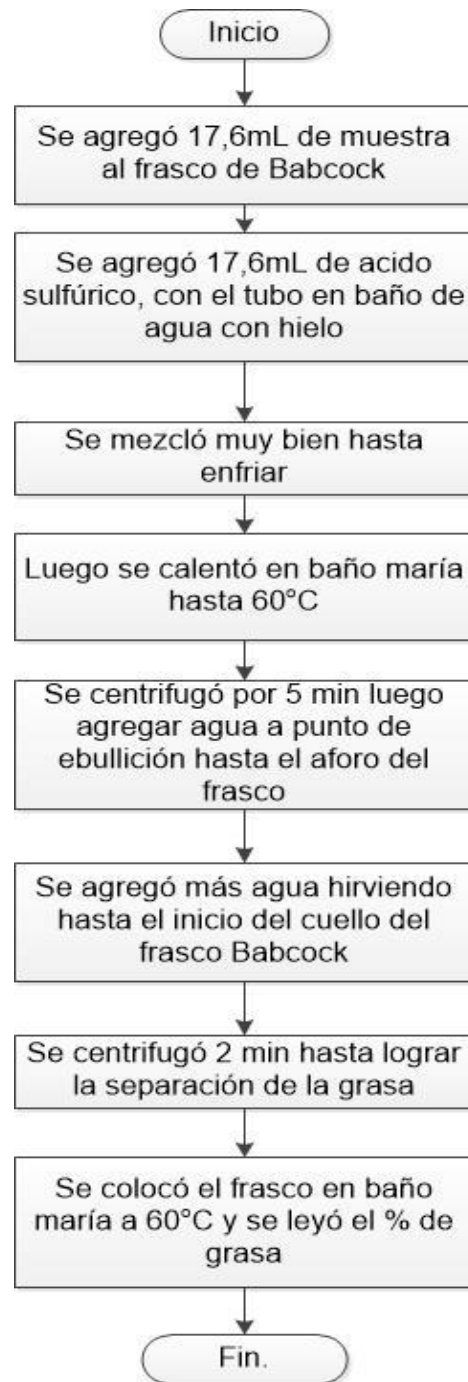
3.5.1.8. Análisis de sólidos totales

Figura 10. Diagrama de flujo análisis sólidos totales



Fuente: elaboración propia. Microsoft Visio 2010.

3.5.1.9. Análisis de grasa



Fuente: elaboración propia. Microsoft Visio 2010.

3.6. Recolección y ordenamiento de la información

Se obtuvieron 3 muestras de helado de yogur de tres distintas marcas. Cada marca se identificó como A, B y C. Luego se midió, proteína por el método de Kjeldahl y grasa total por el método de Babcock, sólidos totales, acidez y pH. También se hizo un análisis de los siguientes patógenos: *E. coli*, *Salmonella* *ssp*, *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes* a cada muestra. Luego se cuantificaron las bacterias iniciadoras *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii subespecie bulgaricus* de cada marca, a continuación, se realizó un promedio para tener el estimado de bacterias ácidos lácticas viables en cada helado de yogur analizado.

Por último se compararon los resultados, con los parámetros establecidos en las normas consultadas.

3.7. Tabulación, ordenamiento y procesamiento de la información

Determinación de las unidades formadoras de colonias por gramo

$$\frac{UFC}{g} = \frac{No.colonias\ por\ placa * \left(\frac{1}{Factor\ de\ dilución}\right)}{volumen\ muestra\ sembrada\ (mL)} \quad [Ecuación\ 5.\ Ref.\ 8]$$

Donde:

UFC/g: Unidades formadoras de colonias por gramo de muestra analizada.

Tabla X. **Determinación de diluciones óptimas para conteo de bacterias ácido-lácticas**

Factor de dilución	Unidades formadoras de colonias por gramo de muestra analizada		
	A	B	C
1,00E+01	MNPC	MNPC	MNPC
1,00E+02	MNPC	MNPC	MNPC
1,00E+03	MNPC	MNPC	MNPC
1,00E+04	MNPC	MNPC	MNPC
1,00E+05	MNPC	MNPC	MNPC
1,00E+06	0,0	9,0E+07	MNPC
1,00E+07	6,0E+08	1,0E+09	1,00E+08
1,00E+08	2,0E+09	0,0	0,0
1,00E+09	1,0E+10	1,0E+10	0,0
1,00E+10	1,0E+10	0,0	0,0

Bacterias ácido-lácticas (*Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*)

Fuente: elaboración propia.

Nota. Estos datos se obtuvieron con el primer tratamiento a las muestras, a partir de ello, se determinaron las diluciones que presentan mejor crecimiento y diferenciación de colonias, para luego realizar los siguientes tratamientos.

Tabla XI. **Colonias de bacterias de yogur, muestra A**

Factor de dilución	Tratamiento			
	1	2	3	4
1,00E+06	MNP	2,60E+10	2,00E+10	0,00E+00
1,00E+07	5,50E+08	2,10E+08	5,00E+09	0,00E+00
1,00E+08	2,00E+09	2,50E+08	2,00E+08	0,00E+00
1,00E+09	1,00E+10	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
1,00E+10	1,00E+10	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00

Fuente: elaboración propia.

