

2 300627
Daj



UNIVERSIDAD LA SALLE

ESCUELA DE QUIMICA
INCORPORADA A LA U.N.A.M.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

"REACTIVACION DEL SISTEMA LACTOPEROXIDASA DURANTE
EL ALMACENAMIENTO DE LA LECHE CRUDA Y SU
EFECTO EN EL SABOR DEL YOGURT".

TESIS PROFESIONAL
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A

Rosa Elena Aguilar Muslera



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

CONTENIDO

	Pag.
Índice de cuadros.....	iii
Índice de figuras.....	iv
Resumen.....	1
Introducción.....	2
Objetivos.....	4
Capítulo I: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	5
1. LECHE	
1.1. Definición.....	5
1.2. Composición.....	5
1.3. Microflora natural de la leche.....	6
1.3.1. Microorganismos psicrotrofos G(+), y G(-).....	7
1.3.2. Efecto de la presencia de psicrotrofos en la calidad de los productos lácteos.....	9
1.3.3. Enzimas producidas por microorganismos psicrotrofos.....	11
1.4. Sistemas antimicrobianos naturales de la leche.....	13
2. SISTEMA LACTOPEROXIDASA	
2.1. Antecedentes.....	14
2.2. Componentes del sistema Lactoperoxidasa.....	14
2.2.1. Lactoperoxidasa.....	14
2.2.2. Tiocianato.....	15
2.2.3. Peróxido de hidrógeno.....	17
2.3. Activación del sistema.....	18
2.4. Interferencias.....	19
2.4.1. Fenóidos.....	19
2.4.2. Cobalinas.....	19
2.4.3. Agentes reductores.....	20
2.5. Mecanismo de acción del sistema LP.....	20
2.5.1. Espectro antibacteriano del sistema LP.....	23
2.6. Conservación de leche cruda mediante el sistema LP.....	25
2.7. Aspectos sanitarios.....	26
3. YOGURT.	
3.1. Generalidades.....	28
3.2. Microbiología de los cultivos iniciadores.....	32
3.3. Aspectos de calidad.....	34
Capítulo II: MATERIALES Y MÉTODOS.....	36
1. Obtención, recolección y transporte de la muestra.....	36
2. Corridos experimentales.....	36
3. Activación del sistema.....	36
3.1. Esterilización del contenido inicial de iones SCN^-	36
3.2. Incremento y adición de $NaSCN$ y H_2O_2	38
3.3. Reactivación.....	39

	Pag.
4. Almacenamiento de leche tratada y testigo.....	38
5. Resultados.....	40
5.1. Pruebas microbiológicas.....	40
5.1.1. Cuenta total viable.....	40
5.1.2. Cuenta de bacterias psicrotroficas.....	40
5.1.3. Cuenta de coliformes.....	40
5.2. Pruebas fisicoquimicas.....	40
5.2.1. Determinación de tiocianato.....	40
5.2.2. Determinación de sólidos totales.....	41
5.2.3. Determinación de acidez titulable.....	41
5.2.4. Actividad proteolítica.....	41
5.2.5. Actividad lipolítica.....	41
6. Pasteurización.....	41
7. Elaboración de yogurt.....	41
7.1. Cultivo iniciador.....	41
7.2. Preparación.....	42
8. Almacenamiento.....	43
9. Evaluación sensorial.....	43
9.1. Diseño experimental.....	43
9.2. Juicio.....	43
9.3. Método sensorial.....	45
Capítulo III. Resultados y discusión.....	48
1. Efecto del almacenamiento de leche cruda.....	48
1.1. Crecimiento de microorganismos.....	48
1.1.1. Mesófilicos aeróbicos.....	48
1.1.2. Psicrotroficos.....	49
1.1.3. Coliformes.....	53
1.2. Cambios fisicoquimicos.....	55
1.2.1. Acidez.....	55
1.3. Cambios enzimáticos.....	59
1.3.1. Proteólisis y lipólisis.....	59
2. Efecto en la producción y almacenamiento de yogurt.....	63
2.1. Desarrollo de acidez.....	63
3. Evaluación sensorial.....	69
3.1. Sabor ácido.....	71
3.2. Sabor amargo.....	74
3.3. Sabor rancio.....	74
3.4. Sabor oxidado.....	79
Capítulo IV. Conclusiones.....	91
Capítulo V. Bibliografía Revisada.....	93
Apéndice.....	98

iii
INDICE DE CUADROS

	pág.
Cuadro 1. Composición principal de la leche de vaca...	6
Cuadro 2. Concentración de tiocianato en fluidos leudados.....	16
Cuadro 3. Composición del yogurt.....	31
Cuadro 4. Diagrama del diseño experimental.....	39
Cuadro 5. Corridos experimentales para leche cruda...	37
Cuadro 6. Prueba de homogeneidad de varianzas por atributo sensorial en yogurt almacenado bajo refrigeración.....	70
Cuadro 7. Cuadro de ANDEVA para la evaluación sensorial del sabor ácido en yogurt de leche almacenada 4 días.....	72
Cuadro 8. Cuadro de ANDEVA para la evaluación sensorial del sabor ácido en yogurt de leche almacenada 8 días.....	73
Cuadro 9. Desarrollo de sabor ácido durante el almacenamiento del yogurt de leche almacenadas por 4 y 8 días.....	75
Cuadro 10. Valores de H para la evaluación sensorial de sabores amargos en yogurt de leche almacenada 4 y 8 días.....	77
Cuadro 11. Valores de H para la evaluación sensorial de sabores rancios en yogurt de leche almacenada 4 y 8 días.....	78
Cuadro 12. Desarrollo de sabor rancio durante el almacenamiento de yogurt de leche almacenada por 4 y 8 días.....	81
Cuadro 13. Cuadro de ANDEVA para la evaluación sensorial del sabor oxidado en yogurt de leche almacenada 4 días.....	82
Cuadro 14. Reglas y desviación estándar para los resultados de la evaluación sensorial del sabor del yogurt elaborado a partir de leche almacenada 4 días.....	83
Cuadro 15. Reglas y desviación estándar para los resultados de la evaluación sensorial del sabor del yogurt elaborado a partir de leche almacenada 8 días.....	84

34
INDICE DE FIGURAS.

	Pag.
Figura 1. Cuenta total de leches almacenadas durante 4 y 6 días a 4°C.....	50
Figura 2. Cuenta de psicrotróficos en leches almacenadas durante 4 y 6 días.....	51
Figura 3. Cuenta de coliformes en leches almacenadas durante 4 y 6 días.....	54
Figura 4. Incremento de acides en leches almacenadas durante 4 y 6 días.....	57
Figura 5. Proteólisis en leches almacenadas a 4°C durante 4 y 6 días.....	60
Figura 6. Lipólisis de leches almacenadas a 4°C durante 4 y 6 días.....	61
Figura 7. Desarrollo de acides en leches almacenadas durante 4 y 6 días durante el proceso de fermentación en la producción de yogurt.....	64
Figura 8. Incremento de acides durante el almacenamiento del yogurt a 4°C, elaborado con leches almacenadas durante 4 y 6 días.	68
Figura 9. Perfil de sabor para yogurt de leche almacenada por 4 días al día cero. (Periodo I).....	95
Figura 10. Perfil de sabor para yogurt de leche almacenada por 4 días al quinto día. (Periodo II).....	96
Figura 11. Perfil de sabor para yogurt de leche almacenada por 4 días al séptimo día. (Periodo III).....	97
Figura 12. Perfil de sabor para yogurt de leche almacenada por 6 días al día cero. (Periodo I).....	99
Figura 13. Perfil de sabor para yogurt de leche almacenada por 6 días al tercer día. (Periodo II).....	99
Figura 14. Perfil de sabor para yogurt de leche almacenada por 6 días al sexto día. (Periodo III).....	99

RESUMEN

El almacenamiento de la leche por períodos largos a temperaturas de refrigeración, causa problemas de calidad en la industria láctea, debido al crecimiento y actividad metabólica de microorganismos psicrotróficos presentes naturalmente en la leche. Si bien estos microorganismos son destruidos por los tratamientos térmicos, producen enzimas termoestables, las cuales deterioran a la leche pasteurizada impartiéndole sabores desagradables.

Estudios realizados utilizando el sistema LP han demostrado su eficacia para retardar el deterioro de la leche, encontrándose que el sistema es fuertemente bactericida para especies de *Pseudomonas* y otras bacterias psicrotróficas con actividad proteolítica y lipolítica, presentes en la flora natural de la leche.

Esta investigación forma parte del proyecto *Lactoperoxidasa*, propuesto por el N.C. Hugo S. Garcia Salido y efectuado en el Instituto Tecnológico de Veracruz, donde se han realizado estudios activando el sistema en leche cruda, almacenada a temperatura ambiente y de refrigeración, así como productos lácteos tales como queso y crema. Considerando las experiencias anteriores este trabajo tiene como objetivos observar la acción de la reactivación del sistema LP sobre microorganismos psicrotróficos y sus actividades enzimáticas durante el almacenamiento de la leche cruda, así como evaluar el efecto de utilizar ésta en la elaboración del yogurt, observando la presencia de sabores extraños.

INTRODUCCIÓN

La leche es un buen medio de cultivo para numerosos gérmenes debido a su composición química y a su pH de aproximadamente 6.5. Esto permite el desarrollo de bacterias así como de levaduras y mohos. A causa de esto, constituye un producto muy perecedero, que a su vez puede ser el vehículo de organismos patógenos para el hombre.

La leche cruda contiene una gran variedad de microorganismos, que están en función del estado sanitario de los animales de donde proviene, así como de los cuidados técnicos e higiénicos durante el ordeño, limpieza de los recipientes, etc.

Hoy en día, la refrigeración es un método casi generalizado para el almacenamiento de leche cruda, ya que elimina los problemas tradicionales de contaminación, reduce el crecimiento bacteriano y otras alteraciones por reacciones químicas. Sin embargo, la conservación de leche cruda a temperaturas inferiores a 10 °C y más concretamente las comprendidas entre 4 °C y 5 °C, permiten el desarrollo de bacterias psicrófilas. Estas incluyen especies lipolíticas y proteolíticas, productoras de enzimas termoestables las cuales atacan a los lípidos y proteínas contenidas en la leche, causando efectos indeseables sobre la calidad química, microbiológica y sensorial, tales como alteraciones en el sabor, problemas de estabilidad y pérdidas en la producción de derivados (9, 11, 20, 23).

En productos fermentados como queso, yogurt y buttermilk que poseen sabores muy definidos, la presencia de bacterias psicrófilas puede interferir en el tiempo de fermentación para alcanzar la acidez requerida para cada producto, así como inducir ligeros cambios en el sabor de los mismos (7).

OBJETIVOS

1. Evaluar el efecto de las reactivaciones periódicas del sistema LP sobre el crecimiento de la flora psicrotrófica natural de la leche cruda y su producción de enzimas deteriorativas (lipasa y proteasa) bajo condiciones de almacenamiento prolongado en refrigeración.

2. Establecer el efecto de la actividad proteolipolítica y la acidez de la leche LP-activa sobre la fermentación láctica y la producción de sabores extraños del yogurt derivado.

CAPÍTULO I.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.

1.- LECHE.

1.1. Definición.

La leche es el producto de secreción de la glándula mamaria de las hembras de los mamíferos, destinada a la alimentación de las crías. (54)

Desde el punto de vista físico, la leche constituye un sistema complejo.

Cuantitativamente el agua es el componente más importante, siendo el medio de:

- sustancias en solución verdadera, de bajo peso molecular, ionizables y no ionizables.
- sustancias en estado de dispersión coloidal.
- sustancias en estado de emulsión. (54)

1.2. Composición.

La composición de la leche varía en función de la alimentación, período de lactancia, y raza del animal, así como de factores ambientales tales como el clima y época del año.

De manera general, la leche está compuesta por agua, azúcares, proteínas, ácidos, sales y minerales, además de otras sustancias presentes en menor concentración: enzimas, anticuerpos, hormonas, vitaminas.

La leche contiene alrededor de 87% de agua. Dispersa en ella se encuentra la grasa en forma de glóbulos, compuesta fundamentalmente de triglicéridos, además de fosfolípidos.

esteroles y vitaminas liposolubles A,D,E y K. (47).

Las caseínas representan el 80% de las proteínas de la leche de vaca; el resto está constituido por beta-lactoglobulina, alfa-lactoalbúmina y pequeñas cantidades de un gran número de diversas proteínas. (7)

En la leche, los carbohidratos están representados, principalmente por la lactosa, que se sintetiza en la glándula mamaria. Es un disacárido de sabor relativamente poco azucarado, poco soluble, que posee un grupo reductor. La lactosa tiene un papel importante en los productos lácteos, ya que es el sustrato de fermentación para las bacterias lácticas que la hidrolizan a glucosa y galactosa, transfiriendo posteriormente esas hecesas en ácido láctico. (7)

Las sales minerales constituyen el 1% de la composición de la leche de vaca.

Suelen estar presentes como cloruros, fosfatos y citratos de calcio, magnesio, sodio y potasio, y pueden encontrarse tanto en estado coloidal como en solución. La presencia de estas sales cumple un papel fundamental en la conservación de la coesibilidad de la leche, ya que su presión osmótica debe mantenerse en estrecho equilibrio con la de la sangre.

1.3. Microflora Natural de la Leche.

La flora microbiana de la leche cruda consiste en los organismos que pueden estar presentes en la ubre y piel de la vaca o en los utensilios y líneas lácteas. Esta, se encuentra determinada por

la temperatura a la cual ha sido almacenada y el tiempo transcurrido después de la colección. Cuando la leche es enfriada y almacenada a temperatura menor de 4° C. la baja temperatura prevendrá la multiplicación bacteriana por un mínimo de 24 horas y la microflora será similar a la inicial.

La cuenta estándar puede tener un rango de menos de 1,000 ufc/ml donde la contaminación durante la producción es mínima, hasta más de 1×10^8 ufc/ml de leche. Cuentas totales superiores de 100,000 ufc/ml, son evidencias de serias fallas en la higiene de la producción, mientras que cuentas consistentemente menores de 10,000 ufc/ml reflejan buenas prácticas higiénicas.

Bajo apropiada manipulación y condiciones de almacenamiento, la flora predominante es Gram (G)⁺. Aun cuando levaduras, mohos y bacterias Gram (G)⁻ pueden ser encontradas junto con bacterias ácido-lácticas, la mayoría o todas de estos tipos son más sensibles al calor que los (G)⁺ y son más fácilmente destruidos durante la pasteurización. (13,24)

1-3.1. Microorganismos psicrófilos G (+) y G (-).

El término psicrófilo se refiere a los microorganismos capaces de crecer a temperaturas de 7° C o inferiores, sin tener en cuenta la temperatura óptima de crecimiento. Este género incluye bacterias, levaduras y mohos. Pueden ser bacilos largos o cortos, cocos o vibrios; bacterias G (+) o G (-); formadoras de esporas o no formadoras de esporas; aerobios, aerobios facultativos o anaerobios. (13)

Investigaciones anteriores han reportado que los microorganismos que defien la leche a temperaturas ligeramente superiores a las de congelación son predominantemente *B (-)*, no formadores de esporas y bacilos catalasa positivos. El género *Pseudomonas* es el más encontrado (11), de hecho forma el 10% de la flora *B (-)*. *Pa. fluorescens* es la especie predominante.

