

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



**EVALUACIÓN DEL COMPORTAMIENTO CINÉTICO DEL *Bifidobacterium*
BB12, Y LA INFLUENCIA DEL pH Y ACIDEZ EN LAS CARACTERÍSTICAS
SENSORIALES DEL YOGURT PROBIÓTICO ENRIQUECIDO CON
SUCEDÁNEO DE LECHE DE QUINUA (*Chenopodium quinoa* Willd.).**

TESIS

PRESENTADA POR:

LYDA RACHEL YANA CONDORI

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

INGENIERO AGROINDUSTRIAL

PROMOCIÓN 2010

PUNO – PERÚ

2016

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

TESIS

EVALUACIÓN DEL COMPORTAMIENTO CINÉTICO DEL *Bifidobacterium* BB12, Y LA INFLUENCIA DEL pH Y ACIDEZ EN LAS CARACTERÍSTICAS SENSORIALES DEL YOGURT PROBIÓTICO ENRIQUECIDO CON SUCEDÁNEO DE LECHE DE QUINUA (*Chenopodium quinoa* Willd.).

PRESENTADA POR:

LYDA RACHEL YANA CONDORI
PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

INGENIERO AGROINDUSTRIAL

APROBADA POR EL JURADO REVISOR CONFORMADO POR:

PRESIDENTE

: 

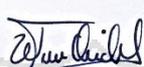
Ing. M.Sc. Genny Isabel LUNA MERCADO

PRIMER MIEMBRO

: 

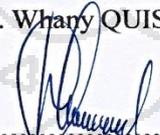
Ing. Saïre Roenfi GUERRA LIMA

SEGUNDO MIEMBRO

: 

Ing. Whany QUISPE CHAMBI

DIRECTOR DE TESIS

: 

Ing. M.Sc. Florentino V. CHOQUEHUANCA CÁCERES

ASESOR DE TESIS

:

Ing. M.Sc. Thomas ANCCO VIZCARRA

PUNO – PERÚ

2016

Área: Ingeniería y tecnología

Tema: Desarrollo de procesos y productos agroindustriales sostenibles y eficientes

DEDICATORIA

A mis queridos padres con cariño Andrés A.

*Yana Q. y Griselda Condori L.; a mis
hermanas Bony y Yois; A ellos mi eterna
gratitud.*

AGRADECIMIENTOS

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

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

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

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

A mis padres y hermanas por su incondicional apoyo y cariño durante la ejecución del presente trabajo de investigación y toda mi vida.

Finalmente mi eterno agradecimiento a Edwin y Jesús por motivarme, apoyarme en todo momento de mi vida.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE TABLAS

ÍNDICE DE FIGURAS

ÍNDICE DE ANEXOS

I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	4
2.1. ALIMENTOS FUNCIONALES	4
2.2. YOGUR	6
2.2.1. Características Físicoquímicas y Sensoriales del Yogur	6
2.2.2. Factores que Afectan a las Propiedades del Yogur	9
2.3. PROBIÓTICOS	11
2.3.1. Microbiota del Tracto Gastrointestinal	12
2.3.2. Seguridad de los Probióticos	14
2.4. QUINUA	26
2.4.1. Descripción	27
2.4.2. Valor Nutritivo	28
2.4.3. Proceso de Transformación de la Quinua	30
2.5. MICROBIOLOGÍA PREDICTIVA	33
2.5.1. Modelos Matemáticos Predictivos	34
2.5.2. Construcción del Modelo	36
2.5.3. Descripción Matemática del Modelo	38
2.6. CRECIMIENTO MICROBIANO	39
2.6.1. Fase de Crecimiento	39
2.6.2. Parámetros cinéticos del Crecimiento Microbiano	40
III. MATERIALES Y MÉTODOS	45
3.1. LUGAR DE EJECUCIÓN	45
3.2. MATERIAL EXPERIMENTAL	45
3.3. MATERIALES Y EQUIPOS	45
3.3.1. Materiales	45
3.3.2. Equipos de Laboratorio	46
3.3.3. Reactivos	46
3.3.4. Medio de Cultivo	46

3.4. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	46
3.4.1. Descripción del Proceso Experimental	48
3.5. MÉTODO DE ANÁLISIS	51
3.5.1. Método para el Análisis Microbiológico	51
3.5.2. Método para el análisis Físicoquímico	52
3.6. UNIDADES DE ANÁLISIS Y OBSERVACIONES	54
3.6.1. Factores de Estudio	54
3.6.2. Factores de Respuesta	54
3.7. DISEÑO DE INVESTIGACIÓN	55
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	56
V. CONCLUSIONES	74
VI. RECOMENDACIONES	75
VII. BIBLIOGRAFÍA	76