Tabla XII. **Colonias de bacterias de yogur, muestra B**

Factor de dilución	Tratamiento			
	1	2	3	4
1,00E+06	9,00E+07	1,00E+10	3,00E+08	0,00E+00
1,00E+07	1,20E+09	2,00E+08	4,00E+07	1,00E+07
1,00E+08	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	1,00E+08
1,00E+09	1,00E+10	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
1,00E+10	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00

Fuente: elaboración propia.

Tabla XIII. **Colonias de bacterias de yogur, muestra C**

Factor de dilución	Tratamiento			
	1	2	3	4
1,00E+06	MNPC	6,00E+09	0,00E+00	8,00E+08
1,00E+07	1,00E+08	2,00E+08	1,00E+08	1,00E+07
1,00E+08	0,00E+00	6,00E+07	9,00E+07	0,00E+00
1,00E+09	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
1,00E+10	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00

Fuente: elaboración propia.

Tabla XIV. **Conteo total de bacterias ácido-lácticas**

Helado de yogur	Conteo total (UFC/g)
A	9,15E+09
B	3,00E+09
C	8,06E+08
Codex Stan 243-2003	10,00 E+06

Fuente: elaboración propisa.

Tabla XV. **Caracterización fisicoquímica de helado de yogur**

Muestra	Proteína	% Grasa	% ST	pH	% Acidez
A	4,97	3	22,49	5,1	1,02
B	2,56	1,5	23,19	4,96	1,05
C	4,05	2	18,8	5,19	0,67

Fuente: Laboratorio de Bromatología, Facultad de Veterinaria, USAC.

3.8. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se calculó el promedio de los tratamientos para obtener concentración de bacterias contadas por el método. El promedio se calculó de la siguiente manera:

$$\bar{x} = \frac{x_1+x_2+\dots+x_n}{n} \quad [\text{Ecuación 6, Ref. 18}]$$

Donde:

\bar{x} = valor promedio de UFC/g en cada muestra.

x_i = valor i

n = número de tratamientos

Ejemplo: Promedio de bacterias ácido-lácticas en helado de yogur marca B, factor de dilución 1/7. Ver tabla XII

$$\overline{x_B} = \frac{(1,2E09 + 2,0E08 + 4,00E07 + 1,00E07)UFC/g}{4}$$
$$\overline{x_B} = 3,65E08 \text{ UFC/g}$$

Nota

Se realizó el mismo cálculo para los promedios de los conteos en los helados de yogur A y C, los datos están tabulados en la tabla XVII.

Además, se calculó la desviación estándar para los parámetros fisicoquímicos de las muestras analizadas mediante la siguiente fórmula.

A partir del promedio, también se encontró la desviación estándar que permite observar la dispersión entre valores para una misma medición respecto al promedio. El cálculo de la desviación estándar se representa por:

$$S = \sqrt{\frac{\sum_i^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad [\text{Ecuación 7, Ref.18}].$$

Donde:

\bar{x} = valor promedio

x_i = valor i

n = número de datos

S = desviación estándar

Ejemplo

Muestra B, factor de dilución 1/7, promedio: 3,65 E08, ver tabla XII

$$S = \sqrt{\frac{\sum_1^4 (1,20E9 - \bar{3,65E9})^2 + (2,0E8 - \bar{3,65E9})^2 + (1,0E7 - \bar{3,65E9})^2 + (4,1E7 - \bar{3,65E9})^2}{4-1}}$$

$$S = 5,6E+08$$

Tabla XVI. **Desviación estándar entre tratamientos**

Factor de dilución	A	B	C
1,00E+06	1,4E+10	4,9E+09	3,3E+09
1,00E+07	2,4E+09	5,6E+08	9,5E+07
1,00E+08	9,3E+08	5,0E+07	4,6E+07
1,00E+09	5,0E+09	5,0E+09	0,0E+00
1,00E+10	5,8E+09	0,0E+00	0,0E+00

Fuente: elaboración propia.

Tabla XVII. **Promedio y desviación estándar de conteo de bacterias *Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus* por factor de dilución y muestra**

Factor de dilución	A	B	C
1,00E+06	2,3E+10	3,5E+09	2,3E+09
1,00E+07	1,9E+09	3,6E+08	1,0E+08
1,00E+08	8,2E+08	1,0E+08	5,0E+07
1,00E+09	1,0E+10	1,0E+10	0,0E+00
1,00E+10	1,0E+10	0,0E+00	0,0E+00
Conteo Final promedio UFC/g	9,15E+09	3,48E+09	8,1E+08
Desviación Estándar	8,87E+09	4,28E+09	9,98E+08

Fuente: elaboración propia.