Otras incluyen *Pa. pótida*, *Pa. fragi* y *Pa. aeruginosa*, siendo también de importancia los géneros *Alcaligenes*, *Achromobacter*, *Aeromonas* y *Flavobacterium* (13).

La contaminación con estos microorganismos se debe principalmente al equipo y al suministro de agua de la planta procesadora. Son de importancia debido a su rápida multiplicación a temperaturas de refrigeración, así como por su capacidad de producir enzimas proteolíticas y lipolíticas que soportan los tratamientos térmicos y que pueden deteriorar los productos derivados de la leche (12,13).

Especies pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*, tales como *Enterobacter* y *Klebsiella*, son frecuentemente aisladas de leche cruda refrigerada. Estas especies, colectivamente llamadas coliformes, son bacterias *B (-)*, anaerobias facultativas.

Bacterias *B (+)* han sido aisladas de la leche cruda; sin embargo, solo se presentan en pequeñas cantidades. Así mismo, su crecimiento es más lento en comparación con algunos bacilos *B (-)*. Sin embargo, la presencia de bacterias *B (+)* ha tomado mayor importancia en leche pasteurizada y productos derivados, debido a que algunas de ellas pueden formar esporas. Esto ocasiona que

pueden sobrevivir a los tratamientos térmicos efectuados a los productos y que hayan sido ligados con su posible deterioro.

La importancia de estos microorganismos en leche pasteurizada y en productos derivados, depende de algunas variables como el tipo y número de células, así como de la temperatura de almacenamiento (12).

1.3.3 Efecto de la presencia de psicrótrofos en el calidad de los productos lácteos.

Los microorganismos psicrótrofos, son importantes en la leche porque causan descomposición por alteraciones bioquímicas de los constituyentes de la leche.

Fermentación de glucosa y otros azúcares con liberación de ácido D ácido y que ha sido observada por el crecimiento de algunos microorganismos psicrótrofos. Son capaces de descomponer urea, reducir nitrato a nitrito o hidrolizar proteínas y lípidos a temperaturas de 0° C e inferiores. En general, las bacterias psicrótrofos presentan todas las actividades bioquímicas evidentes a altas temperaturas, pero estas reacciones ocurren en rangos de temperaturas tan bajas como 0° C.

El mantenimiento de la calidad de la leche y productos lácteos cuando son conservados a temperaturas inferiores a 7° C, tiene como principal limitante el desarrollo de bacterias psicrótrofos. Ligeros cambios bioquímicos ocurren en la primera fase de crecimiento, teniendo como resultado una disminución en la frescura o un gusto a "pasado". Conforme al almacenamiento

se prolonga, comienzan a aparecer una variedad de defectos. El desarrollo de estos sabores son, igualmente, resultado de la actividad proteolítica y/o lipolítica de los microorganismos psicrotróficos (16). En refrigeración, el deterioro causado por bacterias psicrotróficas normalmente comienza a ser evidente a partir del tercer o cuarto día de almacenamiento. A temperatura constante, la rapidez en que el deterioro sucede depende principalmente de la cuenta inicial de microorganismos presentes, la velocidad de crecimiento a dicha temperatura y la capacidad para producir defectos en la calidad sensorial (21).

Los efectos no ocurren solamente en la leche cruda. Numerosos estudios se han hecho sobre el efecto de estos microorganismos sobre productos derivados de la leche (52, 53). Cassin y Harsh encontraron algunas diferencias al producir queso tipo Cheddar con leches con y sin crecimiento de psicrotróficos: el porcentaje de nitrógeno no proteico y nitrógeno no caseínico aumentó sobre la leche control cuando la leche fue mantenida a 4.4 C por 7 días; el tiempo de elaboración fue inferior y un corte más fino resultó cuando el queso fue elaborado con la leche cultivada con bacterias psicrotróficas en contraste con la leche control (9).

El crecimiento excesivo de psicrotróficos en crema cruda, da como resultado defectos en el sabor tanto de la crema como de la mantecquilla elaborada con ésta. Se ha observado también que las bacterias psicrotróficas originan una contaminación posterior al tratamiento térmico al almacenar en refrigeración sobre crema pasteurizada. Sin embargo los datos sobre ésta son escasos (36).

1.3.3. Enzimas producidas por microorganismos psicrotróficos.

Las bacterias psicrotróficas elaboran enzimas extracelulares durante su desarrollo en la leche. La actividad de estas enzimas se sabe que prevalece después de la pasteurización e incluso de tratamientos UHT. Como resultado, sabores indeseables se presentan en la leche y productos derivados.

Las proteínas y lípidos, principalmente triacilglicéridos, son inicialmente degradados por hidrolasas extracelulares. Cuando esto ocurre, el sabor, cuerpo, textura y rendimiento en la elaboración de queso pueden ser afectados en distinta forma dependiendo del producto.

En el caso de los carbohidratos, principalmente la lactosa, ocurre una degradación intracelular, mediante una serie de reacciones, que producen como resultado ácido pirúvico y ácido láctico (32).

- GLUCOSIDASAS -

Las glucosidasas producidas por bacterias psicrotróficas, son de importancia potencial en la vida media y procesos de maduración de los productos lácteos.

Estas enzimas catalizan la hidrólisis de enlaces glicosídicos simples, oligosacáridos y polisacáridos, así como también, atacan en carbohidratos complejos tales como las glicoproteínas de la membrana del glóbulo de grasa de la leche y de la caseína.

Cuando las enzimas glucosidasas liberan, por efecto de la hidrólisis, los azúcares de la capa externa del glóbulo de grasa, se elimina el efecto estérico y la suciente capa de proteínas.

lípidos y fosfolípidos se vuelve más accesible a la acción de otras hidrolasas como proteasas, lipasas y fosfolipasas. Como consecuencia, las gotas de grasa que están encerradas en el glóbulo pueden ser liberadas, lo cual puede conducir a grandes desventajas como una rápida lipólisis de la leche o crema.

- PROTEASAS :-

Alteraciones en la calidad de la leche son debidas tambien a cambios producidos en su composición proteínica. La liberación de compuestos nitrogenados y la degradación de fracciones de proteína individual, han sido observados como resultado de la proteólisis de microorganismos psicrotróficos, principalmente del género *Pseudomonas* (11,12,18,27).

Mediante electroforesis se ha observado que beta y alfa caseínas son atacadas preferentemente por las proteasas de psicrotróficos; sin embargo este ataque es selectivo para cada bacteria estudiada (19).

A su vez, algunos trabajos han demostrado que las proteínas del suero no son degradadas por las proteasas de microorganismos psicrotróficos (16).

La importancia de estas enzimas se debe principalmente a su resistencia al calor.

- FOSFOLIPASAS -

Anteriormente, la degradación de la leche se atribuía exclusivamente a las actividades glucolítica, proteolítica y

lipolítica de los microorganismos psicrotófilos; sin embargo, estudios recientes han sugerido que las fosfolipasas pueden ser importantes también en el deterioro de la leche (12).

Fra y col. aislaron 58 microorganismos productores de fosfolipasas en la leche homogeneizada, fresca y deteriorada. La mayoría eran especies de *Pseudomonas*, especialmente *P. fluorescens*. La importancia fundamental de las fosfolipasas en la leche se debe a que degradan la membrana del glóbulo de grasa y esto favorece la acción de las lipasas, aumentando así el problema de la rancidez (12,29,32).

1.4. Sistemas Antimicrobianos Naturales de la Leche.

El efecto antibacterial propio de la leche de vaca es conocido desde hace tiempo y ha sido sancionado en varios estudios como de gran importancia en el mantenimiento de la calidad de la leche. Sin embargo, debido a la falta de conocimiento sobre la naturaleza de los factores involucrados, el estudio de esta propiedad se había dejado abandonado.

En la actualidad son ya reconocidos los sistemas antibacterianos de la leche de vaca (26,30,40).

Reiter, en 1979, hizo una revisión de todos ellos y los dividió en dos grupos:

- de inhibición específica, entre los que se encuentran las inmunoglobulinas, fagocitos como los leucocitos polimorfonucleares y macrófagos.
- de inhibición no específica como lisocima, lactoferrina y la enzima lactoperoxidasa (34).

2. SISTEMA LACTOPEROXIDASA.

2.1. Antecedentes.

La actividad antibacteriana de la peroxidasa en la leche ha sido conocida desde hace varios años. Hansen sugirió que su acción está relacionada con las enzimas oxidantes. Esto no fue confirmado hasta 1959, cuando Wright & Traser, relacionaron la inhibición de algunas cepas de *Streptococcus lacticus* con la presencia de lactoperoxidasa en la leche.

En 1959, Portmann y Aebi identificaron a la lactoperoxidasa con la Lactenina 2, cuyo efecto inhibitor sobre ciertas bacterias acidolácticas era conocido.

Sin embargo, la lactoperoxidasa no tenía efecto bactericida por sí misma, de acuerdo a la evidencia de los trabajos de Jago y Morrison (1960). Dichos autores demostraron que la presencia de peróxido de hidrógeno era indispensable para obtener un efecto inhibitorio del crecimiento bacteriano.

Trabajos posteriores permitieron distinguir al ión tiocianato como el sustrato oxidable y tercer factor del sistema (26).

2.2 Componentes del Sistema Lactoperoxidasa.

2.2.1. Lactoperoxidasa.

La lactoperoxidasa es la enzima más abundante en la leche de vaca. Representa el 1% del contenido total de proteínas de suero. Normalmente la leche de bovino contiene aprox. 30 en/ml de esta enzima.

Las peroxidases son definidas como enzimas cuya función primaria

es la de catalizar reacciones en las que el peróxido de hidrógeno actúa comoceptor de átomos de hidrógeno, que a su vez son cedidos por otro compuesto (substrato). Se ha encontrado que las peroxidases de las glándulas mamaria, salivaria y lagrimal son inmunológica y químicamente similares.

A la peroxidasa de la leche se le ha dado el nombre trivial de lactoperoxidasa y debido a la similitud con la peroxidasa salival a menudo son referidas de la misma manera (50).

La enzima lactoperoxidasa es resistente in vitro a la acidez a pH cercanos a 3 y al jugo gástrico humano; posee un peso molecular de 92 000. Contiene 15.44% de nitrógeno y 0.069 de hierro. Se caracteriza por su estabilidad al calor, conservando su actividad al ser pasteurizada la leche bajo los procedimientos tradicionales (63° C/30 min o 72° C/ 15 seg) pero se destruye a 80° C durante 2.5 seg.

La actividad lactoperoxidasa se encuentra en todos los leches de vasa, pero su contenido varía debido a varios factores, tales como raza, edad, estado de lactación, alimentación, condiciones de salud. (26,42)

2.2.2. Tiocianato.

El ión tiocianato (SCN⁻) se encuentra ampliamente difundido en tejido y secreciones anexas. La concentración en fluidos humanos se encuentra en el Cuadro 2, el cual fue elaborado con datos de diferentes investigadores, recopilados por Reiter. Aunque no se dan detalles sobre estos valores, es evidente que

CUADRO 2: CONCENTRACION DE TIOCIANATO EN FLUIDOS HUMANOS.

(valores expresados en ppm de SCN⁻)

FLUIDO	NO FUMADORES	FUMADORES
Plasma	1.9	8.7
Saliva adultos	53	161
infantes	17	-
Orina	15	31
Jugo gástrico	23	84

Fuentes: Reiter, D., Hannaly, G. 1921

dichas concentraciones están determinadas por la dieta del individuo así como hábitos tales como el fumar.

El SCN⁻ es mayormente excretado por vía urinaria. Existen dos fuentes alimenticias principalmente para ingerirlos: los glucosinolatos y los glucósidos cianogénicos. Vegetales pertenecientes al género *Brassica* tales como col, coliflor y nabo son particularmente ricos en glucosinolatos, los cuales por hidrólisis liberan SCN⁻ y otros productos de reacción.

Los glucósidos cianogénicos se encuentran en el maíz, yuca, mijo, caña de azúcar, chícharos, frijoles y en las semillas de varias frutas. Cuando estos son hidrolizados, liberan cianuro que a su vez reacciona con tiosulfato (producto del metabolismo de los aminoácidos sulfurados) siendo detoxificado por su conversión a SCN⁻. Esta reacción es catalizada por la enzima rodanasa que se encuentra en el riñón y en el hígado. El tiocianato llega a la leche por medio de la sangre donde su concentración es 10 veces mayor. La leche de los bovinos contiene de 1 a 10 ppm de SCN⁻ (36, 43).

2.2.3. Peróxido de hidrógeno.

Este compuesto no se encuentra normalmente en la leche, o si está, no en cantidades fácilmente medibles. Reiter en 1976, reporta concentraciones muy bajas entre 2-4 microg/ml, siendo estas cantidades insuficientes para la activación del sistema.

Una posible fuente de H₂O₂ en la leche, puede ser debida a la actividad metabólica de bacterias ácido lácticas, que pueden

encontrarse como contaminantes o añadidos deliberadamente como cultivos iniciadores. Varios lactobacilos y estreptococos son capaces de producir cantidades suficientes de H_2O_2 para activar el sistema LP bajo condiciones serbicas (10,24,42).

Sin embargo la forma más utilizada es la edición de H_2O_2 por vía exógena.

2.3. Activación del Sistema.

El efecto antibacterial del sistema LP, depende de la presencia de sus tres componentes. La enzima lactoperoxidasa es abundante en la leche y sólo se requieren pequeñas concentraciones para el desarrollo de su actividad.

Bjork reporta como concentración necesaria de 142 $\mu g/l$, mucho menor de lo normalmente presente en la leche. Los factores limitantes son, por tanto, las concentraciones de tiosianato y de pérdida de hidrógeno. Estudios realizados por Bjork y Reiter, demuestran que el efecto antibacterial del sistema es proporcional a la concentración del SCN^- y que el máximo efecto es obtenido en concentraciones equimolares de SCN^- y H_2O_2 . El efecto se logra con 10-15 ppm (0.20-0.25 mM), seguido por la edición de una cantidad equimolecular de H_2O_2 (0.9 ppm).

Los niveles de SCN^- mencionados se encuentran dentro de las concentraciones fisiológicas en la leche, por lo que podrían ser alcanzadas y mantenidas con una adecuada alimentación de las vacas.

El pérdida de hidrógeno debe ser suministrado en forma exógena.

por métodos como:

- la adición directa de soluciones diluidas de H_2O_2 .
- la adición directa de peróxidos sólidos tales como percarbonatos alcalinos, peróxidos de carbamida, los cuales liberan H_2O_2 al contacto con el agua (24).
- por vía enzimática, por medio de la glucosa oxidasa (3), la oxidación de hipocantina por la xantina oxidasa.
- otras fuentes de H_2O_2 son la oxidación de ácido ascórbico, oxidación de nucleótidos de piridina reducidos (25).