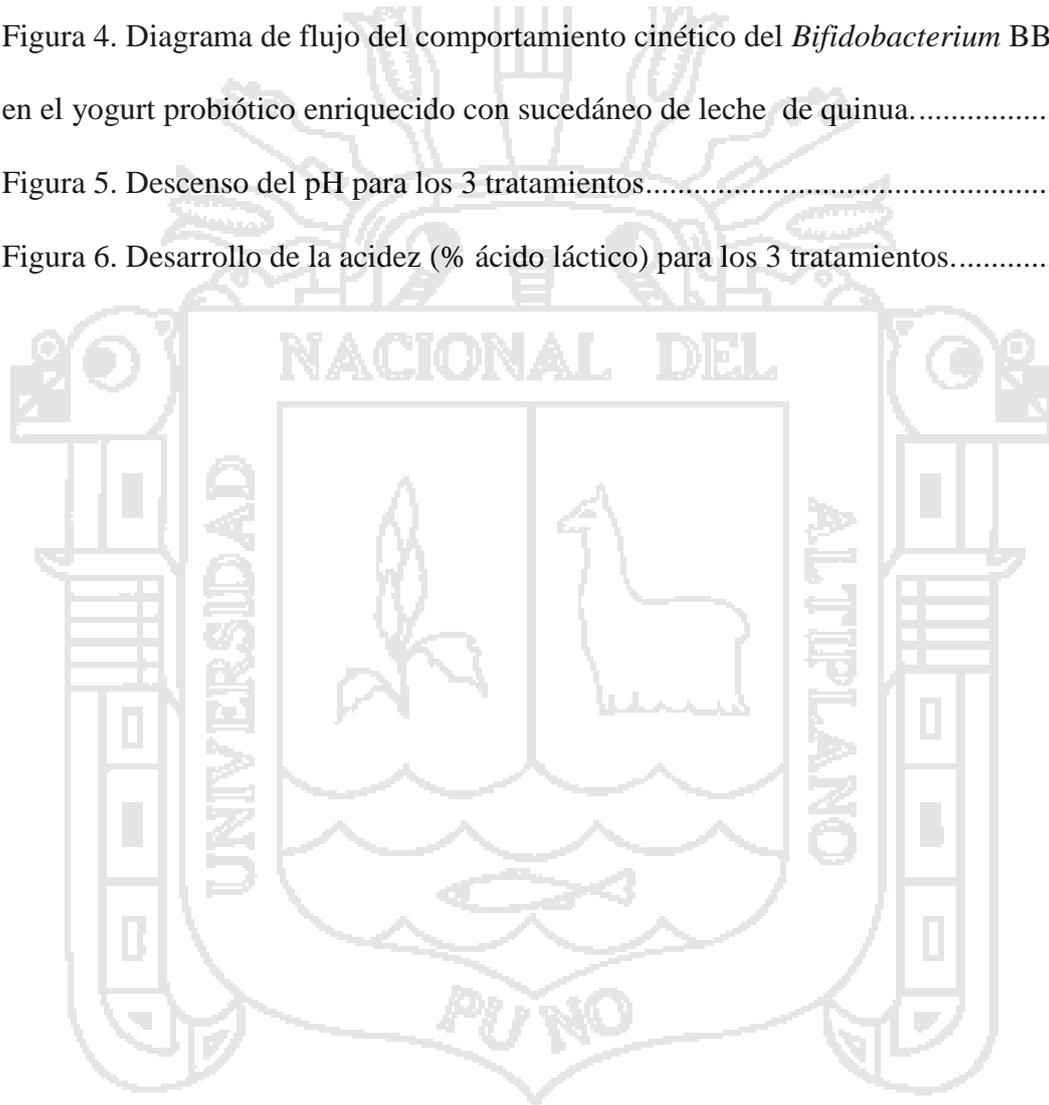


ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Modificaciones hechas a los alimentos para convertirlos en alimentos funcionales.	5
Tabla 2. La lista actual de especies incluidas dentro del género <i>Bifidobacterium</i>	22
Tabla 3. Valor Nutritivo en Variedades de Quinua.	29
Tabla 4. Tiempo de Adaptación (λ) del <i>Bifidobacterium</i>	56
Tabla 5. Análisis de Varianza (ANVA) del tiempo de adaptación (λ) del <i>Bifidobacterium</i>	57
Tabla 6. Análisis de Varianza (ANVA) para el tiempo de generación (T_g) del <i>Bifidobacterium</i>	60
Tabla 7. Análisis de Varianza (ANVA) para Velocidad Máxima de Crecimiento ($\mu_{m\acute{a}x}$) del <i>Bifidobacterium</i>	62
Tabla 8. Análisis de varianza (ANVA) para la variación de pH.	64
Tabla 9. Análisis de varianza (ANVA) para la variación de acidez.	67
Tabla 10. Prueba de comparación múltiple de Tukey del Sabor	69
Tabla 11. Análisis de varianza (ANVA) para la variación del sabor.	70
Tabla 12. Prueba de comparación múltiple de Tukey del Aroma	71
Tabla 13. Análisis de varianza (ANVA) para la variación del aroma.	72
Tabla 14. Acidez	73
Tabla 15. Análisis de varianza (ANVA) para la variación de la acidez.	73

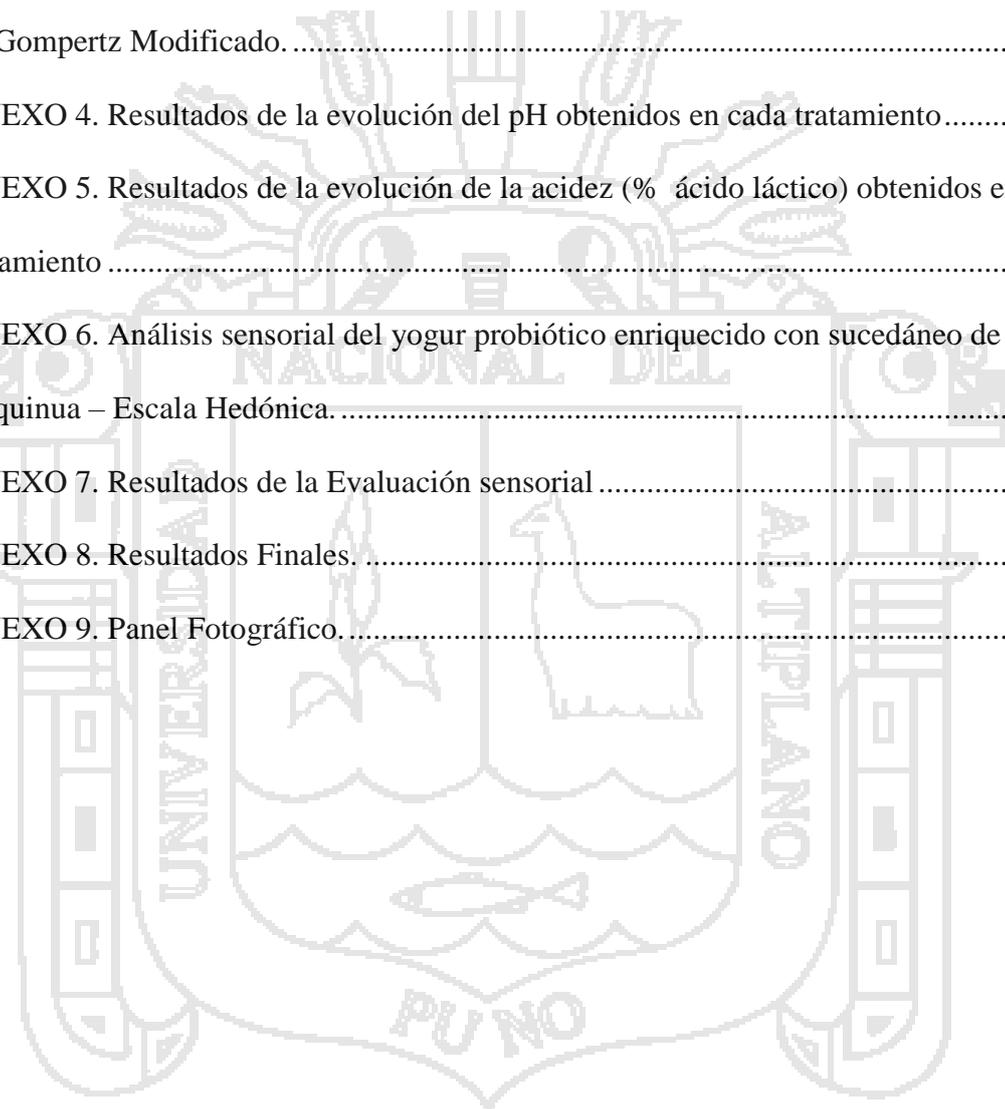
ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Morfología del género <i>Bifidobacterium</i>	24
Figura 2. Diagrama de flujo del Proceso de Elaboración del Sucedáneo de leche a partir de quinua.....	33
Figura 3. Gráfica del Modelo de Gompertz (Cabeza, 2013)	35
Figura 4. Diagrama de flujo del comportamiento cinético del <i>Bifidobacterium</i> BB-12, en el yogurt probiótico enriquecido con sucedáneo de leche de quinua.....	47
Figura 5. Descenso del pH para los 3 tratamientos.....	65
Figura 6. Desarrollo de la acidez (% ácido láctico) para los 3 tratamientos.....	68



ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO 1. Parámetros ajustados por el Modelo de Gompertz modificado para <i>Bifidobacterium</i> BB12.	89
ANEXO 2. Parámetros de crecimiento cinético del <i>Bifidobacterium</i> BB12.	89
ANEXO 3. Curvas de crecimiento del <i>Bifidobacterium</i> BB12 ajustadas por el Modelo de Gompertz Modificado.	90
ANEXO 4. Resultados de la evolución del pH obtenidos en cada tratamiento.	92
ANEXO 5. Resultados de la evolución de la acidez (% ácido láctico) obtenidos en cada tratamiento.	93
ANEXO 6. Análisis sensorial del yogur probiótico enriquecido con sucedáneo de leche de quinua – Escala Hedónica.	94
ANEXO 7. Resultados de la Evaluación sensorial.	95
ANEXO 8. Resultados Finales.	96
ANEXO 9. Panel Fotográfico.	97



ACRÓNIMOS

μ	: Velocidad de Crecimiento
$\mu_{\text{máx}}$: Velocidad Máxima de Crecimiento
ANVA	: Análisis de Varianza
BAL	: Bacterias ácidolácticas
BB-12	: <i>Bifidobacterium</i>
DCA	: Diseño Completo al Azar
FAO	: Organización para la Agricultura y Alimentación
LA-5	: <i>Lactobacillus acidophilus</i>
Lb	: Lactobacillus
MRS	: Man Rugosa Sharpe
NTP	: Norma Técnica Peruana
OMS	: Organización Mundial de la Salud
pH	: Potencial de hidrogeno
PMP	: Patogen Modelling Program
RTP	: Recuento Total en Placa
T_g	: Tiempo de generación
TGI	: Tracto Gastrointestinal
UFC	: Unidad Formadora de Colonia
USDA	: United States Departament of Agriculture
λ	: Tiempo de adaptación

RESUMEN

El trabajo de investigación se realizó en la Universidad Nacional del Altiplano Puno, ubicada a 3827 msnm. en el Laboratorio de Microbiología Agroindustrial de la Escuela Profesional de Ingeniería Agroindustrial. Las materias primas que se utilizaron fueron: leche entera fresca adquirida del Distrito de Paucarcolla (densidad de $1,029\text{g/cm}^3$, grasa 5,02%, acidez 0,16% de ácido láctico y pH 6,7); y Quinoa Variedad Chullpi que se adquirió de la Asociación de Productores Agroindustriales del Distrito de Cabana. El objetivo fue evaluar el comportamiento cinético del *Bifidobacterium* BB12, y la influencia del pH y acidez en las características sensoriales del yogurt probiótico enriquecido con sucedáneo de leche de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd). Para ello se planteó 3 tratamientos con niveles de sustitución de sucedáneo de leche de quinua, T1 = 0%, T2 = 15% y T3 = 20%. Sometiéndose a la leche entera fresca a incubación a 42°C por 6 horas; determinándose las UFC/ml, pH y acidez titulable. Con los resultados de crecimiento cinético del *Bifidobacterium*, se graficó la curva de crecimiento y se ajustó los parámetros cinéticos de crecimiento mediante el modelo matemático de Gompertz Modificado; el tiempo de adaptación (λ) es influido por el nivel de sustitución, el *Bifidobacterium* demora en adaptarse al medio; el tiempo de generación (T_g) es influido por el nivel de sustitución y el pH, el *Bifidobacterium* se reproduce en menos tiempo que otros microorganismos; mientras que en la velocidad máxima de crecimiento ($\mu_{\text{máx}}$) a medida que aumenta el nivel de sustitución su valor se incrementa. En cuanto al pH, fue influenciada por el nivel de sustitución, se obtuvieron valores de 4,63; 4,88 y 5,33; y la acidez mostró un mejor valor en el tratamiento 2 con 1,0 % de ácido láctico estando entre el rango permitido. Para el análisis sensorial sabor, aroma y acidez, el mejor tratamiento aceptado fue el 2 seguido del 1 y 3. Por ultimo mencionamos que los tratamientos 1 y 2 se considera como probióticos, porque

contienen una población de $>10^7$ UFC/ml de *Bifidobacterium*, según recomienda el Codex Alimentarius