Tabla XVIII. **Comparación de las características fisicoquímicas del helado versus establecido en las normas consultadas**

Parámetro	Normativa			Resultado A/B/C
Grasa %	Codex	<	15	3,00
				1,5
				2,0
	NTE	>	3	3,00
				1,5
				2,0
Sólidos totales	Codex	<	50	22,49
				23,19
				18,8
	NTE	>	25	22,49
				23,19
				18,8
% Acidez	Codex	>	0.6	1,02
				1,05
				0,67
	NTE	>	0.25	1,02
				1,05
				0,67
Proteína (%)	Codex	>	2.7	4,97
				2,56
				4,05
	NTE	>	1.8	4,97
				2,56
				4,05
<i>Escherichia coli</i> (NMP/g)	NTE	<	3	< 3
<i>Staphylococcus aureus</i> (UFC/g)	NTE	<	10	< 10
<i>Salmonella ssp/25g</i>	NTE		Ausencia	Ausencia
<i>Listeria monocytogenes/25g</i>	NTE		Ausencia	Ausencia

Fuente: elaboración propia.

4. RESULTADOS

4.1. Condiciones aplicadas para el ensayo de adaptación del método de enumeración diferencial para conteo de bacterias ácido-lácticas.

Tabla XIX. Condiciones ambientales y de preparación de la muestra para conteo de bacterias ácido-lácticas.

Parámetro	Rango
Tamaño de muestra	25 g
Dilución madre	1 / 10
Tipo de diluyente	Caldo lactosado
Rango óptimo de dilución	$10^{-06} - 10^{-08}$
Temperatura de muestra máxima para análisis	- 8 ° C - - 0 ° C
Temperatura de incubación	36 ± 1 ° C
Tiempo de incubación	48 horas
Temperatura ambiente y de análisis	22 - 26 ° C
Volumen de siembra	1 mL
Tiempo de absorción	5 min

Fuente: LAFYM Zona 1, Guatemala.

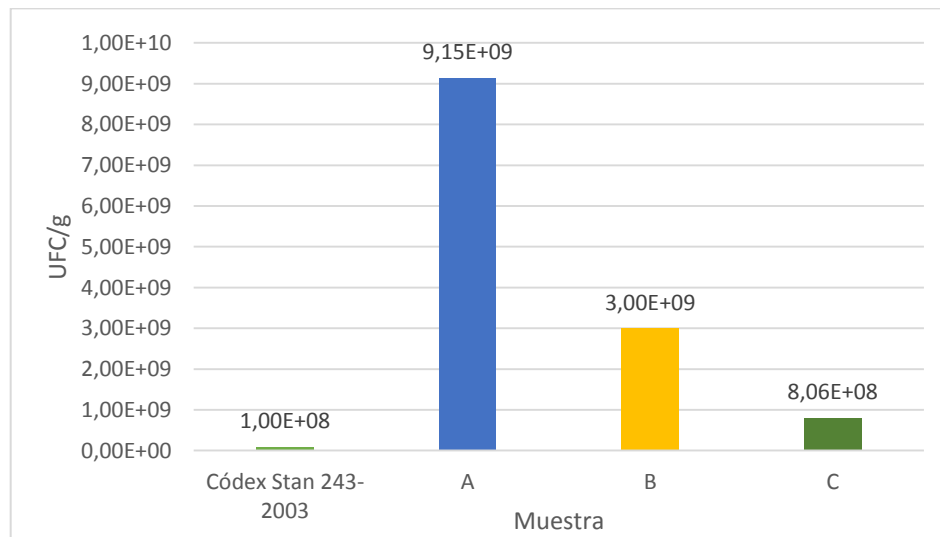
Tabla XX. **Condiciones ambientales y de la muestra, para determinación de propiedades microbiológicas y fisicoquímicas**

Parámetro	Condición	
<i>Staphylococcus aureus</i>	Tamaño de muestra	25 g
	Temperatura de muestra	20 – 25° C
	Dilución	1/10
	Medio de dilución	Caldo lactosado
	Incubación	35° C
<i>Salmonella ssp/25</i>	Muestra	25 g
	Temperatura de Muestra	20 – 25° C
	Medio de dilución	Caldo lactosado
	Tiempo de incubación pre enriquecimiento	18 – 24 horas
	Incubación pre enriquecimiento y enriquecimiento	35° C
	Medio de enriquecimiento	Caldo tetrionato
	Tiempo de incubación, aislamiento	24 horas
<i>Escherichia coli</i>	Tamaño de muestra	25 g
	Temperatura de muestra	Ambiente
	Medio de dilución	Agua peptonada al 0.1%.
	Tiempo de incubación pre enriquecimiento	2 horas a temperatura ambiente
	Incubación y enriquecimiento	32° C
	Tiempo de incubación, aislamiento	18- 24 horas
<i>Listeria monocytogenes</i>	Tamaño de muestra	25 g
	Temperatura de muestra	< 4° C
	Medio de dilución	BLEB conteniendo piruvato de sodio con agentes selectivos.
	Tiempo de incubación pre enriquecimiento	4 horas
	Incubación pre enriquecimiento y enriquecimiento	30° C
	Medio de enriquecimiento	
	Tiempo de incubación, aislamiento continuo al pre enriquecimiento	48 horas
pH, % Acidez, % Proteína, % Grasa	Temperatura de muestreo	Temperatura ambiente
	Temperatura de la muestra	-10° C

Fuente: LAFYM Zona 1, Guatemala.