Estos métodos han sido probados mediante experimentos de laboratorio y ha sido demostrada su capacidad para activar el sistema LP, produciendo un considerable efecto bactericida en la leche y medios semisintéticos (26).

2.4 Interferencias.

Algunas sustancias presentes en la leche, pueden ocasionar interferencias en el sistema. Ejemplo de estas son:

- peróxidos - catalasa - enzimas reductoras

2.4.1. Peróxidos.

Concentraciones elevadas de H_2O_2 (300-800 ppm), inactivan a la lactoperoxidasa, lográndose un efecto antibacterial debido únicamente a la capacidad oxidante de H_2O_2 (1,2).

2.4.2. Catalasa.

La enzima catalasa compete con la lactoperoxidasa por el H_2O_2 y

puede reducir el efecto antibacteriano del sistema LP, cuando la enzima se encuentra a bajas concentraciones (25).

A niveles fisiológicos normales de lactoperoxidasa y catalasa en la leche, no se ha observado interferencia. Se ha sugerido que la lactoperoxidasa tiene mayor afinidad por el H_2O_2 , que la catalasa, y explica también el porque el sistema es efectivo contra las bacterias catalasa positivas (26).

2.4.3. Agentes reductores.

Compuestos como cisteína y glutatión son conocidos como agentes que hacen reversible la actividad antibacterial del sistema LP. Esto implica que el sistema no es efectivo en medios con altas concentraciones de grupos sulfhidrilo libres.

La leche contiene muy pocos grupos sulfhidrilo libres. Estos se encuentran enmascarados principalmente en la beta-lactoglobulina y sólo reaccionan con sustancias oxidables en la leche tratada térmicamente.

Esta interferencia no es de importancia para la leche cruda, por lo que se le considere el medio más adecuado para la activación del sistema LP (26).

2.5. Mecanismo de Acción del Sistema Lactoperoxidasa.

Después de numerosos estudios para identificar la naturaleza química del compuesto que actúa como inhibidor en el sistema LP, se ha coincidido en aceptar el hipoclorito ($OSCN^-$) como el responsable del efecto del sistema. Este es el mayor producto

intermediario de la oxidación, el cual ha sido sintetizado químicamente y ha mostrado efectos inhibitorios en la producción de ácido de streptococos y varias enzimas. Thoms y Aune sugieren que este compuesto es formado mediante las siguientes reacciones:



Estas ecuaciones ilustran la relación entre $(\text{SCN})_2$ (tiocianógeno), HO^+SCN^- (ácido hipotiocianoso) y OSCN^- (ion hipotiocianito) (51).

El OSCN^- producido en esta reacción, actúa sobre las bacterias oxidando a las enzimas que contienen grupos sulfhidrilo, dando como resultado una inmediata inhibición de la respiración celular (26).

Se ha observado también que la membrana citoplasmática de las bacterias expuestas al sistema LP es dañada estructuralmente debido a la pérdida de iones K^+ , aminoácidos y polipeptidos dentro del medio. Por consiguiente, el consumo de oxígeno, síntesis de purinas, pirimidinas, aminoácidos así como también la síntesis de proteínas, DNA y RNA son inhibidos, produciendo finalmente lisis en la célula (42).

Sin embargo, el sistema no ejerce el mismo resultado sobre todas las bacterias ya que dependiendo de cual se trate puede ocurrir

una inhibición temporal del crecimiento o bien, la muerte de la célula. El modo de acción del agente activo no ha sido estudiado aún con detalle para cada bacteria.

Sin embargo, se ha demostrado que en el caso de *E. coli*, el consumo de O_2 y el transporte activo de glucosa y varios aminoácidos, se detiene inmediatamente después de ser expuesta al sistema. La muerte de organismos ocurre sin embargo 2 horas más tarde (26).

La lactoperoxidasa cataliza la incorporación de SCN^- en las proteínas. La reacción de $(SCN)_2$ o $OSCN^-$ con los grupos sulfhidrílicos los oxida a sulfenil tiocianatos.



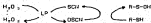
Estos compuestos pueden sufrir modificaciones posteriores, incluyendo procesos hidrolizables para producir ácido sulfénico.



En concentraciones elevadas de H_2O_2 y SCN^- , la porción carbónica del SCN^- es incorporada a otros derivados. Esto indica una probable modificación en los aminoácidos aromáticos de los residuos de proteínas (tirosina, triptófano, histidina). Estos cambios son significativos en la acción antisierbiana de la

leche contra ciertos microorganismos.

Por otra parte, a concentraciones bajas de SCH^- se obtienen altos porcentajes de oxidaciones de los grupos sulfhidrilo en bacterias expuestas al sistema LP debido al ciclo del SCH^- , como lo muestra el siguiente esquema:



La continua oxidación de SCH^- a OSCH^- , y la reducción de OSCH^- puede hacer que la oxidación de $-\text{SH}$ sea independiente de la concentración de SCH^- , en un amplio rango. La neutralización de SCH^- puede ser limitada por la acumulación de OSCH^- que no haya reaccionado (47).

2.5.1. Espectro antibacteriano del sistema LP.

El sistema LP/ $\text{SCH}^-/\text{H}_2\text{O}_2$, tanto en la leche como en medio sintético, tiene actividad sobre un amplio rango de bacterias. Esto involucra a microorganismos que son importantes tanto desde el punto de vista de calidad de leche cruda y de productos fermentados, hasta aspectos relacionados con la salud, tanto humana como animal. Aunque el sistema es considerado como no específico en cuanto a su actividad antibacteriana, se han encontrado considerables diferencias con respecto a la sensibilidad de su acción en las diferentes bacterias.

Dependiendo de la especie de la bacteria o de la cepa de la misma, el efecto puede ser bactericida o bacteriostático. Se ha

observado una clara distinción entre la sensibilidad de las bacterias $G(-)$ y $G(+)$, en donde las primeras son irreversiblemente inhibidas y las segundas lo son solo temporalmente. Esta diferencia exhibida por las bacterias $G(-)$ y $G(+)$ no se ha logrado explicar del todo hasta la fecha, pero se piensa que está relacionada con la estructura y composición de la pared celular y la membrana exterior de ambos tipos de organismos respectivamente. Estudios relacionados han ilustrado que la membrana interna de *E. lactis* se ve menos afectada que la de *E. coli*, lo cual se debe a una lipia menos severa en los primeros. Es probable que la pared celular de los Streptococcus presente una mejor barrera para la penetración de OSCM⁺ que la membrana externa de *E. coli*. De hecho, se ha reportado para $G(-)$ una sensibilidad variable decreciente de acuerdo al siguiente orden: *E. coli* 9117 (susceptible a anticuerpos de suero); *E. coli* 910 (resistente a anticuerpos específicos de suero); *Salmonella typhimurium* Pa. aeroginosa. Aumentos en la concentración de SCH⁻ y/o disminuciones en pH o densidad celular se ha demostrado que incrementan la susceptibilidad (43).

Muchos lactobacilos y estreptococos son solo temporalmente inhibidos y no destruidos por el sistema (26,42).

Es de especial interés el encontrar que el sistema LP ejerce un fuerte efecto bactericida para especies de Pseudomonas y otras bacterias psicrófilas aisladas de la leche. Estos organismos causan deterioro al desarrollarse en leche cruda refrigerada, limitando considerablemente el tiempo de almacenamiento (26).

2.6 Conservación de Leche Cruda Mediante el Sistema LP.

El hecho de que el sistema sea efectivo contra una gran variedad de microorganismos encontrados usualmente como contaminantes de la leche, sugiere que pueda ser utilizado para prevenir el deterioro bacteriano de leche cruda, prescindiendo de si la leche será refrigerada o no, en lugares donde las condiciones de largos períodos de almacenamiento y transportación son inevitables (34). Ajustando los niveles de $\text{BDH-} (12-15\text{ppm})$ y de H_2O_2 (8.5ppm) se activa el sistema LP. En la leche cruda esto origina un ligero descenso en el número total de bacterias, seguido por un período de bacteriostasia. La duración de la inhibición está inversamente relacionada con la temperatura de incubación.

En el siguiente cuadro se muestra esta relación, realizándose el estudio en leche cuya cuenta total fue menor a 5×10^8 cfu/ml (1).

T incubación (C)	t inhibición (hrs) (1)
30	7-8
20	12-14
15	24-26

(1) tiempo desde la adición de $\text{BDH-}/\text{H}_2\text{O}_2$ hasta el primer incremento en el número total de bacterias.

La eficiencia del sistema LP en leches crudas refrigeradas, también ha sido estudiada, observándose una reducción substancial de la flora bacteriana así como en toda la multiplicación de bacterias psicótroficas hasta por más de 5 días.

Es importante destacar que este tratamiento no afecta las propiedades fisicoquímicas de la leche, tales como tiempo de coagulación o contenido de ácidos grasos libres (26).

2.7 Aspectos Sanitarios.

El exceso de SO_2^- que no reacciona, se descompone, de acuerdo a la siguiente reacción, en sulfato, azufre y dióxido de carbono:



Bjerk y col(1) han indicado que el agente antibacteriano producido por el sistema LP es completamente destruido por calentamiento de la leche a 60°C durante 15 min. De ahí que la pasteurización convencional garantiza la eliminación del efecto antibacterial en la leche posteriormente procesada o distribuida para su consumo.

En el caso de la adición exógena del H_2O_2 , los niveles de 8-10 ppm que son requeridos para activar el sistema resultan ser muy bajos, comparados con los permitidos por la FDA, en el tratamiento con H_2O_2 , que recomienda concentraciones de 300-800 ppm. Este método, sin embargo, no es aceptado internacionalmente y solo debe utilizarse cuando existan razones técnicas y/o económicas que así lo justifiquen. (1)

Los valores de SO_2^- requeridos para activar el sistema (14.5 ppm)

son también bajas si los comparamos con los encontrados normalmente en la saliva humana (50-300 ppm), en el jugo gástrico (80-90 ppm) o en vegetales tales como col (36 ppm) o coliflor (88 ppm). (11).

Una limitante sobre el uso del sistema fue sustrada debido a que altas concentraciones de tiocianato, pueden interferir con la captación de iodo de la glándula tiroidea y la iodación de tiroxina. Fernández y col. (14,15) realizaron estudios para conocer, el alcance que tiene la ingestión prolongada de leche cuyos niveles de tiocianato han sido aumentados, tanto en pacientes normales como en aquellos con deficiencia de iodo.

Ellos concluyen que una ingestión diaria de 400 ml de leche, con una concentración de 20 mg/l de tiocianato, no tiene efecto en la función tiroidea en pacientes normales.

En pacientes con deficiencia de iodo se observó que una ingestión de leche con concentraciones de 0,1 mg/l de iodo, y con un incremento en el nivel de tiocianato, dando una ingestión diaria de 4,75 mg, no tiene ningún efecto aparente sobre la función de la glándula tiroidea. Además, el incremento de los niveles de tiocianato no interfiere con la reabsorción del iodo presente en la leche.

El hecho de que el sistema se encuentre en fluidos biológicos (saliva y jugo gástrico), actuando como sistema de defensa natural, puede hacer válida la hipótesis de que el sistema sea usado como preservativo sin riesgo alguno para la salud.

Por último, un prerrequisito para la utilización de este método es

la preservación de leche cruda, es la utilización de un sistema seguro y confiable que garantice la dosificación exacta y uniforme de los componentes que actúan en el sistema.

Así mismo, debido a que el sistema LP debe ser activado por medio de la adición de pequeñas cantidades de H_2O_2 y SDH^- , los aspectos sanitarios deben ser aclarados antes de ser aprobado su uso en cualquier país.

En el caso específico de México, la legislación no menciona nada relacionado con la activación de los sistemas antidiarreicos naturales de la leche. Sin embargo, en el Diario Oficial del Lunes 18 de enero de 1988, el Artículo 246 de la Ley de Salud, establece que la leche se considera adulterada cuando se le haya agregado cualquier otra sustancia, aunque sea componente normal a excepción de las vitaminas A y D en la leche semi-descremada.

Esto podría interpretarse como una prohibición a la activación del sistema. No obstante, ante la necesidad de optimizar los procedimientos de transporte y conservación de leche, debería promoverse la modificación del artículo correspondiente a fin de que pudieran ser utilizados los procedimientos que activan este sistema inhibitorio natural.

3.- YOGURT.

3.1. Generalidades.

El yogurt (y otros productos similares) es un alimento muy antiguo, probablemente originado en Mesopotamia alrededor del año 5 000 a.c. Desde tiempos remotos ha sido ampliamente consumido en varios países del Sureste de Asia y Europa Oriental. Sin

esbargo, su consumo en el mundo occidental fue despreciable hasta la década de los sesentas, cuando alcanzó una enorme popularidad. Este incremento fue debido, entre otros factores, a la introducción al mercado del yogurt y productos similares edulcorados y con sabores de frutas, así como al uso de envases desechables de plástico.

En México el consumo nacional de yogurt en 1985 fue de 32 mil toneladas, representando el 13% de los derivados lácteos; las proyecciones para 1990 son de 49 mil toneladas, lo que indica un mercado creciente (22).

En algunos países, el consumo de productos fermentados se prefiere a la leche fresca debido a sus propiedades características: sabor, aroma, apariencia y textura. Además, estos son más seguros que la leche fluida en ciudades donde las facilidades de transporte, pasteurización y refrigeración son inadecuadas.

Yogurt, de acuerdo a la definición de Kosikowski es un producto lácteo fermentado, resultado del crecimiento de las bacterias *Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus* en leche tibia, y se caracteriza por una textura suave y delicada, con un característico sabor "hogal" (27). Es un producto perecedero, el cual, no siendo pasteurizado después de la fermentación, tiene una vida media de 3 a 4 semanas. Esto, sin embargo, no depende únicamente del almacenamiento sino también del tipo de cultivos empleados, de la acción de los ingredientes de fórmula y de las medidas de sanidad durante la elaboración y

ensaque 1441.

En términos de composición general, el yogurt es similar a la leche. Sin embargo existen algunos aspectos en los cuales esta composición puede variar. Las variaciones pueden deberse a la adición deliberada de aditivos a la leche o yogurt o bien a los cambios causados por la fermentación bacteriana.

La composición de yogurt está dada en el Cuadro III. Un aspecto que ha recibido poca atención es el del valor nutritivo de las masas de células bacteriana, las cuales constituyen cerca del 1 % del material total en el yogurt. Existen reportes que sugieren que la proteína bacteriana puede ser una rica fuente de aminoácidos esenciales (17).

El yogurt, de acuerdo a la concepción del mercado actual, deber ser un líquido suave y viscoso, o un suave y delicado gel; pero en otros casos deber ser un producto uniforme, de textura firme, con mínima sinéresis y con sabor característico. Existen tres tipos principales de yogurt: rígido o semisólido, batido y líquido, aunque pueden mencionarse algunos otros como congelado, deshidratado, etc. (22)

CUADRO 3. COMPOSICION DE YOGURT.