Palabras clave: *Chenopodium quinoa* Willd, probiótico, yogurt, *Bifidobacterium*, pH, acidez, tiempo de adaptación, tiempo de generación, velocidad máxima de crecimiento.



I. INTRODUCCIÓN

Un yogur probiótico es aquel que contiene suficiente cantidad de microorganismos viables que producirán beneficio más allá de los valores nutricionales al ser ingeridos porque afectan beneficiosamente a una o varias funciones del organismo proporcionando un mejor estado de salud y bienestar y/o reducen el riesgo de enfermedad. El consumo de yogurt aumenta cada día más a nivel mundial, debido a sus propiedades nutricionales. El yogurt se digiere mejor que la leche ya que ayuda a asimilar los nutrientes, y constituye uno de los principales vehículos para el aporte de probióticos (Mani, 2005).

La Organización de las Naciones Unidas para los Alimentos y la Agricultura (FAO) afirma que los cultivos probióticos pretenden ayudar a la flora intestinal del cuerpo humano a restablecerse por sí misma y además se comenta que los probióticos estimulan el buen funcionamiento del sistema inmune. “La lógica de los probióticos es que el cuerpo contiene una ecología microbiana con una gran variedad de especies de bacterias. El balance de estas bacterias se pierde por varias circunstancias que incluyen el uso de antibióticos u otras drogas, exceso de alcohol, estrés, enfermedades o exposición a sustancias tóxicas. En estos casos, las bacterias que viven en simbiosis con el cuerpo humano decaen, lo cual permite que los competidores patógenos ataquen y deterioren la salud” (FAO, 2005).

La bacteria *Bifidobacterium* se encuentra de forma natural en el tracto gastrointestinal humano y en ciertas leches fermentadas tradicionales. Estas bacterias son resistentes al ácido y a la bilis y cuando se ingieren, son capaces de sobrevivir al tránsito a lo largo del tracto gastrointestinal. Las bifidobacterias se consideran como

probióticos debido a que su consumo en ciertas cantidades puede ejercer diversos beneficios sobre la salud (Villalobos, 2005).

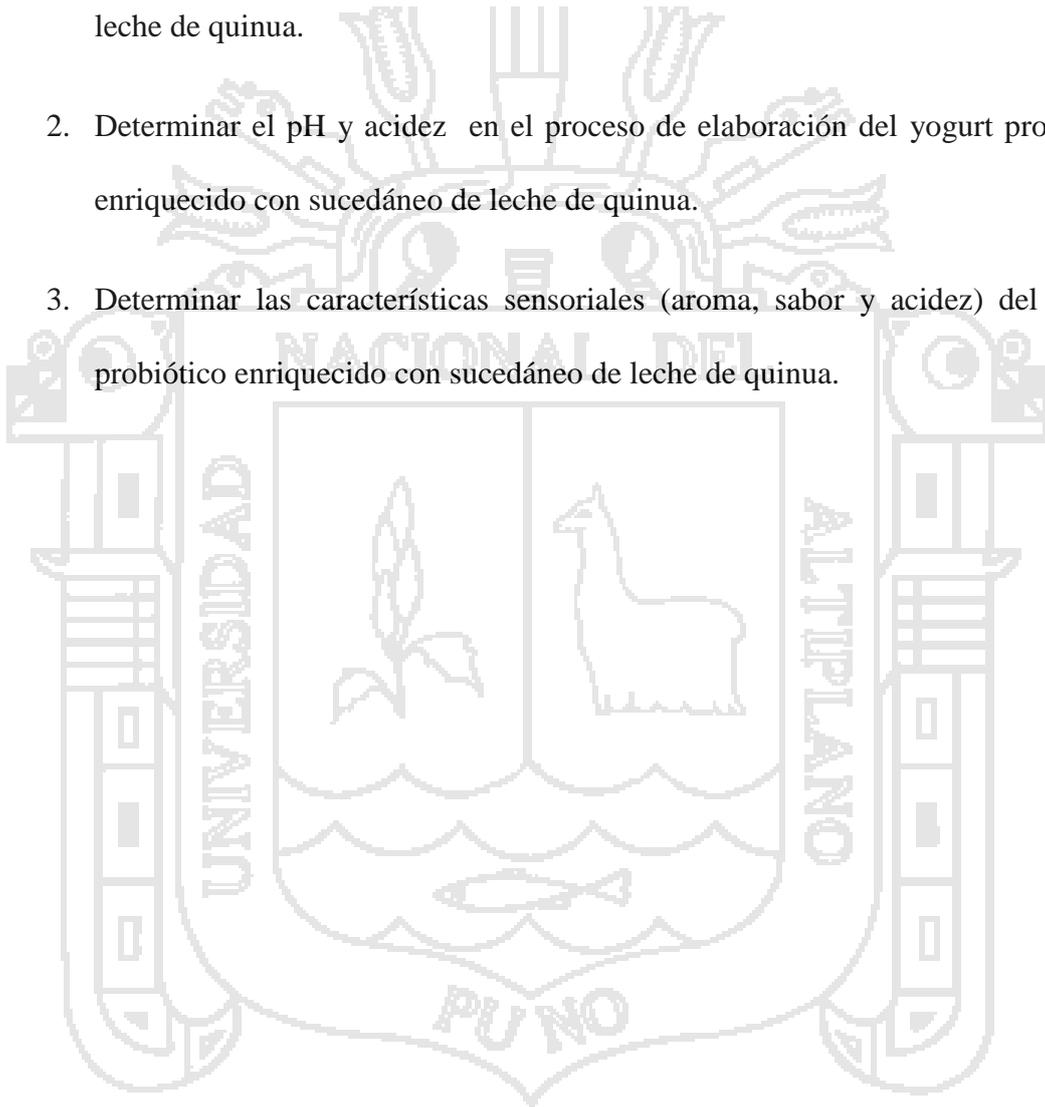
Según Chr. Hansen (2004), los probióticos *Bifidobacterium* (BB-12) y *Lactobacillus acidophilus* (LA-5) son principalmente utilizados en la producción de productos lácteos probióticos y normalmente se utilizan en combinación con otras cepas probióticas o cultivos de yogur. “Los cultivos liofilizados BB-12 y LA-5 son muy estables y tienen una alta resistencia frente a los ácidos en los productos lácteos fermentados” (Chr. Hansen, 2004).

El consumo de quinua se está convirtiendo cada vez más popular entre las personas interesadas en la mejora y el mantenimiento de su estado de salud mediante el cambio de los hábitos alimentarios, ya que es un excelente ejemplo de "alimento funcional", que contribuye a reducir el riesgo de varias enfermedades y/o ejerciendo promoción de la salud (Vasconcelos, 2000). La quinua por ser un grano altamente nutritivo y tener enorme potencialidad de uso en la agroindustria es necesario transformarla, lo cual permite un mejor aprovechamiento de sus cualidades nutritivas, facilidad de preparación y mejor presentación. Este alimento, por sus características nutricionales superiores, puede ser muy útil en las etapas de desarrollo y crecimiento del organismo. Además es fácil de digerir, no contiene colesterol y se presta para la preparación de dietas completas y equilibradas (Mujica *et al.*, 2006).