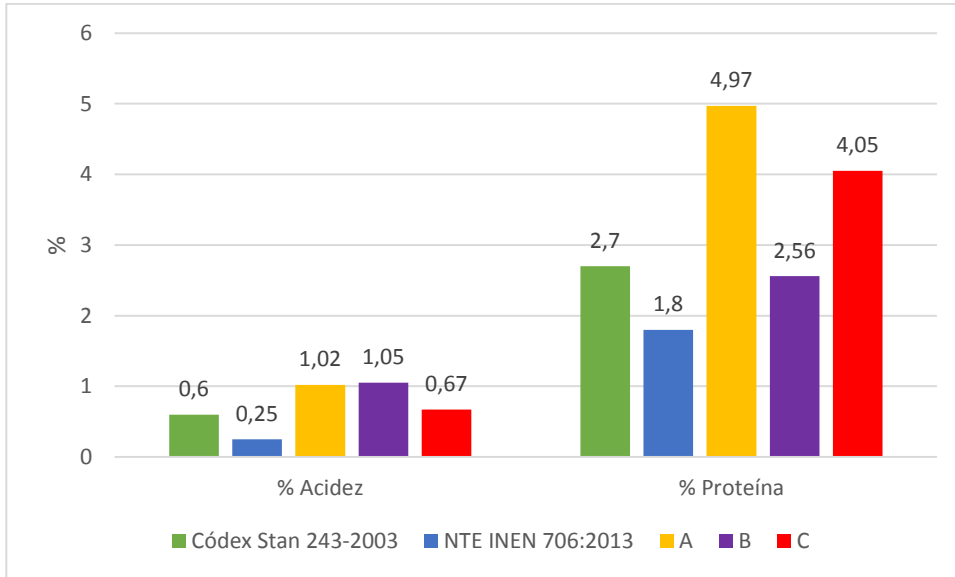
4.2. Bacterias ácido-lácticas totales

Figura 11. **Conteo final promedio de *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus***



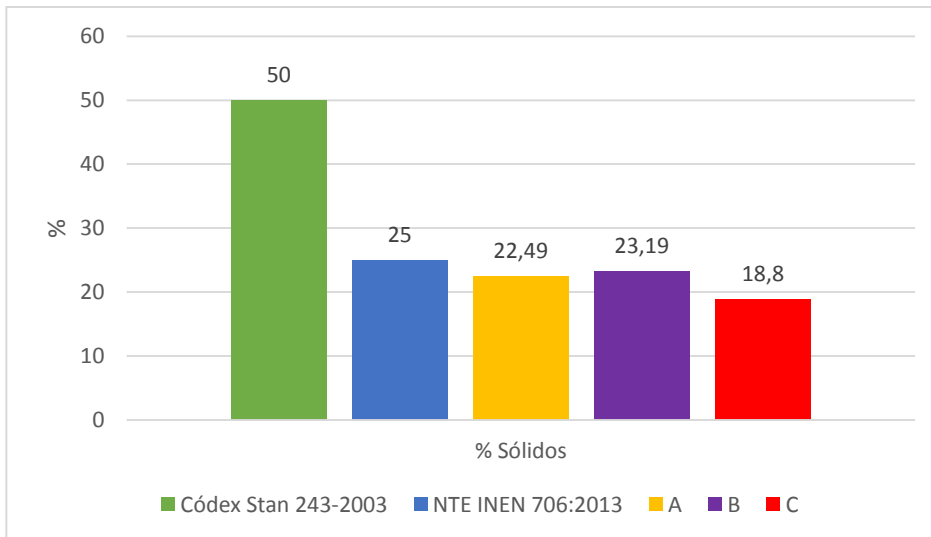
Fuente: diseño metodológico, tabla XIV.

Figura 12. Comparación de resultados de acidez y proteína



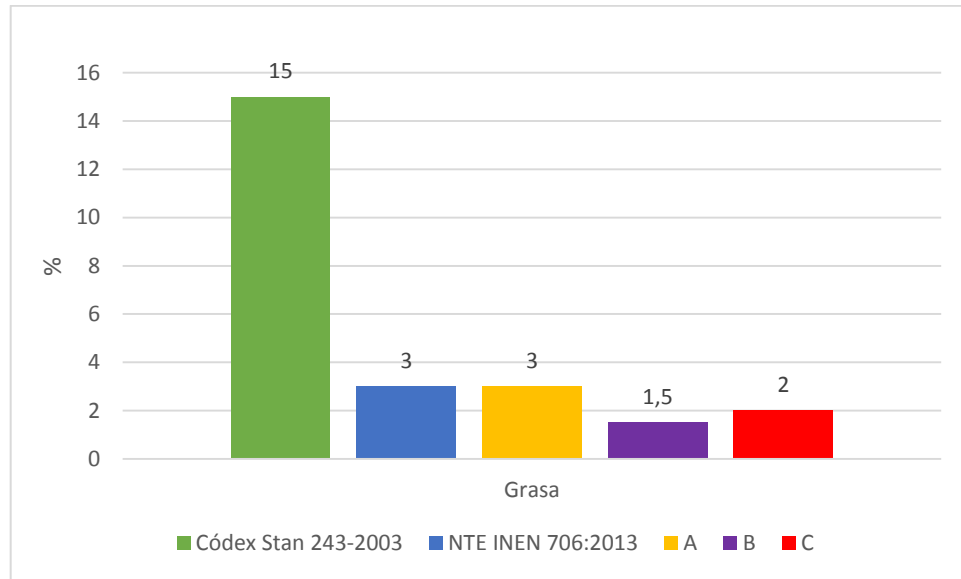
Fuente: diseño metodológico, tabla XVIII.