CONSTITUYENTES (por 100g)	YOGURT BAJO EN GRASAS
Proteína	5.0
Grasa	1.0
Lactosa	5.0
Galactosa	1.0
Acido Láctico	1.00
Acido Cítrico	0.30
Potasio	0.24
Calcio	0.10
Fósforo	0.14
Cloruro	0.10
Sodio	0.00
Masa Bacteriana	0.15

Fuente: Deeth, H.G., Tamino, A.Y. Nutritive and Therapeutic Aspects. J. Food Prot. Vol. 44 No. 1:70-84

3.2 Microbiología de Cultivos iniciadores.

Las bacterias del yogurt y su comportamiento característico, hacen de este producto un alimento único, no duplicado por otras bacterias o por procesos de acidificación directa (27), pudiendo alcanzar en el suero de frescura una población de más de un billón de células vivas de *L. bulgaricus* y *S. thermophilus*/ml. Ambos organismos existen en una relación simbiótica y en proporciones que varían constantemente durante la manufactura del yogurt. Inicialmente el crecimiento de *S. thermophilus* se ve acelerado, para lo cual utiliza aminoácidos esenciales producidos por *L. bulgaricus*; a su vez *S. thermophilus* reduce los niveles de oxígeno e inicia la producción de ácido láctico, lo cual activa el crecimiento de *L. bulgaricus*. Esto aunado a la síntesis de ácido fólico que igualmente estimula el crecimiento de *L. bulgaricus*. El crecimiento de *S. thermophilus* entonces disminuye y *L. bulgaricus* reduce el pH a niveles aún menores, debido a la producción de ácido láctico. De hecho ambos microorganismos generan ácido láctico como principal producto de la fermentación (19,27). El crecimiento, resultado de una asociación simbiótica, alcanza una producción de ácido láctico por arriba de los niveles que alcanzarían dichos organismos independientemente. Aunado a ello la mayor síntesis de acetaldéhidó producido por *L. bulgaricus* en presencia de *S. thermophilus*, contribuye a la nota característica del aroma del yogurt. (23)

Al ser almacenado el yogurt a 4°C, estas bacterias comienzan a morir, descendiendo más rápidamente el *S. thermophilus*.

Factores tales como temperatura, presencia de sal, grado de acidez y frecuencia de "trespases", influyen en el ritmo de células desechables en la leche.

L. bulgaricus es un bacilo homofermentativo gram positivo. Largo, no móvil, productor de ácido D (+) láctico. Puede crecer a temperaturas superiores a 45°C, pero tiene su óptimo entre 40 y 45°C; no es capaz de crecer a temperaturas menores de 15°C. Es una bacteria anaerobia facultativa. Posee una actividad proteolítica media, llevando a una relativamente alta acumulación de aminoácidos libres. Tiene una débil actividad lipolítica, llevando a algunos cambios en la estructura de los ácidos grasos y ácidos grasos libres.

S. thermophilus es una bacteria esférica u ovoide, que puede aparecer en pares o cadenas, gram positivo. Es homofermentativa y produce ácido L (+) láctico a partir de glucosa, fructosa, lactosa o sacarosa. Tiene una temperatura óptima de crecimiento de 40 a 45°C, aunque puede crecer hasta 50°C, pero no a menos de 20°C (22). Es un anaerobio facultativo. Muestra una actividad proteolítica muy débil y la mayoría de los aminoácidos liberados son consumidos durante la fase de crecimiento logarítmico. Es una bacteria catalasa (-).

Como fue mencionado, ambas bacterias transforman la lactosa a ácido láctico, no produciéndose un agotamiento de este carbohidrato debido a que la acumulación de ácido en el medio, actúa como inhibidor del desarrollo de las bacterias mismas. Generalmente el nivel de lactosa utilizado alcanza un 20-30% del

inicial. El Ácido láctico es responsable de la formación del coágulo, firmeza y sabor ácido característico del yogurt. Esta acidez también inhibe el crecimiento de otras bacterias, tales como las patógenas *Salmonella* y *Staphylococcus aureus*, así como algunos microorganismos que deterioran el producto.

Para el desarrollo de las propiedades sensoriales deseadas, la relación de *S. thermophilus* a *L. bulgaricus* al término de la fermentación debe hallarse en un rango de 1:1 a 3:1.

El yogurt fresco normalmente contiene alrededor de 10^7 ^{u.f.c./g} organismos/g pero durante el almacenamiento se sabe que la cuenta decrece a 10^6 . Por otro lado, productos fermentados como yogurt, buttersilk y queso cottage, se ha demostrado que presentan un efecto anticáncer sobre microorganismos coliformes (*Enterobacter aerogenes* y *E. coli*). Aunque esta actividad inhibitoria se le ha atribuido principalmente al ácido láctico producido por la flora de cocos y bastones, aún no se han elucidado por completo los mecanismos involucrados en la acción conjunta de estos al respecto. (19)

3.3 Aspectos de Calidad.

La acidez titulable que debe alcanzar un yogurt para ser considerado como de buena calidad debe quedar en el rango de 0.85 a 0.9 %, para lo cual la fermentación a 45°C debe detenerse cuando la acidez fluctúa de 0.65 a 0.70 % (24).

El pH considerado como deseable para el desarrollo de un sabor completo varía de 4.5 a 4.7, aunque rangos menores (4.0 a 4.4) son considerados como óptimos.

Con respecto al sabor de yogurt y productos fermentados Flanning y Hursten (31) han destacado la importancia en la formación de acetaldehído y diacetilo.

Niveles de acetaldehído alrededor de 33 - 41 ppm se consideran óptimos para el desarrollo del aroma del yogurt.

Además del acetaldehído, otros compuestos volátiles merecen atención tales como diacetilo, acetoina, acetona y 2 butanona.

La calidad del yogurt, permanece aceptable durante el almacenamiento en refrigeración a 5°C por un período de 1 a 2 semanas.

Aunque el empleo de leche LP-activa se ha limitado principalmente a la alimentación de becerros recién nacidos, debido a su importancia en el desarrollo de resistencia in vivo contra la incidencia de *E. coli* en diversos países (43), su empleo en la producción de leche para consumo humano se recomienda únicamente en situaciones donde la conservación a bajas temperaturas no se puede lograr fácilmente, tal como ocurre en muchas regiones de países menos desarrollados.

De aquí la importancia de evaluar también la calidad de productos elaborados con leche LP-activa. Al respecto se ha demostrado que dicho tratamiento no interviene en el sabor del queso derivado. Sin embargo, las expectativas para productos fermentados a base de leche tratada, son aún desconocidas.

El yogurt merece especial atención en este sentido, dada su amplia aceptación en los mercados mexicanos e internacional, así como sus reconocidas propiedades terapéuticas y nutricionales.

CAPÍTULO II.

MATERIALES Y MÉTODOS.

1. OBTENCIÓN, RECOLECCIÓN Y TRANSPORTE DE LA MUESTRA.

Se utilizaron lotes de 4 litros de leche cruda fresca, proporcionados por el Centro de Investigaciones Pecuarias "La Posta", localizado a 20 km aproximadamente de la ciudad de Veracruz. La leche se obtuvo por medio de ordeña mecánica y fue transportada a temperatura ambiente, en recipientes de plástico previamente desinfectados. El tiempo estimado entre la ordeña y su llegada al laboratorio no excedió a dos horas.

3. CORRIDAS EXPERIMENTALES.

En total se llevaron a cabo 12 corridas experimentales, correspondientes a leches LP-activada y testigo (sin tratamiento), almacenadas hasta por 4, 6 y 8 días. Cada tratamiento se realizó por duplicado (Cuadro 5).

3. ACTIVACION DEL SISTEMA LACTOPEROXIDASA.

3.1. Determinación del Contenido Inicial de Iones SO_4^{2-} .

La concentración inicial de iones SO_4^{2-} fue determinada por el Método de Barbo (Ver Anexo I). Esta determinación se realizó debido a que, como fue mencionado anteriormente, la concentración de SO_4^{2-} en la leche de los bovinos puede variar entre 1 y 10 ppm, dependiendo de su alimentación. Así mismo, conociéndose los niveles iniciales, puede llevarse a cabo el incremento hasta la concentración recomendada por la literatura.

Cuadro 5. Corridos experimentales para leche cruda (1)

Corrida	Código	Tratamiento	Tiempo de almacenamiento (hrs) (2)
I	LP-4	lactoperoxidasa	96
II	LP-4	lactoperoxidasa	144
III	LP-0	lactoperoxidasa	192
IV	T-4	nulo	96
V	T-4	nulo	144
VI	T-0	nulo	192

(1) Cada corrida se llevó a cabo por duplicado.

(2) Almacenamiento a $4 \pm 0.1^{\circ}\text{C}$

De estas corridas se seleccionaron aquellas que dadas sus características fisicoquímicas y microbiológicas se pudieron utilizar para elaborar posteriormente yogurt.

3.2. Incremento y Adición de NaSCN Y H_2O_2 .

Una vez determinado el contenido inicial de SCN⁻, éste fue incrementado hasta los niveles recomendados. Para esto se utilizó una solución acuosa de NaSCN con una concentración de 7250 ppm, hasta obtener una concentración final de 14.5 ppm en la leche. Después se adicionó el H_2O_2 en forma acuosa a partir de una solución acuosa de 6000 ppm recién preparada. La concentración final en la leche fue de 9.5ppm.

Estas concentraciones finales de NaSCN y H_2O_2 fueron elegidas debido a que los estudios realizados con este sistema han indicado que el mayor efecto antibacterial es obtenido al incrementar el nivel de SCN⁻ hasta 0.25 mM (14.5 ppm) y añadiendo una cantidad equivalente de H_2O_2 (9.5 ppm) (1,2,26)

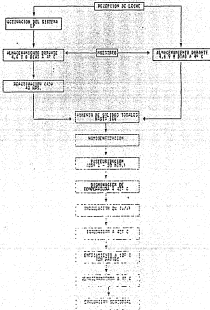
3.3. Reactivación.

Cada 48 hrs. fue determinado nuevamente el contenido de SCN⁻. Si los niveles descendían de 14.5 ppm se efectuaba la adición del NaSCN para obtener la concentración requerida. En el caso del peróxido de hidrógeno, la adición es indispensable.

4. ALMACENAMIENTO DE LECHE TRATADA Y TESTIGO.

La leche activada y la testigo fueron almacenadas durante 4 y 6 días a temperatura de 4°C.

DIAGRAMA DEL MÓDULO EXPERIMENTAL



5. MUESTREO.

Las muestras para los análisis físicoquímicos y microbiológicos se tomaron en la leche cruda al iniciar el almacenamiento. Una vez iniciado, las pruebas microbiológicas se realizaron diariamente, mientras que las físicoquímicas se hicieron cada 48 horas. Al término del almacenamiento, la producción de ácido en la leche inoculada para elaborar yogurt fue determinada hasta alcanzar el nivel requerido. Durante el almacenamiento del yogurt, esta determinación se continuó, realizándose en los días de sesión de catado.

5.1 Pruebas Microbiológicas.

5.1.1. Cuenta "total" o cuenta de mesófilos aeróbicos.

Se realizó de acuerdo al Standard Methods for the Examination of Dairy Products (33), incubando a 32°C por 48 hrs.

5.1.2. Cuenta de bacterias psicrotóficas.

Se realizó por el método de enumeración rápida de Oliveira y Pereira (37), incubando a 21°C durante 28 hrs.

5.1.3. Cuenta de coliformes totales.

Se realizó de acuerdo al Standard Methods for the Examination of Dairy Products (33), incubando a 32°C durante 24 hrs.

5.2. Pruebas Físicoquímicas.

5.2.1. Determinación de tiocianato.

Por el método de Sorbo (57). (Ver Anexo I)

5.2.2. Acidez titulable.

La acidez titulable fue determinada para leche cruda y para yogurt según el Standard Methods for the Examination of Dairy Products (33).

5.2.3. Actividad proteolítica.

Fue determinada por medio del incremento de grupos amino libre según el método de Fields modificado por Spedero. (20)

5.2.4. Actividad lipolítica.

Fue determinado por medio del incremento de ácidos grasos libres según el método de Booth y Fitz-Derald. (18)

5.2.5. Determinación de sólidos totales.

Según el Standard Methods for the Examination of Dairy Products (33).

4. PASTEURIZACIÓN.

Concluido el período de almacenamiento, las leches fueron pasteurizadas a 85°C durante 30 min, tratamiento necesario en la elaboración de yogurt. (40) Este proceso se llevó a cabo calentando la leche en vasos, de precipitado sobre una perilla eléctrica con agitación.

7. ELABORACION DE YOGURT.

7.1. CULTIVO INICIACION.

Se partió de una cepa de microorganismos liofilizados de *S. thermophilus* y *L. bulgaricus*, de) cual se tomaron dos azúcares bajo condiciones estériles, para inocular tubos de 10 cm. con tapón de

rosa, conteniendo leche en polvo descremada, reconstituida con agua al 10%. Los tubos fueron incubados a 45°C durante 5 horas, tiempo tras el cual se precipita la caseína de la leche formando un coágulo firme. Dicha precipitación ocurre al alcanzar un pH de 4.6. Posteriormente, el contenido fue vaciado en condiciones estériles a un matrón erlenmeyer de 250 ml que contenía 90 ml de leche, tratada de la misma manera que la de los tubos.

Una vez inoculados los matraces, se incubaron también a 45°C hasta lograr un coágulo firme. A este cultivo se le llamó cultivo madre.

7.2. Preparación.

El nivel de sólidos totales en la leche fue incrementado hasta alcanzar un 15-17%. Este aumento se realizó añadiendo leche en polvo descremada.

Posteriormente, la leche tratada y testigo fue homogeneizada utilizando una licuadora de tipo casero y pasteurizada como ya fue mencionado anteriormente. Concluida la pasteurización, las leches fueron enfriadas hasta la temperatura de incubación (45°C) e inoculadas con el cultivo madre en una concentración del 2% (v/v).

Los lotes de leche fueron incubados hasta alcanzar un porcentaje de acidez titulable entre 0.8 - 1.0 y posteriormente enfriados hasta 10°C.

B. ALMACENAMIENTO.

Los yogurts elaborados con la leche tratada y testigo fueron almacenados a 4°C durante el período de estado hasta que fueron calificados como inaceptables en alguna de las cualidades a evaluar.

9. EVALUACIÓN SENSORIAL DEL YOGURT.

9.1 Diseño Experimental.

El experimento fue diseñado como dos arreglos factoriales independientes:

- I. Leche almacenada 4 días
- II. Leche almacenada 6 días.

Debe hacer notar que las corridas de 6 días de almacenamiento fueron descartadas, debido a que la leche testigo no soportó el almacenamiento y los niveles de acidez y contenido microbiano se encontraban muy por encima de los requeridos para la elaboración de yogurt.