La quinua también puede ser consumida en combinación con productos lácteos y utilizada tanto en las dietas comunes como en la alimentación vegetariana, así como para dietas especiales de determinados consumidores como adultos mayores, niños, deportistas de alto rendimiento, diabéticos, celíacos y personas intolerantes a la lactosa. El propósito de este trabajo fue desarrollar un yogur probiótico enriquecida con

sucedáneo de leche de quinua utilizando una mezcla comercial de BAL y una bacteria probiótica. Por tal razón se plantearon los siguientes objetivos:

1. Determinar el tiempo de adaptación (λ), velocidad máxima de crecimiento ($\mu_{\text{máx}}$) y tiempo de generación (T_g) del *Bifidobacterium* BB12 en el proceso de elaboración del yogurt probiótico a diferentes sustituciones con sucedáneo de leche de quinua.
2. Determinar el pH y acidez en el proceso de elaboración del yogurt probiótico enriquecido con sucedáneo de leche de quinua.
3. Determinar las características sensoriales (aroma, sabor y acidez) del yogurt probiótico enriquecido con sucedáneo de leche de quinua.



II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. ALIMENTOS FUNCIONALES

En los años recientes, una categoría llamada “alimentos funcionales” ha aparecido en el mercado, y sus ventas han crecido exponencialmente (Chassy *et al.*, 2006); lo anterior es consecuencia del creciente interés del ser humano por obtener dietas óptimas para mantener una buena salud, por extender los años de vida, la desconfianza hacia los alimentos procesados y el aumento en el mercados de los alimentos naturales; dicha influencia ha provocado un estado de revolución tecno-científica para los alimentos funcionales, algunos de los factores que han contribuido a la presente revolución de la dieta y al interés en los alimentos funcionales son (Vasconcelos 2000):

1. La evidencia en el mantenimiento de la salud y la concurrencia de las enfermedades.
2. El papel de la dieta en la mayoría de las causas de muerte incluyendo: enfermedades del corazón, cáncer, derrame cerebral, diabetes, arterosclerosis, enfermedades hepáticas y otras enfermedades no fatales, las cuales también resultan de una dieta inadecuada y pueden causar problemas de discapacidad temporal.

Debido a esto es importante conocer los beneficios y tener claro el significado de este tipo de alimentos que son definidos como aquellos a los cuales se les adicionan ingredientes que proporcionan beneficios a la salud de los consumidores además de los que proporcionan los alimentos por sí mismos.

Los alimentos funcionales han sido asociados con la prevención y/o tratamiento de por lo menos cuatro de las principales causas de muerte en los Estados Unidos: cáncer, diabetes, enfermedades cardiovasculares e hipertensión (Chassy *et al.*, 2006).

Los procesos de transformación que se le pueden aplicar a un alimento con la finalidad de volverlo un alimento funcional, las cuales se mencionan en la Tabla 1.

Tabla 1. Modificaciones hechas a los alimentos para convertirlos en alimentos funcionales.

Modificaciones del alimento	Ejemplos de posible funcionalidad
Adición de péptidos bioactivos	Mejora las funciones inmunológicas y mejora la biodisponibilidad de los minerales
Adición de fibra dietética	Prevención del estreñimiento, disminución del riesgo de cáncer de colon, disminución de colesterol en la sangre.
Adición de ácidos grasos poliinsaturados Ω -3	Disminución del riesgo de ataque cardiaco y de algunos cánceres, mejoramiento del sistema inmunológico.
Adición de probióticos	Mejoramiento de la función gastrointestinal, del sistema inmunológico, y disminución del riesgo de cáncer de colon.
Adición de prebióticos	Mejoramiento de la función gastrointestinal, mejoramiento del sistema inmunológico, disminución del riesgo de cáncer de colon.

Adaptada de Berner y O'Donnerll (Shah, 2001)

2.2. YOGUR

Se entiende por yogur al producto lácteo coagulado, obtenido a través de la fermentación láctica por acción de las bacterias *Lactobacillus delbruekii* subsp. *bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus* de la leche concentrada. La proporción entre ambos gérmenes influye también de una manera esencial sobre la aromatización del yogurt. El *Lactobacillus bulgaricus* es el principal productor de aroma y contribuye a la hidrólisis de la materia grasa de la leche liberando ácidos grasos (por ejemplo capríco, caprílico y caproico) y puede producir cantidades considerables de acetaldehídos. La coagulación de la leche se produce cuando esta ha alcanzado el punto isoeléctrico. El yogurt se elabora a partir de leche entera o descremada y a este producto también se le conoce como leche cuajada búlgara. La leche más apropiada para elaborar yogurt es la que posee un elevado contenido de proteínas (Tello *et al.*, 2006).

Según la Norma Técnica Peruana (202.092:2008 Leche y productos lácteos. Yogurt. Requisitos). Aplica las siguientes definiciones:

Yogurt: El producto obtenido por fermentación láctica mediante, la acción de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* a partir de leche pasteurizada y/o productos obtenidos de la leche con o sin modificaciones en su composición, pasteurizados; pudiéndose o no agregarse otros cultivos de bacterias adecuadas productoras de ácido láctico, además de los cultivos esenciales. Estos cultivos de microorganismos serán viables, activos y abundantes en el producto, hasta la fecha de duración mínima. Si el yogurt es tratado térmicamente luego de la fermentación, no se aplica el requisito de microorganismos viables.

2.2.1. Características Físicoquímicas y Sensoriales del Yogur

2.2.1.1. Densidad

La densidad de los productos lácteos se encuentra entre 1.028 – 1.032g/cm³ (Harper y Hall, 1981).

La densidad es un parámetro que permanece constante durante toda vida útil del yogurt, de acuerdo a lo reportado por (Del Fabbro 2001), (Alatraste 2002), (Díaz 2002) y (Apórtela 2003), razón por la cual la densidad solo se determinó al tiempo cero. Los valores de la densidad obtenidas fueron del rango 1000 a 1050kg/m³.

2.2.1.2. pH

El valor del pH es una medida de la acidez o alcalinidad de una sustancia (es la medida de la concentraciones de iones de hidrogeno presentes). Los valores de pH se presentan en una escala que se va de 1-14, donde el valor 7, es para productos neutros como el agua, por arriba de este valor son producto básicos y por debajo son ácidos, como es el caso del yogurt. La leche tiene un valor de pH entre 6,5-6,7 (Tamine y Robinson, 1991). Los valores de pH de un yogurt están en un rango de 4,0-4,5 (Teuber, 1995) y (Méndez, 2000), pero (Oberam, 1985), menciona que este valor está entre 4,2-4,3 y (Meyer y Marcos, 1982) mencionan que estos valores debe ser de 3,7 a 4,5 momento en el cual se produce el acetaldehído, sustancia que le confiere al yogur su sabor característico.

El pH del yogurt es una de las propiedades principales, debido a que en su elaboración se busca disminuir el pH de la leche (6,5-6,7) y llegar al pH del yogurt lo cual contribuye al olor y sabor característico (Illescas, 2001) y (Amiot, 1991).

2.2.1.3. Ácido Láctico

El aumento de la acidez del yogurt por la producción de ácido láctico ocasiona la coagulación de la caseína, además afecta la textura y el sabor en el producto (Fennema, 1993).

La acidez de un yogurt debe oscilar entre 0,8-1,8% de ácido láctico (Ankenman, 1996), pero (Fennema, 1993) menciona que la acidez se encuentra entre el 0,6 – 1,5 % ácido

láctico. El porcentaje de ácido láctico adecuado es extremadamente importante para obtener un yogurt de alta calidad con sabor propio, cuerpo y textura propia, esto es para que el producto tenga el mínimo porcentaje de sinéresis durante el almacenamiento

La formación de ácido láctico hasta alcanzar concentraciones más o menos superiores a las que determinan la coagulación, se controla en función al tipo de yogurt, este debe tener un mínimo de 0,7 g de ácido láctico por cada 100g de yogurt, por tanto la determinación de acidez es un parámetro importante para su producción. La actividad metabólica de los microorganismos del yogurt está dada por la velocidad de crecimiento y el desarrollo de la acidez, de ahí la importancia de determinar y dar seguimiento a la acidez desarrollada durante la elaboración del yogurt. La acidez puede expresarse en distintos grados, pero el más común es el grado Dornic (°D); cada grado Dornic equivale a un decigramo de ácido láctico por litro; es decir si una leche tuviera 17 grados Dornic, su acidez será de 1.7 gramos de ácido láctico por litro (Gómez, 1999)

2.2.1.4. Humedad

La humedad es la cantidad de agua presente en el alimento, el conocer la cantidad de agua del alimento que se encuentra libre, ayuda a prevenir algunas reacciones de crecimiento microbiano indeseable. El contenido de humedad del yogurt es de 87,8% según (Gambelli et al, 1999), pero su valor depende del tipo de leche y sólidos solubles en ella.