Figura 13. Comparación de resultados de sólidos totales



Fuente: diseño metodológico, tabla XVIII.

Figura 14. Comparación de resultados de análisis de grasa



Fuente: diseño metodológico, tabla XVIII.

Tabla XXI. Propiedades microbiológicas

Requisito	A	B	C	Nivel de aceptación*
<i>Escherichia coli</i> (NMP/g)	< 3	< 3	< 3	< 3
<i>Staphylococcus aureus</i> (UFC/g)	< 10	< 10	< 10	10
<i>Salmonella ssp/25g</i>	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia
<i>Listeria monocytogenes/25g</i>	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia

Fuente: elaboración propia.

5. INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

Para todos los ensayos, se realizó una dilución de yogur muestra 1:10 con caldo lactosado, 25g muestra en 225 mL de caldo lactosado a temperatura ambiente. La muestra se tomó en refrigeración, luego, para las diluciones se trabajó a 15cm del mechero Bunsen, para tener un área estéril de aproximadamente 30cm. Las condiciones de aplicación son prácticas y fáciles de alcanzar en el laboratorio de alimentos.

Para determinar la carga de bacterias ácido-lácticas, se prepararon diluciones de 1^{-01} hasta 10^{-10} , se sembró 1ml en cada placa de agar Lee, se dejó absorber y luego se incubó a 36 °C por 48 horas, a partir de estos primeros resultados. Se observó que las diluciones 10^{-6} a la 10^{-10} presentaron mejor crecimiento diferencial y cuantificable, a partir de esto se realizaron 4 tratamientos para cada dilución óptima en cada muestra analizada A, B y C, se promediaron los resultados para obtener un conteo medio en cada muestra.

Según la figura 12, el conteo final de bacterias ácido-lácticas, las 3 marcas de yogur contienen y sobrepasan la concentración mínima de 100 000 000 microorganismos vivos activos establecidos por el CODEX STAN 243:2003. La muestra A presenta un crecimiento 91,5 veces más grande que lo establecido en la norma. La muestra B es la siguiente con mayor cantidad de bacterias ácido-lácticas totales y la muestra C es la que más se parece a lo establecido en la norma. Todas las muestras contienen mayor concentración a la cantidad mínima de cultivos vivos y activos, *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus* por lo que son aceptados como helado de yogur.

La proteína juega un papel muy importante, siendo un derivado lácteo, el helado de yogur debe cumplir con una cantidad mínima de proteína según el CODEX, el % mínimo es de 2,7 % y 1,8 para la Norma Técnica Ecuatoriana. Las muestras se analizaron por el método de Kjeldahl. Según la figura 12, la muestra A y C cumplen para ambas normativas, mientras que la muestra B cumple únicamente con la NTE. Como helado de yogur, en el CODEX solo son aceptables A y C.

El % de acidez un indicador de la concentración de ácido láctico presente en el producto además es un factor importante ya que impide el crecimiento de otras bacterias si la acidez es alta. Esta propiedad se determinó por valoración con hidróxido de sodio 0,1N e indicador de fenolftaleína, las muestras analizadas cumplieron con el parámetro de acidez mínimo. Esto confirma la alta concentración de bacterias ácido-lácticas cuantificadas en cada muestra.

Otra propiedad importante es el % de sólidos totales, a los cuales se atribuye la textura y cuerpo del producto final, el contenido mínimo es diferente en cada normativa consultada, el valor está entre 50 % y 25 %, se cuantificó por mufla y desecador, sin embargo, los resultados de las muestras están por debajo del mínimo requerido de 25 % para NTE. Según el marco teórico el % aceptable se encuentra por encima del 18 %, esto significa que yogur es muy ligero en textura.

El % de grasa requerido en la normativa se encuentra entre 3 y 15 %. La muestra A dio como resultado exactamente 3 %, cabe destacar que es un método visual, por lo que la escala se observa a groso modo. El % de grasa influye en la textura del producto, la muestra B, se percibía más líquida y liviana en comparación a las muestras A y C cuya textura era más cremosa.

El % de grasa obtenido en la muestra B y C, no cumple con la normativa ya que los valores son de 1,5 y 2 % respectivamente. Esto puede deberse a que sea yogur light. Ya que las normativas son para yogur de leche entera.

Para la determinación de microorganismo patógenos, se analizó a partir de la dilución preparada para el conteo de bacterias ácido-lácticas de yogur, se analizó *Staphylococcus aureus*, el cual mostró crecimiento de algunas colonias negras con fondo blanco sobre agar Baird-Parker. Se obtuvieron resultados similares para las 3 distintas muestras, se realizó la prueba de catalasa y coagulasa positiva, luego la prueba de manitol sal y el agar viró de rosa hacia amarillo, el conteo final fue menor a 10 UFC/g en todas las muestras. Esto implica que fueron fabricados bajo protocolos adecuados de limpieza.