Para cada atributo el análisis estadístico de la información se llevó a cabo por medio de Análisis de Varianza (ANDEVA) de dos caminos, de acuerdo a un modelo balanceado para dos factores, con 2 y 3 niveles cada uno y 10 réplicas sensoriales.

$$y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \theta_{ij} + \epsilon_{ijk}$$

donde:

$i = 1,2$

$j = 1,2,3$

$k = 1, \dots, 10$

Los factores y niveles respectivos en cada experimento fueron:

(A) Tratamientos: Lactoperoxidasa y Testigo

(B) Tiempo de almacenamiento del yogurt: 0,3 y 7 días (en I) y
0,3 y 8 días (en II).

De tal forma que en cada experimento se tuvieron 6 tratamientos con dos factores principales A y B y una interacción doble A x B (24).

Previo al análisis de varianca se corroboró que existiera homocedasticidad de varianca (homocedasticidad) por medio de un prueba χ^2 de Bartlett (55).

En los casos que en que no se cumplió la condición anterior (se encontró heterocedasticidad) se utilizó una prueba no paramétrica de comparación múltiple de Kruskal-Wallis (39).

9.2. JUECES.

Se utilizó un panel de jueces seleccionados, formado por hombres y mujeres entre 24 y 30 años de edad. Los jueces fueron previamente entrenados para agudizar su capacidad sensorial en la identificación de sabores definidos: ácido, amargo, rancio y

oidado. Para la inducción de estos sabores se siguió la metodología propuesta por Campbell y Marshall (5). Con excepción del sabor ácido, las alteraciones fueron realizadas en leche cruda fresca, elaborando posteriormente el yogurt para entrenamiento.

SABOR	METODO DE INDUCCION
azúcar	Adicionar 0,3 ml de solución concentrada de miel de pollo por cada 20 ml de leche.
rancio	Adicionar 3 partes de leche cruda a 7 partes de leche tibia homogeneizada y refrigerar durante toda la noche.
oidado	Adicionar 2 gotas de sulfato cúprico al 1% ($\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$) a 400 ml de leche y exponer a la luz solar durante 30 min.

4.3. METODO SENSORIAL.

Se empleó una prueba descriptiva, siguiendo los lineamientos de Siedl y Stone (44). Para cada atributo se pidió a los jueces que evaluaran cada muestra, registrando sus percepciones en una escala de 15 cm, donde la referencia se situó en la parte central de dicha escala (ver cuestionario anexo). La muestra de referencia consistió en un yogurt elaborado con leche no azucarada, siguiendo el mismo proceso descrito anteriormente para elaboración de yogurt, habiendo pasteurizado y homogeneizado la leche previamente. Este yogurt de referencia se preparó para cada sesión de catado.

Las muestras se presentaron ordenadas al azar para lo cual se

utilizó una tabla números aleatorios.

A cada juez se le proporcionó agua, escupidora, lápiz y servilletas. La sesión de evaluación se llevó a cabo a las 10:00 A.M.

NOMBRE _____

FECHA _____ No. DE CODIFICACION _____

INSTRUCCIONES: Saboree la muestra de referencia identificándose con ella.

En lo sucesivo y pruebe la muestra codificada, marcando en la escala con una raya vertical, el punto que mejor describe la intensidad del sabor a evaluar.

GRACIAS

ACIDO



AMARGO



RANCIO



OXIDADO



COMENTARIOS:

CAPÍTULO III.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

1.- EFECTO DEL ALMACENAMIENTO DE LA LECHE CRUDA.-

1.1. Crecimiento de Microorganismos.

1.1.1. Cuenta "total". Mesofílicos Aerobios.

La cuenta "total" viable de las leches activadas y testigo, almacenadas a 4°C durante cuatro días, se presenta en la figura 1. En ella se observa que la leche activada con el sistema LP, disminuye en su cuenta microbiana, lográndose un efecto bactericida en las primeras 24 horas, mientras que la leche testigo incrementa notablemente su cuenta de microorganismos, teniendo al final del almacenamiento una diferencia mayor a un ciclo logarítmico entre ambas.

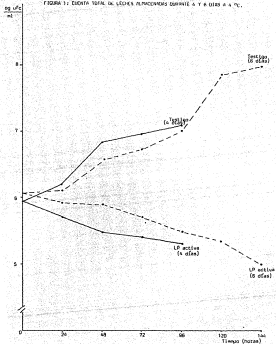
En el caso del almacenamiento por 8 días (figura 1.1), el comportamiento es muy similar. Sin embargo, la diferencia en el recuento final es más marcada, ya que se alcanza a reducir hasta 3 ciclos logarítmicos la cuenta viable de la leche activada en comparación con la leche testigo. Esto, debido probablemente al efecto de las reactivaciones efectuadas cada 48 horas. En este sentido se piensa que el ión ODCN⁻ presenta un efecto detergente sobre la estructura de la membrana interna bacteriana, causando la rápida pérdida de K⁺ y aminoácidos. El efecto bactericida se ha visto que se prolonga por períodos hasta de 8 horas, sin embargo este efecto se manifiesta proporcionalmente conforme se incrementa la concentración de iones ODCN⁻. Esto explica el efecto encontrado en este estudio.

en que las reactivaciones periódicas del sistema LP con SO_2H^- y H_2O_2 traen como consecuencia una marcada tendencia en la disminución de la cuenta de organismos viables. Cabe resaltar que la microflora natural de la leche está integrada principalmente por los géneros *Microplococaceae* y *Streptococaceae* con una incidencia de 30 a 99 y 0 a 50 %, respectivamente. Mientras que bastones esporulados Gram (+), bastones Gram (-) (incluyendo coliformes) y esporas de bacilos, se presentan con una incidencia menor al 10 % (13). El predominio de organismos Gram (+) ayuda a explicar el efecto retardado que se observa a las 48 horas del almacenamiento, ya que la acción del ion SO_2H^- se manifiesta más severamente en Gram (+) que en Gram (-), tal como se ha mencionado anteriormente (13). Sin embargo cabe esperarse que una gran parte de los organismos aerobios mesófilos sean psicrotróficos, capaces de multiplicarse a 4°C.

1.1.3. Psicrotróficos.

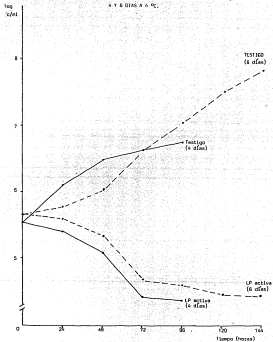
El comportamiento de los microorganismos psicrotróficos en la leche tratada y testigo, se reporta en la figura 2, para 4 y 6 días de almacenamiento. En el primer caso (leche almacenada hasta por 4 días) se observó que estos microorganismos tuvieron una reducción apreciable durante las primeras 72 horas. Posteriormente el efecto fue solamente bacteriostático, alcanzándose una población de 3×10^{-4} ufc/ml, notablemente inferior a la alcanzada por la leche testigo, la cual llegó a una población de 7×10^{-6} ufc/ml.

FIGURA 1: DENSIDAD TOTAL DE LECHEAS ALMACENADAS DURANTE 4 Y 6 MESES A 4 °C.



(51)

FIGURA 2. CANTO DE P.A. PSICORRÓFICOS EN LECHE ALMACENADAS QUENTE
4 Y 6 DIAS A 6 °C.



En el caso de leches almacenadas hasta por 4 días, se observó que la disminución alcanzada en la cuenta psicotrófica fue hasta 4 a 10^{-4} ufc/el en la leche activada. Esto significa una diferencia de tres ciclos logarítmicos en comparación con la leche testigo que terminó con 8×10^7 ufc/el. Cousins G. (13) en una revisión referente a la microbiología de leche cruda, indica el hecho de que la mayor parte de la flora psicotrófica está formada por bacterias Gram-negativas. *Pseudomonas* spp se presenta con una incidencia de alrededor del 50% del total de estas. El resto está comprendido por *Flavobacterium*, *Acinetobacter*, *Achromobacter*, *Alcaligenes*. En un estudio relacionado, se observó que leches inoculadas experimentalmente con *Pa. fluorescens* por 3 días a 4°C tratadas con el sistema lactoperoxidasa, presentaban una reducción de 2 ciclos logarítmicos en la cuenta de microorganismos al segundo día, con valores de 210 a 2.0 ufc/el, mientras que en las leches sin tratamiento LP, la cuenta al segundo día se veía aumentada en 1 ciclo logarítmico (43). Estos hechos coinciden perfectamente con lo encontrado en el presente estudio, con lo cual también se confirma la mayor susceptibilidad de organismos psicotróficos al sistema.

El significado de esta disminución de microorganismos mediante la activación del sistema LP es importante ya que existen evidencias experimentales que indican que bacterias psicotróficas al alcanzar grandes poblaciones, producen enzimas proteolíticas y lipolíticas que resisten los subsiguientes tratamientos térmicos por lo tanto pueden deteriorar los

productos derivados de esa leche aunque las bacterias que produjeron las anticinas hayan sido destruidas durante el procesamiento (29, 35, 36)

1.1.3. Coliformes.

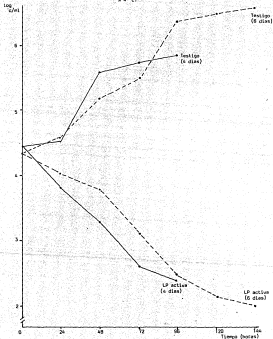
El grupo de bacterias coliformes es altamente sensible a la acción del sistema LP, ejerciéndose sobre ellos un efecto bactericida tal como se observa en la figura 3 que reporta su cuenta. Estos datos concuerdan con los reportados por Bjork (1) para estos microorganismos.

En el almacenamiento por 4 días se partió de una cuenta inicial de 4×10^4 ufc/ml y la disminución en la leche activada fue de aproximadamente un ciclo logarítmico cada 24 horas. En contraste, la leche testigo alcanzó una población de cerca de 1×10^6 ufc/ml al finalizar el almacenamiento.

Recientes descubrimientos relacionados, revelan que la susceptibilidad de organismos coliformes (particularmente diversas cepas de *E. coli*) hacia el sistema LP es mayor que la de otros tipos de bacterias. Las causas de esta diferente respuesta a la acción del sistema han sido sólo parcialmente elucidadas. Entre ellas, la presencia de grupos sulfhidrílicos en el efecto antibacteriano se ha demostrado que es determinante en la susceptibilidad exhibida por un determinado organismo. Además, se ha visto que organismos resistentes poseen un factor "reversible" (enzima) el cual invierte la inhibición de la glucosilasa; ésta cataliza la oxidación de NADH, en presencia de

(54)

FIGURA 3: CUENTA DE N.O. COLIFORMES EN LECHE ALMACENADA DURANTE 4 Y 8 DIAS
A 4 °C.



DSCM (producto intermedio de la oxidación). Este factor se ha aislado en cepas resistentes y se ha encontrado susceptible en cepas susceptibles (6).

Por otro lado, el incremento de la cuenta de coliformes tiene como consecuencia el desarrollo de propiedades indeseables en la leche; el principal es el desarrollo de sabores desagradables.

En general, el género *Enterobacteriaceae* se reconoce por ser capaz de fermentar azúcares (glucosa y lactosa) mediante el ciclo metabólico Embden-Meyerhof-Parnas, y de producir por diversas vías metabólicas, una gran variedad de compuestos derivados del ácido pirúvico, tales como ácido fórmico, ácido láctico, ácido succínico, ácido acético, 2,3-butanodiol y etanol, entre otros (48).

De aquí la importancia del sistema LP en prevenir el incremento en la acidez de la leche, resultado del metabolismo de este y otros géneros susceptibles.

Para el almacenamiento llevado hasta el sexto día se encontró que a su término la leche testigo contenía una población de 10^6 ufc/ml, mientras que la leche activada con el sistema LP descendió hasta una cuenta de 10^2 ufc/ml. Esto es, una diferencia global de 4 ciclos logarítmicos entre ambas.

1.2. Cambios Físicoquímicos.

1.2.1. Acidez.

Las leches utilizadas para los distintos tratamientos presentaron una acidez media de 0.14 ± 0.01 % ácido láctico (g/l), al inicio

del almacenamiento.

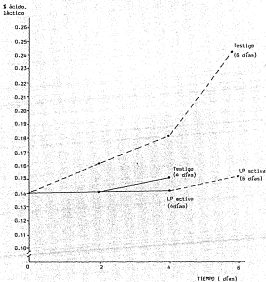
Los cambios debidos al almacenamiento y a la activación del sistema se presentan en la figura 4 .

En el almacenamiento durante 4 días a 4°C, la leche activada no presentó elevación en el nivel de acidez. La leche testigo incrementó únicamente en un 7.14 % con respecto a su nivel inicial.

En el almacenamiento durante 6 días, las diferencias alcanzadas al sexto día fueron más notables. La leche reactivada con el sistema LP aumento solo ligeramente su porcentaje de acidez hasta 0.15%. Mientras tanto, en la leche testigo este incremento se hizo sensible a partir del cuarto día de almacenamiento, alcanzando una acidez final hasta de 0.24%.

Los datos obtenidos concuerdan con los reportados por Mendoza (34) con respecto a la leche testigo. Esto debido a las poblaciones microbianas alcanzadas al término del almacenamiento, lo que ocasiona un incremento en la acidez como resultado de la utilización de lactosa con producción de ácido. En estudios llevados a cabo a gran escala, en los que se ha utilizado el sistema lactoperoxidasa para preservar la calidad de leche cruda en condiciones adversas en países en desarrollo (India, México, Sri Lanka, Pakistán), Reiter (43) ha reportado que a pesar de las elevadas temperaturas de manejo de hasta 37°C, el sistema es efectivo en retardar el desarrollo de acidez en la leche. La leche LP-estabilizada en ese estudio, desarrollo un aumento de 13.3% en 8 horas, en contraste con la leche control que presentó

FIGURA 4: INCREMENTO DE ACIDOS (expresado en % de g . Láctico) EN LECHE ALMACENADAS DURANTE 4 Y 8 DÍAS A 4°C .



un incremento de 62% con respecto a la acidez inicial, durante el mismo tiempo.

Es interesante notar, que el efecto preservativo no se atribuyó a la reducción de la flora Gram-negativa, sino mas bien a la supresión del desarrollo de acidez por bacterias ácido lácticas (41).

En el caso de la leche activada, el incremento de acidez es mínimo debido al efecto de las reactivaciones periódicas, con lo que se logra disminuir la cuenta bacteriana y por tanto retardar el deterioro de la leche. Esto ocurre porque el ion Ca^{++} producido por la acción del sistema LP, actúa sobre las bacterias, oxidando a las enzimas que contienen grupos sulfhídrico e inhibiendo procesos tan importantes como la glucólisis y la respiración celular tal como se ha mencionado anteriormente.