2.2.1.5. Formación del Sabor y Aroma

La formación de ácido láctico a partir del metabolismo de las bacterias lácticas proporciona a las leches fermentadas un sabor ligero y finalmente la producción de acetaldehído y de diacetilo da el aroma característico del yogurt. El sabor ácido característico del yogurt es causado principalmente por la formación de ácido láctico, originado por las bacterias ácido lácticas que atacan a la lactosa (Gomez, 1999).

2.2.2. Factores que Afectan a las Propiedades del Yogur

2.2.2.1. Efecto sobre las Proteínas de la Leche

Según Tamime y Robinson (1991) las proteínas de la leche (la caseína y las proteínas del lactosuero) pueden experimentar una o varias de las siguientes modificaciones:

- Desnaturalización de las proteínas del lactosuero
- Interacciones entre la caseína y las proteínas del lactosuero como resultado de la desnaturalización de las últimas y/o de una modificación del equilibrio salino.
- Producción de compuesto sulfhidrilo a partir de las proteínas del lactosuero desnaturalizadas.

2.2.2.2. Tratamiento Térmico de la Leche

Según Tamime y Robinson (1991) el calentamiento de la leche por ebullición ha sido utilizado en el proceso de elaboración de yogurt como método para conseguir incrementar la concentración de extracto seco lácteo en la mezcla base, los efectos del tratamiento térmico se pueden resumir fundamentalmente en los siguientes:

- Destrucción y/o eliminación de microorganismos patógenos y otros microorganismos indeseables.
- Producción de factores estimulantes o inhibidores de los cultivos estarter del yogurt.
- Cambios de la propiedades físico químicas de los componentes de la leche.

2.2.2.3. Homogenización

Los glóbulos grasos naturales de la leche tienen un efecto muy pequeño sobre la textura del yogurt, pero la homogenización influye favorablemente. Por un lado se produce la incorporación mecánica de los pequeños glóbulos grasos dentro de la estructura del coagulo y por otro la incorporación de la caseína en la superficie de los nuevos glóbulos hace que actúe como grandes partículas de casina, lo que implica que

la concentración efectiva de superficie de caseína se ve incrementada contribuyendo a la formación de un gel más consistente (Mestres y Del Castillo, 2004).

2.2.2.4. pH – Acidez

El $\text{pH} > 4,6$ influye desfavorablemente en la consistencia. Un pH de 4,6 o inferior contribuye a la hidratación de las proteínas y por tanto a la consistencia del yogurt, pero una acidez demasiado elevada, $\text{pH} < 4,0$ favorece la concentración del coagulo, lo que se traduce en un aumento de la sinéresis (Spreer, 1991).

2.2.2.5. Efecto de la adición de azúcar

La principal finalidad de la adición de azúcar o edulcorantes es atenuar la acidez del producto. La cantidad de azúcar o edulcorante añadido depende de (Gomez, 199):

- El tipo de azúcar o tipo edulcorante;
- Preferencia del consumidor;
- La fruta utilizada.;
- Efectos inhibidores sobre los microorganismos en el cultivo de yogurt;
- las limitaciones legales;
- Consideraciones económicas.

El yogurt de frutas y el yogurt aromatizado contienen en promedio hasta un 20% de carbohidratos, los cuales proceden de (Gomez, 1999):

- La leche (lactosa, galactosa, glucosa), cuya concentración varía en función del extracto seco de la mezcla base y del método empleado para lograr el incremento del mismo.
- Los azúcares presentes en las frutas añadidas (sacarosa, fructosa, glucosa y maltosa).
- Los azucares añadidos al yogurt o de las mezclas de las frutas.

2.3. PROBIÓTICOS

El término probiótico se popularizó por Fuller en 1992, y fue definido más recientemente por un experto como “microorganismo viviente que por medio de la ingestión de un determinado número, proporciona beneficios a la salud inherente a la nutrición general” y “probiótico es un suplemento microbiano vivo que afecta de manera benéfica al huésped, mejorando el balance microbiano intestinal” (Ouwehand *et al.*, (2002), mencionada por Vásquez, 2008).

La FAO define los probióticos como: "microorganismos vivos que ejercen una acción benéfica sobre la salud del huésped al ser administrados en cantidades adecuadas". Los alimentos probióticos poseen niveles importantes de estas bacterias las cuales producen una serie de componentes biológicamente activos que ofrecen efectos fisiológicos deseables más allá de sus efectos nutricionales (Taranto, 2005).

Según Rasic (1993), para que un individuo obtenga efectos beneficiosos al ingerir estas bacterias se requiere un número muy alto de células viables (10^7 - 10^9 / día).

Las bacterias probióticas, tanto autóctonas como las aportadas al organismo mediante la alimentación pueden controlar la instauración y/o el desarrollo de diversos microorganismos patógenos, entre los que destacan *Salmonella Typhimurium*, *Shigella spp.*, *Clostridium difficile*, *Campylobacter jejuni* y *Escherichia coli*, y también proporcionan una protección importante frente a patógenos urogenitales como *Gardnerella vaginalis*, *Bacteroides bivius*, *Candida albicans* y *Chlamydia trachomatis* (Hilton *et al.*, 1995).

2.3.1. Microbiota del Tracto Gastrointestinal

El tracto gastrointestinal es un ecosistema complejo en el cual coexisten e interaccionan permanentemente tres componentes principales: las células del huésped (muchas de ellas con capacidad inmunológica), los nutrientes y los microorganismos, indígenas (microbiota) y los que provienen de la dieta.

La microbiota intestinal es un conjunto diverso y dinámico compuesto por microorganismos que se han adaptado a vivir en la superficie de la mucosa intestinal o dentro de la luz intestinal. El estómago y el duodeno alojan números muy bajos de microorganismos: $<10^3$ UFC por gramo de contenido. *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Candida albicans* y *Helicobacter pylori* son los microorganismos comúnmente encontrados en el estómago y el duodeno. Las secreciones ácidas, biliares, y pancreáticas inhiben a la mayoría de los microorganismos ingeridos. En yeyuno e íleon el número de bacterias aumenta progresivamente desde aproximadamente 10^4 células en el yeyuno hasta 10^7 células por gramo de contenido en el íleon distal. La microbiota que se encuentra en el yeyuno está constituida por *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *C. albicans* y *Bacteroides* mientras que en el íleon están presentes *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Bacteroides*, *Veillonella*, *Clostridium* y enterobacterias. El intestino grueso, en cambio, se encuentra densamente poblado por microorganismos anaerobios: aprox. 10^{12} UFC por gramo de contenido intestinal. Los microorganismos encontrados son *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Clostridium*, *Ruminococcus*, *Peptostreptococcus*, *Fusobacterium*, *Eubacterium*, *Bacillus*, *Streptococcus* y *Enterococcus*. Tannis (2008) mencionada por Burns (2010).

La composición de la microbiota, así como las interacciones entre sus componentes y con la mucosa intestinal, condicionan tanto los estados de salud como de enfermedad.

Entre ellos, los probióticos son microorganismos implicados en el mantenimiento o mejora de la salud del TGI por ser, en su mayoría, habitantes naturales de este nicho con funciones fisiológicas exclusivamente benéficas en él. El equilibrio entre las diferentes poblaciones microbianas es dinámico y se modifica por factores tales como la edad del individuo, el estrés, su estado de salud, la dieta, la administración de antibióticos o las terapias con rayos (Montalto *et al.*, 2009 mencionado por Burns, 2010).

Collado y Sanz (2007); Ventura *et al.* (2007) mencionan que durante el tránsito en el tracto gastrointestinal las bifidobacterias deben sobrevivir a las condiciones extremas de acidez en el estómago y a la inmediata presencia de sales biliares del duodeno para asegurar su funcionalidad. Las bifidobacterias resisten a altas concentraciones de acidez (Arenas, 2012).

2.3.1.1. Capacidad de Adhesión y Colonización Transitoria del TGI

Algunos de los efectos benéficos de los microorganismos probióticos sobre la salud del consumidor están relacionados a la capacidad de los mismos de adherirse a la mucosa intestinal. La adhesión es un pre requisito para colonizar el intestino, estimular el sistema inmune y para ejercer actividades antagonistas contra microorganismos entero patógenos a través de la exclusión competitiva. Aunque en la actualidad se conoce que la colonización del intestino es solamente transitoria y no permanente (Gardiner *et al.*, 1999, Ohashi *et al.*, 2004) ni siquiera es posible una colonización permanente en neonatos donde la falta de una microbiota instalada y madura podría hacer pensar en la posibilidad de una intervención con probióticos para lograr una colonización permanente (Gueimonde *et al.*, 2006).