El análisis de *E. coli*, se realizó por la técnica de Numero Más Probable (NNMP), se observó producción de gas en las campanas de Durham, en las diluciones 1×10^3 para las muestras A y B, y en la dilución 1×10^2 para la muestra C, pero al realizar la prueba confirmativa que fue la siembra en caldo BVB y Caldo *E. coli* no se observó presencia de gas, para las 3 muestras, el conteo fue menor a 3, el cual es un indicador más de inocuidad de estas muestras.

Salmonella ssp/25g, es otra propiedad importante. Esta bacteria puede soportar hasta la congelación, pero muere por calentamiento a más de 70° C. Su presencia puede implicar salmonelosis, el resultado fue negativo en cada muestra, dado que no se observó ningún crecimiento en los medios de Rambach, en este punto, todas las muestras indican que son alimentos inocuos.

Por último, se determinó ausencia de *Listeria monocytogenes*, la cual también es un indicador de limpieza, fue adecuada al momento de producir este

alimento. Microbiológicamente, las muestras cumplieron con lo establecido en la NTE INEN 706:2013. Por lo tanto, los alimentos son inocuos para el consumidor.

CONCLUSIONES

1. Para la cuantificación de bacterias ácido lácticas *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus*, fueron necesarios 25g de muestra, 225mL de caldo lactosado, incubación a $36 \pm 1^\circ$ C durante 48 horas y condiciones de muestreo a temperatura de congelación -8° C. Con un rango de dilución óptimo de $10^{-06} - 10^{-08}$ y 1mL de cada dilución inoculado en placa de agar Lee.
2. La caracterización fisicoquímica indica que únicamente la muestra A es aceptada como helado de yogur. Los resultados de la muestra B y C estuvieron por debajo de lo establecido en proteína, sólidos y grasas, por lo que no cumplen como helado de yogur.
3. La caracterización microbiológica determinó que todas las muestras cumplen con los requerimientos de inocuidad alimentaria en cuanto a *Staphylococcus aureus*, *E. coli*, *Salmonella* y *Listeria monocytogenes*.
4. Basados en los resultados, los análisis realizados a las muestras A, B y C, incluyendo el conteo total de *Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*, cumplen con los requisitos establecidos en el Codex Stan 243-2003 y la NTE INEN 706-2013 tanto fisicoquímicos como microbiológicos. Excepto el % de sólidos para el cual las muestra A, B y C cumplen para CODEX pero no para la NTE INEN 706-2013, ya que su valor es menor de 25 %.

RECOMENDACIONES

1. Realizar una comparación del conteo de bacterias ácido-lácticas totales por conteo en placa de agar Lee y otros medios.
2. Desarrollar el mismo estudio con la variante de comparar las etiquetas de estos productos y de esta forma determinar si se ofrece lo indicado en la etiqueta.

BIBLIOGRAFÍA

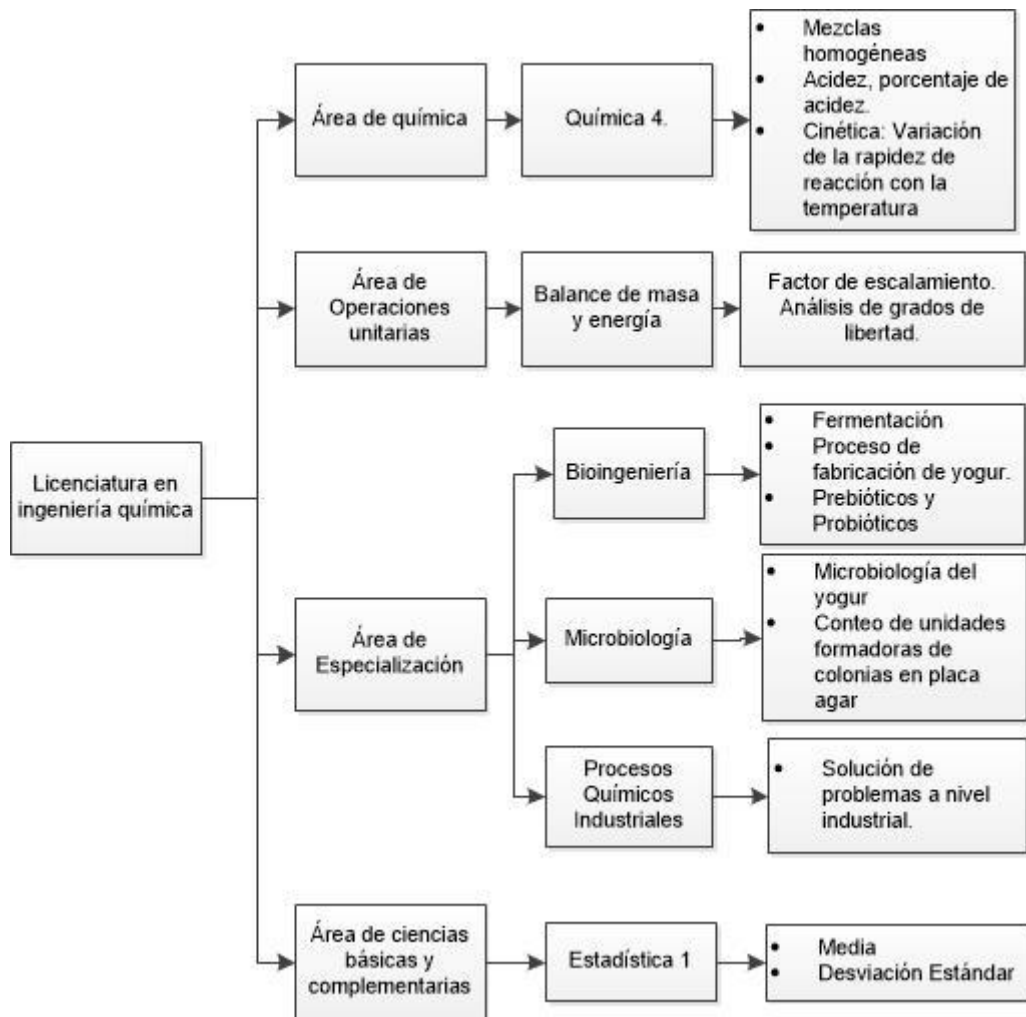
1. ARCHILA, Margarita. Metodología de análisis microbiológico para el yogurt que se comercializa en Guatemala. Aporte parcial para la elaboración de una norma oficial guatemalteca para el yogurt. Trabajo de graduación de licenciatura en Química Farmacéutica. Facultad de Ciencias Química y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala, 2009. 14-20, 26 p.
2. AOAC. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 1980. Capítulo 16
3. ATLAS, Ronald M. *The handbook of microbiological media*. Cuarta Edición. Washington DC: CRC Press, 2010. 941 p.
4. BOE. Norma para la calidad del yogur o yoghurt. España. 2014. 2 p.
5. CHARLEY, Helen. Tecnología de alimentos. Procesos Químicos y Físicos en la preparación de alimentos. LIMUSA, 2000. 405 p.
6. COGUANOR. NGO 34 041. Leche de vaca pasteurizada, fresca, ultra alta temperatura (UHT) y esterilizada, homogeneizada, especificaciones. 2ª Revisión. Guatemala. 2004. 4-5 p.
7. Common wealth of Pennsylvania. Frozen Dessert Standars. Pensilvania. 1996. 23 p