Es preciso indicar que aunque al momento de planear el estudio se pensaba prolongar el almacenamiento hasta el octavo día (ver Cuadro 5), al momento de pasteurizar la leche testigo, la acidez alcanzada de 0.61 % de ácido láctico y posiblemente la proteólisis resultado del deterioro bacteriano, fueron tan severas que causaron la coagulación de la proteína. El hecho de no contar con leche testigo, desbalancearía el experimento (ver diseño experimental). Esto aun cuando la leche estabilizada por el sistema LP ofreciese propiedades aptas para su pasteurización y posterior utilización para elaborar yogurt. Por ello las Ca^{++} a 0 días de almacenamiento no se han incluido. La

anterior es justificable si se tiene presente que, el objeto primordial del estudio se traduce en evaluar hasta que grado es factible estabilizar la leche cruda mediante el sistema lactoperoxidasa, sin sacrificar su funcionalidad en la elaboración de derivados, en este caso yogurt. Por lo tanto, en base a este criterio y a los resultados experimentales, las corridas obtenidas para 9 días se consideraron fuera de los objetivos inicialmente planteados.

1.3 Cambios Enzimáticos.

1.3.1. Proteolisis y Lipólisis.

La actividad proteolítica en las leches almacenadas se muestra en la figura 5. Esta actividad fue medida por el incremento de grupos amino libres.

Ambas leches muestran comportamientos similares en los dos almacenamientos y a pesar de que la diferencia no es muy marcada, la leche activada con el sistema se mantuvo por debajo de la leche no tratada como testigo.

En el almacenamiento durante 4 días la diferencia entre la leche no tratada y la leche LPeractiva fue de aproximadamente 0.035 mM de NH₂, mientras que al sexto día esta diferencia fue de 0.05 mM de NH₂.

FIGURA 5: PROTEOLISIS DE LECHE ALMACENADA DURANTE 5 Y 8 DIAS A 4 °C.

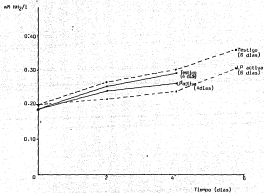
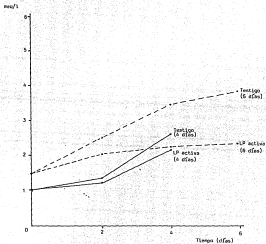


FIGURA 8: LIPOLISIS DE LECHEs ALMACENADAS DURANTE 4 Y 6 DIAS A 4 °C.



Era de esperarse que la proteólisis en la leche testigo fuera más acentuada, ya que a partir del cuarto día de almacenamiento la cuenta de bacterias psicrotróficas sobrepasó el rango de 10^6 ufc/ml, poblaciones que han sido reportadas por Yan (32) como causantes de proteólisis en la leche. Lee (27) ha revisado la información referente a la proteólisis causada por bacterias psicrotróficas en leche. De acuerdo a lo reportado en la literatura, cuentas de *Pseudomonas* y *Acinetobacter* cercanas a 10^7 ufc/ml producen concentraciones apreciables de proteinasas capaces de degradar las fracciones de caseína beta y kappa. Además de estos géneros, se ha visto que la proteinasa causada por *Flavobacterium* spp. presenta una actividad más elevada que la proteinasa de *Pseudomonas*. En general, la cuenta de la flora psicrotrófica (no definida) necesaria para producir péptidos de peso molecular entre 5000 - 300000 se mantiene en el rango 10^5 a 10^6 ufc/ml.

En el caso de las leches testigos almacenadas por 6 días, la flora psicrotrófica alcanzó cuentas suficientemente altas para hidrolizar las fracciones caseínicas. Sin embargo no a niveles tan elevados que causaran su coagulación durante el calentamiento a 80°C .

En contraste con lo anterior Van der Zant & Moore (12), encontraron que no existía relación entre la población psicrotrófica y la actividad proteolítica.

Del mismo modo Ogawa (12) reporta que los cambios sensoriales pocas veces son detectables en poblaciones aproximadas entre 10^7

y 10^8 ufc/ml. Mendoza (34) señala como característica sensorial limitante el sabor amargo, encontrado en leches con cuenta de psicotróficos superiores a 10^7 ufc/ml.

La actividad lipolítica que se desarrolló en las leches crudas durante su almacenamiento se detendió por la presencia de ácidos grasos libres y se presenta en la figura 6.

En el almacenamiento durante 4 días la diferencia entre ambas leches es mínima, alcanzándose una concentración máxima de 2.5 mg/l correspondiente a una población psicotrófica de 10^6 ufc/ml.

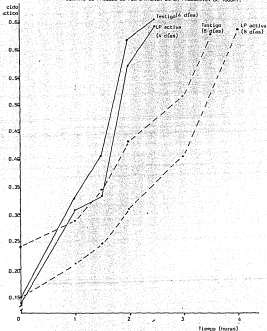
En el caso del almacenamiento prolongado a 5 días, se observó que la producción de ácidos grasos libres en la leche testigo alcanza niveles superiores a 2.5 mg/l mientras que en la leche LP-activada estos valores permanecieron por debajo de 2.5 mg/l. Estos resultados proporcionan evidencia para afirmar que la lipólisis se ve retardada debido a la inhibición del crecimiento y actividad de la flora microbiana de la leche, principalmente la de organismos psicotróficos.

2.- EFECTO EN LA PRODUCCIÓN Y ALMACENAMIENTO DE YOGURT.

2.1. Desarrollo de ácidos.

Concluido el almacenamiento, la leche fue pasteurizada e inoculada para producir yogurt. El incremento en la acidez durante la fermentación se observa en la figura 7.

FIGURA 7: DESARROLLO DE ACIDE EN LECHE ALMACENADA DURANTE 4 Y 5 DIAS DURANTE EL PROCESO DE FERMENTACION EN LA PRODUCCION DE YOGURT.



En ella se presenta como los lotes de leche almacenados durante 4 días, al ser inoculados, tuvieron un desarrollo de ácidos muy similar, el cual fue medido después de 1, 1.5, 2 y 2.5 horas de incubación hasta alcanzar el porcentaje de ácido láctico recomendado.

Al término del almacenamiento durante 4 días, la acidez de los lotes fue sorprendentemente diferente, ya que mientras que la leche estérilizada con el sistema LP contenía un 0.15 % de ácido láctico, la leche utilizada como testigo presentaba un 0.25%. Esto ocasionó que los niveles de ácidos no se desarrollaran de la misma manera.

Para alcanzar el 0.65% de ácido láctico requerido, fueron necesarias 2.8 horas de incubación en la leche almacenada durante 4 días, mientras que para el de 4 fueron necesarias 2.5. A pesar de la velocidad de producción de ácido láctico no sigue el mismo patrón para ambos tratamientos, tal como lo muestran las curvas incluidas en la figura 7.

Esto concuerda con lo reportado por Zell (55) que indica que la velocidad de crecimiento de los cultivos de yogurt en la leche tratada químicamente, decrece conforme se prolongue el almacenamiento. Además se ha demostrado que la acción proteolítica generada por la flora psicrotrófica durante el almacenamiento, tiende a estimular la velocidad de producción de ácido láctico en cultivos arrancadores.

Streptococcus y *Lactobacillus* son usados como iniciadores, requieren de enzimas específicas provenientes de la caseína,

siendo el más importante la valina, seguido por histidina y glicina, además de otros requerimientos nutricionales complejos, tales como ácido fólico, ácido pirúvico y dióxido de carbono (48). Ambos géneros fermentan casi cuantitativamente lactosa en ácido láctico, para lo cual siguen un mecanismo nofermentativo (ciclo Ebdon-Peyerhoff). Sin embargo, en presencia de *Pseudomonas* spp. la utilización de ATP se lleva a cabo por vías más eficientes especialmente en *Streptococcus* spp. Esto se ha atribuido a dos causas:

- 1.- a la capacidad de *Pseudomonas* para utilizar lactato (49).
- 2.- a la actividad proteolítica sobre la caseína que genera concentraciones adecuadas de aminoácidos y péptidos (10).

Por lo que se refiere a la producción de ácido láctico durante la fermentación se puede apreciar en la figura 7 el hecho de que los patrones seguidos por leches testigo y tratadas fueron diferentes. La leche almacenada por 4 días presentó un acelerado incremento en la acidez y alcanzó el contenido de ácido deseado con una eficiencia de casi un 30% mayor que las leches almacenadas 6 días (testigo y tratada).

Es posible que estas diferencias estén asociadas a dos diferentes mecanismos relativos a las interacciones ecológicas entre *L. bulgaricus* y *B. thermophilus*. Por un lado, la concentración de péptidos, aminoácidos y ácidos grasos debida a la acción de proteasas y lipasas es significativamente mayor en la leche almacenada por 6 días.

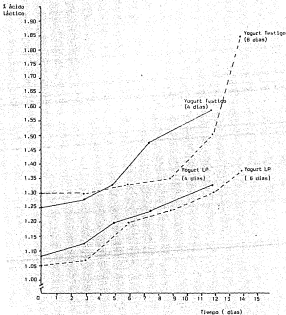
Aunado a esto, el otro mecanismo implicado que posiblemente

contribuye a retardar el desarrollo de ácidos en leches con actividad proteolipolítica de 6 días, es que la fermentación a 43°C favorece el crecimiento de *L. bulgaricus*, tal como lo han demostrado Hamann y Nerth (25). El cociente de *S. thermophilus* a *L. bulgaricus* obtenido durante la fermentación de leche entera a 43°C ha sido de 4,13:1. Por tanto es posible que la utilización de glucosa a pH's ligeramente inferiores, aunado a una mayor actividad proteolipolítica se vea disminuida para *L. bulgaricus*, particularmente al inicio de la fermentación y como resultado se obtenga una fase logarítmica antes de que se espere a producir ácido láctico en base equimolar.

A su vez, la leche testigo contiene un incremento de ácidos adecuado, debido a que, por su alta cuenta de microorganismos psicrotrofos, se convierte en un excelente sustrato para *S. thermophilus* y *L. bulgaricus*. Esto es debido probablemente a que los psicrotrofos llevan a cabo una proteólisis continua, lo que incrementa las cantidades de compuestos nitrogenados aprovechables, estando disponibles para las bacterias lácticas (10).

Por lo que se refiere a la producción de ácidos del yogurt almacenado a 4°C, es necesario resaltar el hecho de que hasta el octavo día se encuentra una relación casi lineal tanto en leches LP-activas como testigo, tal como se puede apreciar en la figura 8. Sin embargo, las leches testigo, a partir del día 8 presentan un acentuado incremento en su acidez en cooperación con las leches LP. En este sentido, es probable que el sistema LP

FIGURA 81 - INCREMENTO DE ACIDEZ DURANTE EL ALMACENAMIENTO DEL YOGURT A 4 °C ELABORADO CON LECHE ALMACENADAS DURANTE 4 Y 6 DIAS.



continúa presente en el yogurt almacenado y dada la incapacidad de las bacterias ácido-lácticas para utilizar H_2O_2 (catalasasnegativas) el sistema sea autoreactivado conforme se genera H_2O_2 , endosomo, causando una auto-inhibición, hecho que a su vez ha sido fundamentado por Reiter (45). En base a esto, aunque al término de la fermentación los niveles de ácidos para los diferentes tratamientos fueran casi iguales, el sistema LP definitivamente tiene un efecto que prevalece después de la fermentación y que se manifiesta únicamente a bajas temperaturas pero no durante la fermentación.

3. EVALUACIÓN SENSORIAL.

Los resultados de la evaluación sensorial se analizaron separadamente para cada atributo, siguiendo el diseño experimental previamente descrito.

Previo al Análisis de Varianza (ANDEVA) se corroboró la existencia de homogeneidad de varianzas mediante la prueba de Bartlett basada en el hecho de que las varianzas experimentales

CUADRO de Prueba de homogeneidad de varianzas (Bartlett) por atributo sensorial en yogurt almacenado bajo refrigeración.

ATRIBUTO SENSORIAL	VALOR DE BARTLETT	VALOR CRITICO $\chi^2_{1-\alpha; k-1}$	CONCLUSION $H_0: \sigma_1^2 = \sigma_2^2 = \dots = \sigma_k^2$	TIPO DE ENSAYO
ácidos		12.592		
4 días	0.54	12.592	No aceptar	paramétrico
6 días	2.06	12.592	No aceptar	paramétrico
amargura		12.592		
4 días	15.51	12.592	No rechazar	no paramét.
6 días	18.98	12.592	No rechazar	no paramét.
rancidez		12.592		
4 días	52.69	12.592	No rechazar	no paramét.
6 días	41.16	12.592	No rechazar	no paramét.
oxidación		12.592		
4 días	12.53	12.592	No aceptar	paramétrico
6 días *	-	-	-	-

(*) No se efectuó el análisis debido a que se encontró $\alpha = 0$.

para cada tratamiento al agruparse siguen una distribución tipo k^2 (D&T).

En el cuadro 6 se incluyen los resultados de la prueba de Bartlett para cada atributo sensorial.

SABOR ACIDO.

En el cuadro 7 se presenta el análisis de variancia (ANDEVA) para los resultados de leches almacenadas 4 días. Como se aprecia por los valores de F, tanto el sistema LP como los días de almacenamiento resultaron ser fuentes de variación significativas sobre la acidez sensorial del yogurt.

Por lo que respecta a la leche almacenada 6 días, el cuadro 8 incluye el ANDEVA para dichos resultados. Al igual que en la de 4 días, se obtuvieron diferencias significativas originadas por el uso del sistema LP así como por el tiempo del yogurt.

El desarrollo del sabor ácido en yogurtes elaborados con leches experimentales almacenadas por 4 y 6 días se presenta en el cuadro 9.

La prueba de Duncan a un nivel de significancia de 0.05 indicó que existe una tendencia al aumento en la acidez sensorial tanto para la leche tratada con el sistema LP como para la leche testigo. Así mismo, existen diferencias significativas entre leches tratadas y no tratadas que se mantienen para cada período de tiempo. Pese a que no se analizaron simultáneamente los resultados para las leches almacenadas durante 4 y 6 días debido a que los períodos de muestreo fueron diferentes para cada caso.

CUADRO 7. Cuadro de Anova para la evaluación sensorial del sabor ácido en yogurt de leche almacenada 4 días.

FUENTE DE VARIACION	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS DE LIBERTAD	CUADRADO MEDIO	VALOR DE F
tiempo LP :	26.67	1	26.67	7.008 *
días de almacenamiento	124.94	2	62.47	16.42 ***
interacción	0.356	2	0.1782	0.046
error	205.81	54	3.80	
total	357.49	58		

* $p < 0.05$.

$$F_{(1, 1) 54} (0.05) = 4.03$$

*** $p < 0.001$.

$$F_{(2, 1) 2} 54 (0.001) = 7.96$$

CUADRO B. Cuadro de Anova para evaluación sensorial de sabor ácido en yogurt de leche esterilizada 6 días.