Actividad Antimicrobiana

En el complejo ecosistema gastrointestinal, los probióticos han desarrollado mecanismos para competir y sobrevivir frente a otros microorganismos. En general, la actividad antagonista se produce a través de la competencia por nutrientes y por espacio físico, pero también a través de la producción de sustancias antimicrobianas tales como

ácidos orgánicos, etanol, H₂O₂ y componentes tipo bacteriocina. No obstante, queda por dilucidar cuan metabólicamente activos están los probióticos durante el tránsito gastrointestinal para que realmente puedan sintetizar y excretar los compuestos antimicrobianos (Oozeer *et al.*, 2004).

2.3.2. Seguridad de los Probióticos

Un aspecto fundamental en la elección de un probiótico es el nivel de seguridad de la cepa. Las cepas más utilizadas pertenecen generalmente a los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, que han sido catalogados como microorganismos seguros en la fermentación de los alimentos (Salminen *et al.*, 2004). Aunque teóricamente el uso en de estos microorganismos podría tener efectos colaterales, los casos que relacionan infecciones sistémicas y consumo de probióticos son muy escasos y todos se han detectado en pacientes inmunodeprimidos (Antony *et al.*, 1996; Sanz *et al.*, 2003; Salminen *et al.*, 2004; Cannon *et al.*, 2005; Salvana y Frank, 2006).

Características Generales de Probióticos en Productos Lácteos

En el American Journal of Clinical Nutrition, Heller (2006), en su artículo titulado: “Probiotic bacteria in fermented foods: product characteristics and starter organisms” – “Bacterias Probiótica en alimentos Fermentados”, afirma que aparte de los beneficios de salud provistos por los probióticos y la esperada supervivencia a través de tracto digestivo, es importante que no tengan efectos adversos en el sabor, textura o aroma de los productos finales. Además no deben intensificar la acidez a través de la vida útil del producto. Heller (2006), continúa mencionando que los microorganismos vivos interactúan activamente con su ambiente intercambiando componentes del medio por productos de su metabolismo, por tanto, a composición química que los lácteos es de

alta importancia en las características de los productos finales debido a las propiedades proteolíticas y lipolíticas de los probióticos, las cuales pueden afectar considerablemente el sabor de los productos lácteos.

El control de calidad de los productos lácteos con bacterias vivas se ha hecho tradicionalmente basado en evaluación sensorial y en la determinación de ciertos parámetros con valores conocidos (Kneifel *et al.*, 1992). Harper (1991) en su estudio “Sensory Ratings of Commercial Plain Yogurts by Consumer and Descriptive Panels”, demuestra que los atributos de acidez, dulzura y apariencia son los descriptores de mayor relevancia en la aceptación de los consumidores.

Dairy and Food Culture Technologies (2006) afirma que las bacterias consideradas probióticas comúnmente se relacionan a los productos lácteos. Esto se debe a que algunos de estos microorganismos pueden jugar un rol en la transformación de la leche a productos fermentados y además brindar beneficios a la salud humana. Se menciona que los productos lácteos proveen el vehículo adecuado para el transporte de probióticos por varias razones:

- **Protección de la bacteria:** los productos lácteos neutralizan la acidez de los ácidos estomacales y de las altas concentraciones biliares en el intestino delgado, que pueden reducir por muerte o daño la concentración de bacterias.
- **Refrigeración:** la refrigeración de los lácteos promueve la estabilidad de los probióticos.
- **Imagen de los cultivos vivos:** el uso de cultivos activos vivos en los productos lácteos da una imagen positiva ante los consumidores lo cual facilita la transmisión de mensajes de salud.

- **Salud:** las propiedades de salud de los probióticos se combinan con las propiedades saludables de los lácteos para crear un alimento funcional. Se ha demostrado el efecto benéfico de los productos lácteos probióticos en el balance de la microflora intestinal, hipertensión, osteoporosis, cáncer, intolerancia a la lactosa y alto colesterol entre otros.

2.3.3.1. Yogur Probiótico

Un yogur probiótico es aquel que también contiene suficiente cantidad de microorganismos viables que producirán beneficio más allá de los valores nutricionales al ser ingeridos porque afectan beneficiosamente a una o varias funciones del organismo proporcionando un mejor estado de salud y bienestar y/o reducen el riesgo de enfermedad. El yogur constituye uno de los principales vehículos para el aporte de probióticos; porque durante la fermentación de la leche, la lactosa se separa en dos componentes más simples glucosa y galactosa, con la producción de ácido láctico. Esta condición hace que el producto resulte más conveniente para quienes sufren de intolerancia a la leche, causada por la carencia de una enzima llamada lactasa, haciendo a estos alimentos de gran aceptación en los distintos grupos de población por su fácil digestión (Mani, 2005).

El yogur elaborado con *Bifidobacterium* presenta valores de acidez de 1,00 a 1,79% de ácido láctico, cumpliendo con el criterio establecido por Briceño *et al.*, (2001) y Ramírez, (2007).

2.3.3.2. Cultivos Iniciadores

Los microorganismos que se utilizan en la industria láctea como cultivos iniciadores son principalmente las bacterias lácticas, que se añaden a la leche para que inicien y dirijan correctamente su fermentación. También se utilizan otras bacterias, como las llamadas probióticas, que en ocasiones se añaden por separado. También en algunos productos

lácteos, como por ejemplo queso o kéfir, se añaden otros microorganismos como hongos y levaduras para que inicien determinados procesos. Según Walstra *et al.* (1999) los objetivos de los cultivos iniciadores son:

- Acidificación: por producción de ácido láctico a partir de la lactosa, como consecuencia desciende el pH.
- Higienización, por acidificación, producción de bacteriocinas y competencia con los microorganismos indeseables.
- Por precipitación de la caseína.
- Por producción de mucilagos.
- Modificación del gusto y del aroma
- Por producción de ácido.
- Por producción de sustancias aromáticas a partir de la lactosa o del citrato.
- Por producción de sustancias aromáticas y sápidas por proteólisis y lipólisis.

Con el uso de cultivos iniciadores seleccionados se puede controlar mejor la calidad y la uniformidad de los productos lácteos.

2.3.3.2.1. Bacterias Lácticas

2.3.3.2.1.1. *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus*

Según Dellaglio *et al.* (1992) las características principales del *Streptococcus thermophilus* son:

En forma de células esféricas u ovoides de 0,7 a 0,9 μm de diámetro unidas en parejas o largas cadenas, según la temperatura de crecimiento y el medio de cultivo, vive en la leche y los productos lácteos; es homofermentativa, en la leche produce 0,7-0,8% ácido láctico L(+), algunas cepas son capaces de producir hasta un 1% de ácido láctico. No produce amoníaco a partir de la arginina, ni metaboliza el citrato. Algunas

cepas son capaces de producir polisacáridos que forman un mucilago, lo cual es interesante para la viscosidad del yogurt. En la leche, además de ácido láctico grasos volátiles: fórmico, acético, propionico, butírico, isovalerico y caproico, además produce acetoina y pequeñas cantidades de acetaldehído.

Presenta una actividad proteolítica muy pequeña en la leche y la mayoría de aminoácidos liberados son consumidos durante la fase de crecimiento logarítmico, por ser una bacteria termófila su temperatura óptima de crecimiento es de 42-45°C, la mínima de 10°C y la máxima de 50°C, también es una bacteria termodurica, aguanta un tratamiento de calor en la leche de 30 minutos a 60°C; y es muy sensible a la presencia de inhibidores y en especial de antibióticos, por ejemplo su crecimiento es inhibido por 0,01 U.I de penicilina o 5 μ g de estreptomina por ml de leche. También es muy sensible a la sal, hecho que se aprovecha para diferenciarlo de otros *lactococcus* y *enterococcus*, no crece en presencia de un 4% de sal y algunas cepas en presencia de un 2% de sal.

2.3.3.2.1.2. *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*

Según Dellaglio *et al.* (1992) las características principales del *Lactobacillus bulgaricus* son:

Se presenta en forma de bacilos alargados con la punta rodeada, separados o formando cadenas. El tamaño medio en la leche es de 0,8-1 μ m de largo, vive en la leche y los productos lácteos; es homofermentativa. En la leche produce aproximadamente un 1,7% de ácido láctico D(-). Además de ácido láctico, produce pequeñas cantidades de otros productos como los ácidos grasos volátiles: acético, propionico, butírico, isovalerico, caproico y caprico; además produce acetoina, acetaldehído, acetona y 2-butanona.