8. DAVIS, J.G., "The Microbiology of Yoghurt", Lactic Acid Bacteria in Beverages and Food. Lóndres: Academic Press, 1975. 245-263 p.
9. HiMediaLab. Hoja técnica Agar Lee. Disponible en: <http://himedialabs.com/TD/M602.pdf>
10. ICONTEC; Norma Técnica colombiana NTC 1239. Segunda edición, Colombia. 2002, 5-6 p
11. INEN, Norma técnica Ecuatoriana 706:2013. Helados, requisitos, Segunda revisión. Primera edición. Quito Ecuador. 2013. 4-5 p.
12. *Live and Active Culture (LAC) Yogurt FAQ's*. Disponible en: <http://www.aboutyogurt.com/index.asp?bid=28>. Consultado en marzo 2015.
13. ROSALES, María Marta. *Determinación del contenido de grasa en yogurt entero y descremado de marcas comerciales expendidas en la ciudad capital*. Trabajo de graduación de Licenciatura en Química Farmacéutica. Faculta de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala. 2009. 24-26 p.
14. RTCA. Criterios Microbiológicos para la Inocuidad de Alimentos. 2009. 25 p
15. TAMIME, A.Y. y ROBINSON, R.K Yogur: Ciencia y tecnología/tr. María de la Concepción Díaz de Villegas Soláns, Alvaro Rodríguez Sánchez Arévalo. Zaragoza: Acribia, 1991. 233-237, 333-335 p.

16. UNAM, Facultad de Química. Fundamentos y técnicas de análisis de alimentos. Departamento de Alimentos y Biotecnología. México. Universidad Autónoma de México, 2008. 29-42 p.
17. *University of Guelph. Food Science. Overrun Calculation.* Disponible en: <https://www.uoguelph.ca/foodscience/book-page/figuring-plant-overrun-volume-particulates>. Consultado el 25/04/2015
18. WALPOLE, Ronad E; et. al. *Probabilidad y estadística para ingeniería y ciencias.* 8a ed. México: Pearson Educación, 2007. 720 p.