FUENTE DE VARIACION	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS DE LIBERTAD	CUADRADO MEDIO	VALOR DE F
sistema LP	121.84	1	121.84	28.62 ***
días de almacenamiento	376.20	2	190.10	45.55 ***
interacción	3.51	2	1.25	0.30
error	234.77	54	4.35	
total	755.32			

(***): $p < 0.001$ (F crítica 2.84 - 7.96)

lo suél, no permitió conformar todos los datos en el mismo arreglo estadístico, si fue posible detectar el efecto de la diferencia de dos días de almacenamiento previo de la leche sobre la acidez sensorial del yogurt elaborado. Se puede apreciar que en la leche de 4 días el sistema LP no tiene ningún efecto sobre el desarrollo de la acidez con respecto a la leche testigo y la acidez aumenta en forma proporcional en ambas leches a los 5 y 7 días de almacenamiento. En contraste con esto, las leches almacenadas 6 días, sí muestran diferencias asociadas a la presencia del sistema LP y al tiempo de almacenamiento del yogurt, tal como lo demuestran los datos del cuadro 9.

En este sentido es interesante resaltar que la acidez titulable presentó diferencias asociadas al uso del sistema LP en comparación con leches no tratadas. Además, concuerdan con los resultados sensoriales en el sentido de que las diferencias se acentuaron más claramente para las leches almacenadas 6 días que para 4 días.

Cabe añadir que el desarrollo de acidez para leches almacenadas por 6 días se vio marcadamente acelerado cuando se le comparó con el del yogurt de leche de 4 días de almacenamiento. Adicionalmente, el efecto retardado para la producción de acidez en yogurt-LP se encuentra en acuerdo con los datos obtenidos para acidez titulable. Los niveles de acidez sensorial alcanzaron ser inaceptables en períodos más cortos cuando no se utilizó el sistema LP.

CUADRO 7. Resultados de la prueba de Duncan de Múltiple Rango para el desarrollo de sabor ácido durante el almacenamiento del yogurt elaborado a partir de leches almacenadas por 4 y 6 días.

- LECHE ALMACENADA DURANTE 4 DÍAS -

tiempo (días)	YOGURT LP	YOGURT TESTIGO
0	7.90 ± 2.01 ^a	9.26 ± 2.24 ^{ab}
5	10.98 ± 1.90 ^{ab}	12.39 ± 1.67 ^b
7	10.97 ± 2.11 ^{ab}	12.22 ± 1.70 ^b

- LECHE ALMACENADA DURANTE 6 DÍAS -

tiempo (días)	YOGURT LP	YOGURT TESTIGO
0	7.00 ± 1.71 ^a	8.53 ± 2.24 ^a
3	9.73 ± 2.13 ^a	12.01 ± 2.42 ^b
6	11.43 ± 2.74 ^a	14.85 ± 0.33 ^b

(1) Se presentan medias y desviaciones estándar de 10 observaciones experimentales.

(2) Medias seguidas bajo la misma literal, para el mismo tratamiento, no presentan diferencias significativas ($p < 0.05$) de acuerdo a la prueba de Duncan de Múltiple Rango (DMRT).

SABOR AMARDO.

Para el análisis de la producción de sabores amargos en los diferentes yogurts se siguió una prueba no paramétrica para detectar diferencias significativas entre tratamientos. Esto se llevó a cabo por medio de una prueba de Kruskal-Wallis. Los valores H obtenidos para los experimentos a 4 y 6 días de almacenamiento se muestran en el cuadro 10.

No se encontró evidencia experimental para afirmar que existieran diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los diferentes yogurts almacenados, aún cuando se emplearon leches cuya proteólisis y lipólisis presentaron niveles elevados.

Estos hechos sugieren por un lado que el desarrollo de sabores ácidos en yogurt ensacera notablemente la presencia de otros sabores indicativos del deterioro enzimático y microbiano, y también dan la pauta para realizar futuros estudios empleando jueces altamente entrenados capaces de discernir entre sabores extraños. La sensibilidad del panel utilizado no detectó estos para el presente estudio no encontrándose diferencias significativas en términos de sabor amargo entre yogurt fresco y yogurt almacenado y tratado químicamente.

SABOR RANCIO.

En el caso del desarrollo de sabores rancios (que recuerdan al jabón), los resultados para la prueba de Kruskal-Wallis se presenta en el Cuadro 11. Se encontró que las leches almacenadas 6 días sí presentaron diferencias significativas en términos de

CUADRO 10. VALORES DE H PARA ANÁLISIS GENERAL DE YOGURT DE LECHE ALMACENADA 4 y 6 DIAS.

TRATAMIENTO	VALOR H	VALOR DE χ^2	CONCLUSIÓN
yogurt de leche (4d)	1.043	11.07	aceptar H_0 (no hay diferencial)
yogurt de leche (6d)	1.545	11.07	aceptar H_0 (no hay diferencial)

CUADRO 11. VALORES DE H PARA LA EVALUACION DE SABORES RANCIOS EN YOGURT DE LECHE ALMACENADA A 4 Y 6 DIAS DE ALMACENAMIENTO.

TRATAMIENTO	VALOR H	VALOR χ^2	CONCLUSION
Yogurt de leche 4 días	8.05	11.07	aceptar H_0 (no hay diferencia)
Yogurt de leche 6 días	15.55	11.07	rechazar (sí hay diferencia)

la producción de sabores rancios, producto de la lipólisis alcanzada durante el almacenamiento. Estos resultados se incluyen en el cuadro 12.

En el cuadro 10 se puede apreciar que el efecto del sistema LP realmente no se manifiesta entre lechas tratadas y testigo si se considera independientemente cada periodo de muestreo. Sin embargo si se presentan diferencias significativas asociadas al uso del sistema LP y al almacenamiento del yogurt.

Esto se traduce en que el yogurt obtenido a partir de leche estabilizada con el sistema LP presentó menor rancidez al inicio de su almacenamiento que el elaborado con leche sin tratamiento, almacenado por 3 días, el cual presentó una vida de anaquel inferior.

Los resultados sensoriales están en perfecto acuerdo con los datos obtenidos para actividad lipolítica determinada químicamente (Figura 4), en que la la lipólisis alcanzada por la leche testigo al sexto día se vio considerablemente aumentada con respecto a la leche LP activa. Esto brinda una valiosa evidencia para explicar la naturaleza termorresistente de enzimas lipolíticas producidas por la flora psicrotrófica.

SABOR OXIDADO.

Por lo que se refiere al desarrollo de sabores oxidados, de acuerdo a la conclusión para la prueba de Homocedidad de Varianza (cuadro 4), se llevó a cabo un análisis de varianza de dos vías. El cuadro ANOVA (cuadro 13) reveló no diferencias

significativas en cuanto a la presencia de estos sabores. De hecho en el caso de leches almacenadas 6 días se obtuvieron repeticiones idénticas con desviaciones estándar iguales a cero y sin relevancia estadística. Se hizo evidente el hecho de que el desarrollo de sabores oxidados en las muestras no alcanzó el umbral sensorial para ninguno de los jueces.

Los resultados de la evaluación sensorial dejaron claro el concepto de que el factor determinante de la calidad del sabor del yogurt, definitivamente es la acidez que a medida que se aumenta, enmascara la presencia de altos niveles de sabores amargos y oxidados. Sin embargo, los rancios llegan a alcanzar niveles significativos, aún en presencia de altos niveles de acidez, tal como se aprecia en las figuras 9 a 14, trazadas a partir de los datos del Cuadro 14.

Los perfiles de sabor para las diferentes muestras se elaboraron según la metodología recomendada por Stone (46). En cada caso se incluye el control (yogurt fresco).

CUADRO 12. DESARROLLO DE SABOR RANCIO DURANTE EL ALMACENAMIENTO DEL YOGURT DE LECHE ALMACENADA 4 Y 6 DÍAS.

- LECHE ALMACENADA DURANTE 4 DÍAS -

tiempo (días)	LP	TESTIGO
0	7.53 ± 0.09 *	7.03 ± 0.73 *
5	7.58 ± 0.19 *	8.10 ± 0.82 *
7	8.16 ± 0.42 *	8.42 ± 1.05 *

- LECHE ALMACENADA DURANTE 6 DÍAS -

tiempo (días)	LP	TESTIGO
0	7.54 ± 0.13 *	8.90 ± 1.71 **
3	7.92 ± 0.72 **	9.63 ± 1.23 **
6	7.86 ± 0.52 ***	9.86 ± 1.44 *

(1) Medias y desviaciones estándar para 10 observaciones experimentales.

(2) Medias seguidas bajo la misma literal no son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

CUADRO 13: CUADRO DE ANDEVA PARA EVALUACION DE SABORES OXIGADOS EN YOGURT DE LECHE ALMACENADA 4 DIAS.

FUENTE DE VARIACION	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS DE LIBERTAD	CUADRADO RESID	VALOR F
sistema LP	0.049	1	0.049	1.523
días de almacenamiento	0.095	2	0.047	1.043
Interacción	0.006	2	0.003	0.063
error	2.46	54	0.0455	
TOTAL	2.62			

CUADRO 14. MEDIAS Y DESVIACION ESTANDAR PARA LOS RESULTADOS DE LA EVALUACION SENSORIAL DE SABOR DEL YOGURT ELABORADO A PARTIR DE:

LECHE ALMACENADA 4 DIAS

Atributo sensorial y periodo muestral	LP		TESTIGO	
ACIDEZ				
periodo I	7.98 ^c	2.01 ^a	9.36	2.34 ^{ab}
periodo II	10.98 ^c	1.90 ^a	12.30 ^c	1.67 ^a
periodo III	10.99 ^c	2.11 ^a	12.22	1.79 ^a
AMARGURA				
periodo I	7.78 ^c	0.84 ^a	8.42	1.67 ^a
periodo II	7.89 ^c	0.91 ^a	8.55	1.56 ^a
periodo III	8.54 ^c	1.48 ^a	7.98	0.70 ^a
RANCIDEZ				
periodo I	7.55 ^c	0.09 ^a	7.83	0.70 ^a
periodo II	7.88 ^c	0.19 ^a	8.16	0.82 ^a
periodo III	8.16 ^c	0.95 ^a	8.42	1.83 ^a
OXIDACION				
periodo I	7.55 ^c	0.16 ^a	7.51	0.0 ^a
periodo II	7.61 ^c	0.20 ^a	7.56	0.15 ^a
periodo III	7.67 ^c	0.38 ^a	7.52	0.22 ^a

LECHE ALMACENADA 4 DIAS

Atributo sensorial y periodo muestral	LP		TESTIGO	
ACIDEZ				
periodo I	5.40 ^c	1.70 ^c	0.55 ^c	2.24 ^c
periodo II	7.73 ^c	2.13 ^c	12.01 ^c	2.42 ^c
periodo III	11.65 ^c	2.76 ^c	14.88 ^c	0.33 ^c
AMARGURA				
periodo I	7.72 ^c	0.43 ^c	7.94 ^c	0.49 ^c
periodo II	7.64 ^c	0.89 ^c	0.20 ^c	1.75 ^c
periodo III	7.97 ^c	0.76 ^c	7.92 ^c	0.91 ^c
RANCIDEZ				
periodo I	7.54 ^c	0.13 ^c	0.90 ^c	1.71 ^{***}
periodo II	7.92 ^c	0.72 ^{**}	9.65 ^c	1.23 ^{**}
periodo III	7.86 ^c	0.52 ^{**}	9.86 ^c	1.44 ^c
OXIDACION				
periodo I	7.5 ^c	0.0 ^c	7.5 ^c	0.0 ^c
periodo II	7.5 ^c	0.0 ^c	7.5 ^c	0.0 ^c
periodo III	7.5 ^c	0.0 ^c	7.5 ^c	0.0 ^c

(c) las medias seguidas bajo diferente literal son significativamente distintas entre sí a $p < 0.05$ según la prueba de múltiple rango de Duncan.

(***) los periodos de muestreo para la leche de 4 días fueron de 0, 3 y 7 días y para las leches de 6 días de 0, 3 y 6 días.

FIGURA 9. PERFIL DE SABOR PARA YOGURT ELABORADO CON LECHE ALPACORONA A 4 DÍAS
 AL DIA CUERO DE ALMACENAMIENTO (Período Inicial)

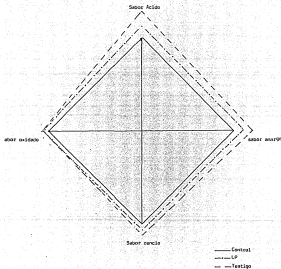


FIGURA 10: PERFIL DE SABOR PARA YOGURT DE LECHE ALMACENADO POR 4 DIAS AL QUINTO DIA, (Período II).

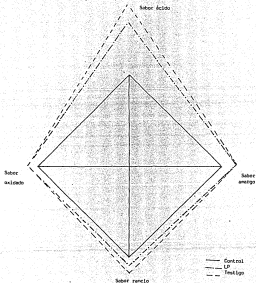


FIGURA 11: PERFIL DE SABOR PARA YOGURT DE LECHE ALMACENADO POR 6 DIAS A SEPTIMO DIA. (Período III)

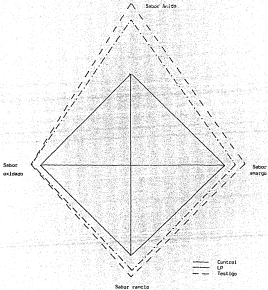


FIGURA 12: PERFIL DE SABOR PARA YOGURT DE LECHE ALMACENADA POR 6 DIAS A 60°C. Opción 1).

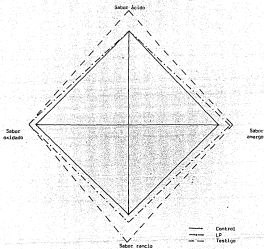
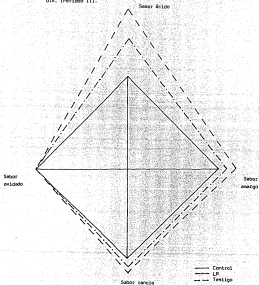
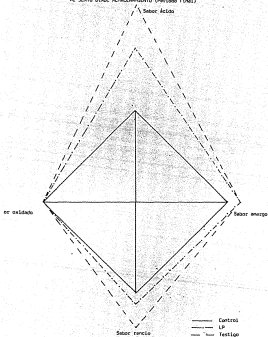


FIGURA 13: PERFIL DE SABOR PARA YOGURT DE LECHE MANCENIDA POR 6 DIAS AL TERCER DIA, (Período II).



(81)

FIGURA 14: PERFIL DE SABOR PARA YOGURT ELABORADO CON LECHE ALMOCHADA O DESLACTADA AL SEXTO DIA DE ALMOCHAMIENTO (Paralelo final)



CAPITULO IV.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.

Durante el almacenamiento de leche cruda, se encontró que el sistema LP redujo considerablemente la cuenta de microorganismos mesofílicos aerobios, psicrófilos y en un mayor grado a los coliformes.

Se observó también que a pesar del efecto bactericida del OGDH-generado, la actividad lipoproteica (presumiblemente de microorganismos psicrófilos) continuó hasta el sexto día de almacenamiento. Sin embargo, fue menor que en las leches no tratadas.

La leche estabilizada mediante el sistema LP hasta por 6 días se encontró apta para la elaboración de yogurt, aunque se vio que el tiempo necesario para alcanzar la acidez requerida durante la fermentación, se ve incrementado en comparación con leche almacenada por tiempos más cortos.