Presenta una actividad proteolítica mediana, pero importante por la liberación que supone de aminoácidos, por ser una bacteria termófila. Su temperatura óptima de crecimiento es de 40-43°C, la mínima de 15°C y la máxima de 52°C (algunas cepas crecen hasta 60°C). Aunque no se considera una bacteria termodurica, algunas cepas aguantan temperaturas de 75°C durante 20-30 min; y presenta una mayor resistencia a los antibióticos que el *S. thermophilus*, es inhibido por 0,3-0,6 U.I de penicilina. También es muy sensible a la sal; no se desarrolla en presencia de sales biliares o en caldos con un 2% de NaCl.

Ambos microorganismos son microacrófilos, soportan una acidez elevada y viven en simbiosis.

2.3.3.2.2. Bacterias Probióticas

Para que un microorganismo sea considerado como un probiótico debe de cumplir con la función de protección, tiene que formar parte de la flora intestinal normal, tener un tiempo corto de reproducción, ser capaz de producir compuestos antimicrobianos y ser estable durante el proceso de producción, comercialización y distribución para que pueda estar vivo en el momento de ingerirse y llegar al intestino (Pardio, 1994).

Se trata como probióticos, a las bacterias ácido lácticas integrantes de los géneros *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, y algunas cepas de *Streptococcus*. Para que se considere como alimento probiótico un yogur debe de contener aparte de *Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus* alguno de estos otros grupos bacterianos en suficiente cantidad para que promuevan una actividad beneficiosa a nivel del intestino humano. La mayoría de las bacterias mueren cuando atraviesan la pared gástrica; pero los probióticos, debido a su alto nivel de producción de ácido láctico, son capaces de sobrevivir una vez han atravesado el tracto gastrointestinal. Ellos interaccionan con la

microflora y/o células de la mucosa intestinal, induciendo o modulando distintas actividades biológicas beneficiosas (Fuller, 1994) y (Lee *et al.*, 1995).

La protección que dan estas bacterias se lleva a cabo por la competencia por los nutrientes o los sitios de adhesión que impiden la multiplicación de los patógenos y la producción de toxinas lo que imposibilita su acción dañina, mediante esta modulación inmune protegen al huésped de las infecciones induciendo a un aumento de la producción inmunoglobulinas, ampliación de la activación de las células mononucleares y de los linfocitos. En el yogur, las proteínas del suero (lactoalbúmina y lactoglobulina) permanecen dentro del producto, mientras que la presencia simultánea de lactosa y ácido láctico permiten que los oligoelementos tales como calcio y fósforo, resulten más disponibles para ser asimilados y en mayor abundancia por la acción de los probióticos a nivel intestinal (Guerin, 1998).

2.3.3.2.2.1. Genero *Bifidobacterium*

Las bacterias probióticas del genero *bifidobacterium*, que constituyen una de las pocas especies de bacterias predominantes en la microflora del colon a lo largo del ciclo de vida, y se asocian a un estado saludable en humanos. Las funciones del *bifidobacterium* en el colon no se han explicado en su totalidad; pero sus beneficios son numerosos. Cuando se utilizan para fermentar la leche, proporcionan diferentes perfiles de sabor en comparación con aquellos productos que contienen solamente bacterias ácido lácticas (BAL); porque no solamente producen ácido láctico sino también ácido acético, como uno de sus principales productos de fermentación. Además poseen ventajas probióticas potenciales, en particular efectos antimicrobianos, en la reducción del riesgo de contraer cáncer, y en el equilibrio de la microflora intestinal. En general, las *bifidobacterias* son bastones Gram positivos y anaerobios estrictos, tienen

necesidades nutricionales especiales y crecen lentamente en la leche. Muy pocas cepas se han adaptado lo suficientemente bien a la leche y pueden crecer en número suficiente como para sobrevivir durante la vida de anaquel de las leches fermentadas. Pero en los últimos años, estudios in vivo en adultos y en bebés han confirmado que algunas cepas de bifidobacterias son capaces de sobrevivir a su paso a través del tracto gastrointestinal, y también sobreviven más que algunas bacterias ácido lácticas (BAL). A medida que los retos tecnológicos relacionados con su viabilidad y su enumeración están siendo superados, las leches fermentadas por estos microorganismos (solos o en combinación con BAL) tienen la capacidad de proporcionar productos consistentemente satisfactorios que contienen un gran número de microorganismos viables (Guerin, 1998).

El crecimiento del *Bifidobacterium* depende de los aminoácidos disponibles que son liberados por bacterias proteolíticas, las cuales fueron utilizadas como iniciadores; sin embargo los aminoácidos esenciales están presentes en la quinua, contribuyendo en el crecimiento de las bacterias. Las bifidobacterias difieren del resto de las bacterias ácido lácticas, en que no solamente producen ácido láctico sino también ácido acético, como uno de sus principales productos de fermentación (Farnworth *et al.*, 2007) y (Scardovi, 1996).

2.3.3.2.2.1.1. Taxonomía

La clasificación de las bifidobacterias ha sido modificada a lo largo de la historia desde que se descubrió en 1899 el microorganismo denominado *Bacillus bifidus*; y que en la actualidad representa al género *Bifidobacterium* como especie tipo con el nombre de *Bifidobacterium bifidum*. En los últimos años han aparecido nuevas cepas y se han

reclasificado, en la actualidad el género se encuentra formado por un total de 28 especies, como se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2. La lista actual de especies incluidas dentro del género *Bifidobacterium*

ESPECIE	REFERENCIA
<i>Bifidobacterium psychraerophilum</i> Simpson <i>et al.</i> , 2004a	Reuter, 1963
<i>Bifidobacterium pullorum</i> Trovatelli <i>et al.</i> 1974	Scardovi y Crociani, 1974
<i>Bifidobacterium ruminatum</i> Biavati y Mattarelli 1991	(Mitsuoka 1969)
<i>Bifidobacterium saeculare</i> Biavati <i>et al.</i> 1992	Scardovi y Trovatelli, 1969
<i>Bifidobacterium scardovii</i> Hoyles <i>et al.</i> , 2002	Tissier, 1900 Orla-Jensen, 1924
<i>Bifidobacterium subtile</i> Biavati <i>et al.</i> 1982	Scardovi <i>et al.</i> , 1979
<i>Bifidobacterium thermacidophilum</i> subsp. <i>porcinum</i> Zhu <i>et al.</i> 2003	Reuter, 1963
subsp. <i>thermacidophilum</i> Dong <i>et al.</i> 2000	Scardovi y Crociani, 1974
<i>Bifidobacterium thermophilum</i> Mitsuoka 1969	Scardovi <i>et al.</i> , 1979
<i>Bifidobacterium psychraerophilum</i> Simpson <i>et al.</i> , 2004a	Scardovi y Trovatelli, 1969 Biavati <i>et al.</i> , 1982
<i>Bifidobacterium pullorum</i> Trovatelli <i>et al.</i> 1974	Scardovi <i>et al.</i> , 1979
<i>Bifidobacterium ruminatum</i> Biavati y Mattarelli 1991	Scardovi y Crociani, 1974
<i>Bifidobacterium saeculare</i> Biavati <i>et al.</i> 1992	Lauer, 1990
<i>Bifidobacterium scardovii</i> Hoyles <i>et al.</i> , 2002	Watabe <i>et al.</i> , 1983
<i>Bifidobacterium subtile</i> Biavati <i>et al.</i> 1982	Scardovi y Trovatelli, 1969
<i>Bifidobacterium thermacidophilum</i> subsp. <i>porcinum</i> Zhu <i>et al.</i> 2003	Sakata <i>et al.</i> , 2002
subsp. <i>thermacidophilum</i> Dong <i>et al.</i> 2000	Scardovi and Zani 1974
<i>Bifidobacterium thermophilum</i> Mitsuoka 1969	Biavati y Mattarelli 1991
<i>Bifidobacterium psychraerophilum</i> Simpson <i>et al.</i> , 2004a	Biavati <i>et al.</i> 1982
<i>Bifidobacterium pullorum</i> Trovatelli <i>et al.</i> 1974	Scardovi <i>et al.</i> 1979

<i>Bifidobacterium ruminatum</i> Biavati y Mattarelli 1991	Mitsuoka 1969 Yaeshima <i>et al.</i> 1992
<i>Bifidobacterium saeculare</i> Biavati <i>et al.</i> 1992	Simpson <i>et al.</i> , 2004a
<i>Bifidobacterium scardovii</i> Hoyles <i>et al.</i> , 2002	Trovatelli <i>et al.</i> 1974
<i>Bifidobacterium subtile</i> Biavati <i>et al.</i> 1982	Biavati y Mattarelli 1991
<i>Bifidobacterium thermacidophilum</i> subsp. <i>porcinum</i> Zhu <i>et al.</i> 2003	Biavati <i>et al.</i> 1992
subsp. <i>thermacidophilum</i> Dong <i>et al.</i> 2000	Hoyles <i>et al.</i> , 2002
<i>Bifidobacterium thermophilum</i> Mitsuoka 1969	Biavati <i>et al.</i> 1982
<i>Bifidobacterium psychraerophilum</i> Simpson <i>et al.</i> , 2004a	Zhu <i>et al.</i> 2003 Dong <i>et al.</i> 2000
<i>Bifidobacterium pullorum</i> Trovatelli <i>et al.</i> 1974	Mitsuoka 1969

Fuente: List of Bacterial names with Standing in Nomenclatura, <http://www.bacterio.cict.fr/>, 2004.