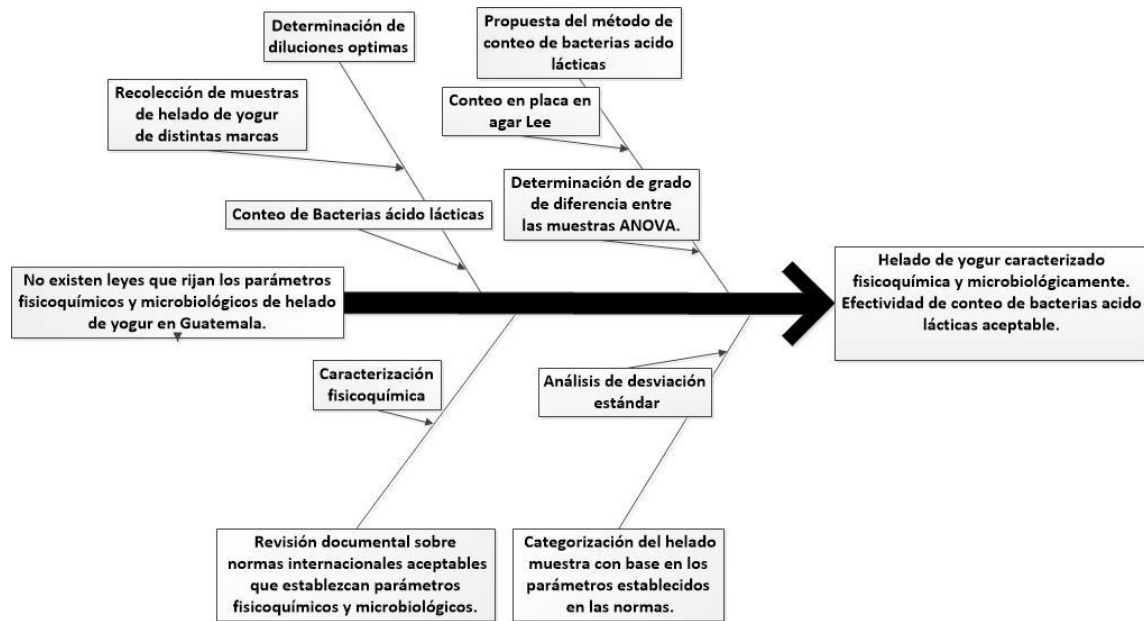
APÉNDICES

Apéndice 1. **Tabla de requisitos académicos**



Fuente: elaboración propia. Microsoft Visio 2010.

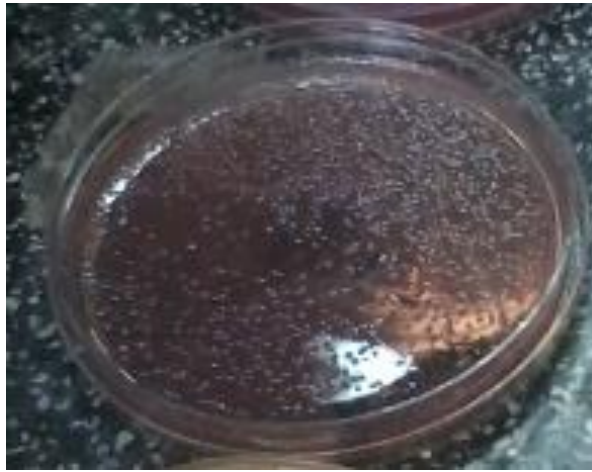
Apéndice 2. Diagrama de Ishikawa



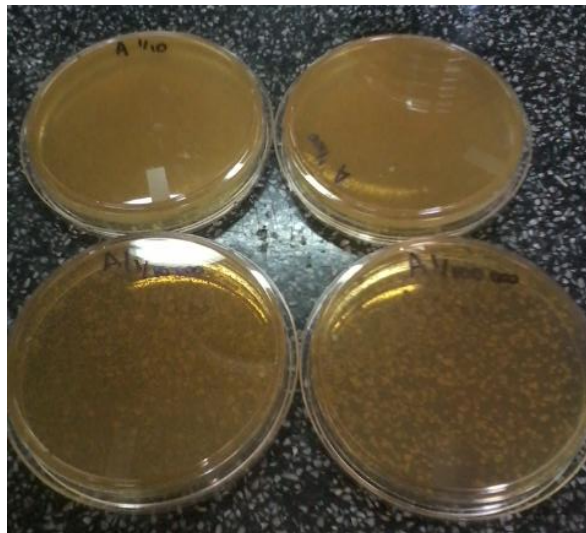
Fuente: elaboración propia. Microsoft Visio 2010.

Apendice 3. **Agar Lee inoculado**

1. Medio con crecimiento mixto *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus*



2. Agar con crecimiento predominante de *Streptococcus thermophilus*



Continuación del apéndice 3.

3. Agar con crecimiento predominante de *Lactobacillus bulgaricus*



4. Placas inoculadas en frasco de incubación



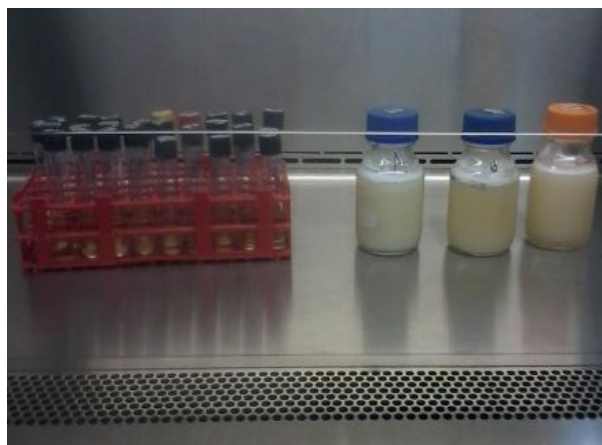
Fuente: elaboración propia.

Apéndice 4. **Análisis fisicoquímico y microbiológico**

1. Caldo enriquecimiento para *listeria*



2. Análisis de *salmonella*



Continuación del apéndice 4.



3. Determinación de acidez



Fuente: elaboración propia.