La falta de evidencia experimental y la escasa literatura al respecto para explicar este hecho, hacen recomendable el llevar cabo futuros estudios para despejar estas interrogantes.

La pérdida de calidad del yogurt elaborado con leche almacenada, estuvo determinada principalmente por el desarrollo del sabor ácido, que mostró la misma tendencia que la acidez titulable, así como por la actividad lipolítica que originó el desarrollo de sabores rancios.

El sistema LP redujo significativamente el efecto ejercido por estos dos factores sobre el sabor del yogurt.

La actividad del sistema Lactoperoxidasa es probable que continúe ejerciendo un efecto sobre la flora ácido láctica del yogur, aunque esto no se demostró por completo.

Los lineamientos utilizados para llevar a cabo la evaluación sensorial, resultaron de gran confiabilidad, aún cuando el panel no fué integrado por jueces expertos.

Es importante señalar que de los sistemas inmunológicos presentes en la leche el Sistema Lactoperoxidasa merece mucha mayor investigación.

Este estudio aporta información valiosa, relativa al comportamiento del sistema LP, como una alternativa viable para la conservación de leche cruda apta para la producción de derivados.

CAPITULO V.
BIBLIOGRAFIA REVISADA.

- 11) Björck, L. 1982. "Activation of the lactoperoxidase system as a mean of preventing bacterial deterioration of raw milk." *Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte* 34 (1):8-11.
- 12) Björck, L., Claesson, O. 1977. "The lactoperoxidase/thiocyanate/hydrogen peroxidase system as a temporary preservative for raw milk in developing countries." *Milchwissenschaft* 34 (12), 726-729.
- 13) Björck, L. 1976. "An inactivated two-enzyme system for the activation of lactoperoxidase antibacterial system in milk." *Biotechnology and bioengineering*, Vol. XVIII, 1463-1472.
- 14) Bossert, J.O., Baget, N. et al. 1996. "The influence of light transmittance on gas permeability of various packing material on the quality of whole natural yoghurt during storage." *Food Packaging and Preservation. Theory and Practice*, Nathiouthi N. Ed. Elsevier Applied Science Publishers Ltd. Essex, England.
- 15) Campbell, J.R., Marshall, R.T. 1975. "The science of providing milk for men". No. Gray-Hill Book Company, U.S.A. pp-318-530.
- 16) Carlsson, J., Isami, Y. 1983. Hydrogen peroxide secretion by oral Streptococci and effect of lactoperoxidase-thiocyanate-hydrogen peroxide. *Infection and Immunity*, Vol. 40 pp. 70-80. American Society for Microbiology.
- 17) Cheftel, J.A., Cheftel, H. 1976. "Introducción a la bioquímica y tecnología de los alimentos." Vol. I. Editorial Agrícola.
- 18) Collins, C.B., Arasaki, K. 1980. "Production of Hydrogen Peroxidase by *Lactobacillus acidophilus*." *Journal of Dairy science* 63:353-357.
- 19) Cousin, R.A., Marth, E.H. 1977. "Cheddar cheese made from milk that was precultured with psychrotrophic bacteria." *Journal of Dairy Science* 60: 1048-1056.
- 10) Cousin, R.A., Marth, E.H. 1977. "Lactic acid production by *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus* in milk precultured with psychrotrophic bacteria." *Journal of Food Protection* vol. 40, No.7:472-477.
- 11) Cousin, R.A., Marth, E.H. 1981. "Proteolytic activity of Psychrotrophic microorganisms on milk and dairy products" *Psychrotrophic Microorganisms in Spoilage and Pathogenicity*. Academic Press, New York.

- 112) Cousin, M.A. 1982. "Presence and activity of psychrotrophic microorganisms in milk and dairy products: A review." *Journal of Food Protection*. Vol 45, No. 2: 172-207.
- 113) Cousins, C.H., Brasley, A.J. (1981). "The microbiology of raw milk. In *Dairy Microbiology*". Vol.1. Ed. Robinson R.K. Applied Science Pub. London
- 114) Sahiberg, A., Bergmark, A., Björck, L. 1984. "Intake of thiocyanate by way of milk and its possible effect on thyroid function." *The American Journal of Clinical Nutrition* 39:418-420.
- 115) Sahiberg, A., Bergmark, A., Björck, L. 1985. "Effect of thiocyanate levels in milk on thyroid function in iodine deficient subjects." *The American Journal of Clinical Nutrition* 41:1010-1014.
- 116) DeBeukelar, Cousin, M.A. 1977. "Modification of milk proteins by psychrotrophic bacteria." *Journal of Dairy Science*, vol.60. No.6:857-861.
- 117) F.A.O. 1980. "Manual de métodos de Análisis Químicos" Equipo Regional de Fomento y Capacitación en lechería para América Latina.
- 118) Deeth, H.C., Fitz-Gerald, G.H., Wood, A.P. 1978. "A convenient method for determining the extent of lipolysis in milk". *The Australian Journal of Dairy Technology* 9:109-111.
- 119) Deeth, H.C. and Tassin, A.Y. 1981. "Yogurt. Nutritive and Therapeutic Aspects. *Journal of Food Protection*. Vol 44. No. 1. pp 78-86.
- 120) Fitz-Gerald, G.H., Deeth, H.C. 1980. "Factors influencing lipolysis by skin cultures of some psychrotrophic microorganisms". *The Australian Journal of Dairy Technology* -september. pp. 97-103.
- 121) Foster, C.H., Nelson, F.E. et al. 1958. *Dairy Microbiology*. pp 222. Macmillan & Co. Ltd. London.
- 122) García-Baribay, H. "Yogurt. Aspectos microbiológicos y elaboración." *Tecnología de Alimentos (Mex)*, Vol.21, No. 4.
- 123) Hanes, M., North, E. 1984. "Survival of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus* in Commercial and Experimental Yogurts. *Journal of Food Protection*. Vol.47. No. 10 pp 781-785.
- 124) Jay, J.M. 1984. "Modern Food Microbiology". 3rd. Ed. Van Nostrand Reinhold Company" New York. pp. 370-374.

- 125) Klebenoff, B.J., Clem, W.H. 1966. "The peroxidase-thiocyanate-hydrogen peroxidase antimicrobial system." *Biochimica Biophysica Acta*, 117: 63-72.
- 126) Korhonen, H. 1980. "New method for preserving raw milk with the lactoperoxidase antibacterial system." *World Animal Review*, 29:33-39.
- 127) Kosikowski, F.V. 1982. "Cheese and fermented milk foods." E. Brothers, Inc. Michigan. E.U. 2a. ed.
- 128) Labropoulos, A.E., Palmer, J.K. 1982. "Flavor Evaluation and Characterization of Yogurt as affected by ultra-high temperature and vat processes." *Journal of Dairy Science* Vol. 65: 191-196.
- 129) Law, B.A. 1977. "Reviews of the progress of Dairy Science: Ecology of psychrotrophic bacteria and their effects on milk and milk products." *Journal of Dairy Research* vol. 46, 573-588.
- 130) Law, B.A., Hobbitt, L.A. 1983. "New methods for controlling the spoilage of milk and milk products." *Food Microbiology*, ISBN 0 12 509670 0. Society for applied Bacteriology.
- 131) Manning, B.J., Hursteh, H.E. 1988. "Flavour of milk and milk products". In: *Developments in Dairy Chemistry-3*. Ed. Fox, P.F. pp 217-238. Elsevier Applied Science Publishers Essex, England.
- 132) Marshall, M.E. 1962. "Relationship between the bacteriological quality of raw milk and the final products. A review of basic information and practical aspects." *Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte* 34 (1):149-157.
- 133) Berth, E.H. (editor) 1978. "Standard Methods for the examination of Dairy Products." American Public Health Association, Washington D.C.
- 134) Mendoca, P.G. 1985. "Efecto del sistema LP sobre la vida de anaquel de la leche pasteurizada". Tesis de maestría, Centro de Graduados I.T.V.
- 135) Nikolajcik, E.H. 1977. "Psychrotrophic bacteria and dairy product quality 1. Major organisms involved and defects produced." *Cultured Dairy Products Journal*, Vol.4, No.4:6-10
- 136) Nikolajcik, E.H. 1980. "Psychrotrophic bacteria and dairy product quality 2. Detection of problem organisms and their control." *Cultured Dairy Products Journal*, Vol.15 No.1:5-9

- 437) Oliveria, J.S., Pereslee, C.E. 1976. "Acid enumeration of psychrotrophic bacteria in raw milk and pasteurized milk." *Journal Milk Food Technology* 39 (4):269-272.
- 438) O'Mahary, H. 1966. "Sensory Evaluation of Food Statistical Methods and Procedures". pp. 164,303,314. Marcel Dekker, Inc. New York.
- 439) Montgomery D.C. 1984. "Design and Analysis of Experiments". 2e. ed. pp. 192-196. John Wiley and sons: New York.
- 440) Reiter, B., Fulford R. 1981. "An evaluation of the growth promoting effect of the lactoperoxidase system in newborn calves." *Animal Prod.* 32: 297-306.
- 441) Reiter, B., Harnuly, B.G. 1982. "The preservation of refrigerated and uncooled milk by its natural lactoperoxidase system". *Dairy Ind. Int.* Vol. 47 (8): 13.
- 442) Reiter, B., Harnuly, G. 1984. "Lactoperoxidase antibacterial system: Natural occurrence, biological functions and practical applications." *Journal Food Protection* 47(1):724-732.
- 443) Reiter, B. 1985. "The biological significance of the non-immunoglobulin protective proteins in milk: Lysozyme, Lactoferrin, Lactoperoxidase." In: *Developments in Dairy Chemistry-3*. Fed. P.F. Ed. pp. 281-336. Elsevier Applied Science Pub: Essex, England.
- 444) Sellers, R.L. 1981. "Fermented dairy Foods." *Journal of Dairy Science* vol. 64: 1070-1074.
- 445) Stanier, R.Y., Ingraham, J.L. et al. 1985. "General Microbiology 5 ed. pp. 441-443. Prentice-Hall: New Jersey.
- 446) Stone, H., Sidel, J. 1974. "Sensory Evaluation by Quantitative Descriptive Analysis." *Food Technology*, Nov-1974.
- 447) Swaisgood, H. 1985. "Characteristics of edible fluids of animal origins Milk. In: *Food Chemistry*. Fenness D. Ed. pp. 797-798, Marcel Dekker, Inc. New York.
- 448) Taine, A.V., Robinson, R.K. 1985. "Yogurt: Science and Technology" First edition. Pergamon Press, Great Britain.
- 449) Thomas, E.J., Aune, T.H. 1978. "Lactoperoxidase, peroxidase, thiocyanate antimicrobial systems: correlation of sulfhydryl oxidation with antimicrobial action." *Infection and Immunity*, May: 456-463.

- (50) Thomas, E.L., Bates, K.P. 1981. "Peroxidase antimicrobial system of human saliva. Requirements for accumulation of hypothyocyanite." *Journal of Dental Research*, April 1981.
- (51) Thomas, E.L. 1981. "Lactoperoxidase-catalysed oxidation of thiocyanate: equilibria between oxidized forms of SCN-." *Biochemistry* vol. 20: 3273-3280.
- (52) Yan, L., Langlois, B.E. 1983. "Effect of storage conditions of grade A raw milk on proteolysis and cheese yield". *Milchwissenschaft* 38 (12): 715-717.
- (53) Yan, L., Langlois, B.E. 1983. "Effect of raw milk storage on changes during storage of pasteurized milk". *Milchwissenschaft* 38 (11): 658-660.
- (54) Yufers, E.P. 1982. "Química Agrícola. III: Alimentos". Editorial Alhambra
- (55) Zell, R.R., Chen, J.H. 1983 "Effect of thiocyanate and hydrogen peroxid in cultured products." *Milchwissenschaft* 38 (5): 264-266
- (56) Zar, J.H. 1984. "Biostatistical Analysis" 2nd ed. pp. 126. Prentice Hall, Inc: New Jersey.
- (57) Bjorch, L., Rosen, G.B. 1978. "Antibacterial activity of the Lactoperoxidase System in milk against Pseudomonads and other Gram Negative bacteria". *Applied Microbiology* Vol.30 (2) pgs.199-204.

ANEXO I

DETERMINACION DEL ION TIOCIANATO

Método de Sorbo modificado (57)

A 10 ml de leche se añaden 10 ml de Ácido triciano esteico (TCA) al 20%, se agita y se deja reposar por 5 min. Se filtra a través de un papel Whatman No. 2 obteniéndose un filtrado que debe ser transparente. Se dete.se toman alícuotas de 1 ml y se les añade 5 ml de reactivo de Sorbo. Se deja reposar durante 4 minutos. Se lee la absorbencia a 460 nm. contra un blanco de reactivos que contiene 1 ml de agua destilada y 5 ml de reactivo de Sorbo.

La curva estándar se grafica por medio de concentraciones de 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1.0 mM/l de NaSCN.

Reactivo de Sorbo: 100 g de $\text{FeCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ en 200 ml de HNO_3 al 65%. Esto llevado a un litro con agua destilada.

DETERMINACION DE GRUPOS AMINO LIBRES

Método de Fielde modificado por Soadero (20)

Alicuotas de 2 ml de leche se tratan con 4 ml de ácido tricloroacético (TCA) 0.72 N, dejándolas reposar durante 30 min a 25°C. Se filtran a través de papel Whatman 81. Se toman volúmenes de 0.2 ml del sobrenadante y se mezclan con 2 ml de buffer de borato de potasio 1 M disuelto en NaOH 0.12 N (pH=9.2) y 1 ml de solución de ácido trinitrobenzoylónico (TNBS) 0.62%. Se mantienen en la oscuridad a 25°C durante 30 min.

Transcurrido este lapso, se adiciona 1 ml de fosfato monobásico de sodio 0.2 M conteniendo 10 mM de sulfito de sodio. Se agitan y centrifugan para eliminar turbidez (si la hubiera). Se lee absorbancia a 420 nm, transfiriéndose a microscios de grupos amino libres por ml de leche.

La curva estándar se grafica a partir de soluciones de cistina patrones de 2,4,6,8,10 y 12 mM.

DETERMINACION DE ACIDOS GRASOS LIBRES

Método de Deeth y Fitz-Gerald (18)

En un embudo de separación se colocan 4 ml de leche, 10 ml de sésia extractora y 4 ml de agua destilada. Se agita vigorosamente. Posteriormente se deja reposar hasta que se separen las dos capas. Se extrae la capa superior midiendo su volumen total. De éste se toman alícuotas de 2 ml y se transfieren a un matraz erlenmeyer de 50 ml, titulándose con KOH etanólica 0.005 N, usando como indicador fenolftaleína metálica. El contenido de ácidos grasos libres se obtiene mediante la siguiente fórmula:

$$\frac{T}{P} \frac{N}{V} (10^{-3})$$

donde:

T= ml gastados de KOH etanólica

N= normalidad de KOH etanólica

P= proporción de la capa titulada/ volumen total de la capa extraída.

V= volumen en ml. de leche

sésia extractora : isopropanol : éter de petróleo : H_2SO_4 4N

(40:10:1)