2.3.3.2.2.1.2. Hábitats

Las bifidobacterias son habitantes normales del tracto gastrointestinal humano y de diversos animales y están presentes durante toda la vida pero en distintas cantidades, apareciendo a los pocos días después del nacimiento. Constituyen una de las especies predominantes de la microflora del colon, junto con *Peptostreptococcus*, *Eubacterias*, *Clostridia* y *Bacteroides*, las cuales se encuentran presentes en niveles que van desde 10^8 a 10^{11} bacterias por gramo de material del colon. Según Guarner y Malagelada (2003); Collins y Gibson (1999) la flora intestinal beneficiosa, representada principalmente por los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, contribuye de forma significativa al estado de salud del huésped, por sus funciones:

Metabólicas, interviniendo en la asimilación de nutrientes de la dieta;

Protectoras, contribuyendo al efecto barrera y al desplazamiento de microorganismos patógenos,

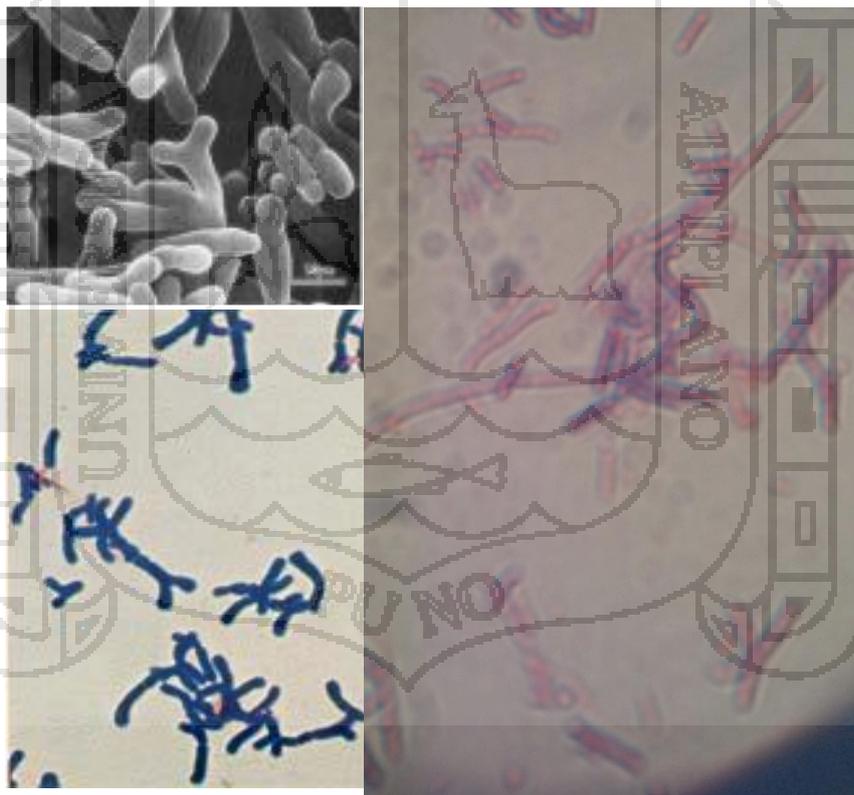
- Tróficas, interviniendo en la modulación del sistema inmune y en el desarrollo y la proliferación celular.

➤

2.3.3.2.2.1.3. Características Culturales y Morfológicas

Son bacilos de variada morfología, generalmente de forma bacilar, pueden ser cortos, regulares, con ramificaciones. Son Gram-positivos, inmóviles, no son esporulados y se tiñen irregularmente con azul de metileno. Son anaerobios estrictos, sin embargo el grado de tolerancia al oxígeno depende de la especie y del medio de cultivo (De Vries y Stouthamer, 1969) mencionado por Collado (2004). Esos bacilos, con una pared externa irregular, son usualmente cóncavos y sus extremidades pueden adquirir diversas morfologías con extremos en forma de espátula. En algunos casos incluso pueden presentar morfología cocoidea. Se disponen aislados, en cadenas, en empalizada o en forma de V, Y, T. La morfología es muy variable y depende del medio de cultivo donde se desarrollen, como se observa en la Figura 1.

Figura 1. Morfología del género *Bifidobacterium*.



Su temperatura óptima de crecimiento oscila entre 36-38°C para las especies de origen humano y 41-43°C para las especies de origen animal. No existe crecimiento a temperaturas menores de 20°C y las bacterias pertenecientes a este género no resisten

bien temperaturas mayores de 46°C. Por ejemplo, *Bifidobacterium bifidum* muere a 60°C, Rasic y Kurmann, (1983). El pH requerido para su crecimiento oscila entre 6.5-7 y a pHs menores o iguales el crecimiento es muy lento o incluso nulo, por todo ello, es importante controlar el descenso del pH en los productos lácteos que contienen este microorganismo. No existe crecimiento a pH menor de 4.0 o mayor de 8.0 (Scardovi, 1986). Gómez (1999) y Díaz *et al.*, (2004) indican que el pH desciende por acción de la fermentación microbiológica de la lactosa, por las bacterias ácidolácticas (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *Streptococcus salivarius* subsp. *termophilus*). La apariencia de las colonias de este género bajo condiciones de anaerobiosis puede variar mucho en función del medio que se emplee. En general, las colonias que se forman son redondeadas, pueden ser brillantes y de diámetro muy variable, pero Scardovi (1986) distinguió dos diferentes tipos de colonias de *B. bifidum*, algunas colonias son muy lisas, convexas, blancas, y brillantes, mientras que otras son rugosas, con bordes desiguales. Por ello, la morfología de colonia no es una buena referencia para la identificación del género.

2.3.3.3. Requisitos de los Cultivos Probióticos

Según Céspedes (1995), citada por Hernández (2003) los microorganismos probióticos se inoculan en una alta concentración (mayor que 10^7 UFC/ml). Deben cumplir con una serie de requisitos; entre ellos, los más importantes son:

- Mantener su viabilidad en las condiciones de preparación del alimento en el que se utilizan, por ejemplo, la presencia de azúcares y aditivos.
- Mantener su viabilidad en las condiciones de extrema acidez en el estómago, y ser capaces de colonizar el intestino.
- Tener una alta velocidad de crecimiento para dominar sobre los otros microorganismos intestinales.

2.3.3.4. Beneficios de la Ingestión del Yogur Probiótico

Los efectos de los probióticos son varios, porque modifican la flora intestinal evitando la colonización patógena, evitando su desequilibrio. En la actualidad, todavía

se desconocen muchos aspectos relativos a su mecanismo de acción; sin embargo, se reconoce su funcionalidad en (Lee, 1995):

- Prevención y tratamiento de enfermedades infecciosas
- Disminución de los niveles de colesterol.
- Tratamiento de diarreas de origen bacteriano o viral.
- Contribución en el tratamiento de la intolerancia a la lactosa.
- Estimulación del sistema inmune.
- Formación de una flora intestinal balanceada.
- Prevención de ciertas manifestaciones alérgicas
- Prevención del cáncer de Colon
- Tratamiento contra tumores
- Promueven la producción de vitaminas como la B2, B6 y biotina.
- Ayuda en la asimilación de oligoelementos.

2.4. QUINUA

Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.), especie que posee una gran variabilidad y diversidad, con elevadas cualidades nutricionales, fundamentalmente el de su proteína, considerada superior a la de los cereales. Este cultivo puede adaptarse muy fácilmente a las nuevas exigencias de los mercados por alimentos de origen orgánico. Al igual de la papa, maíz, amaranto, lupino, oca, olluco, mashua y muchos otros cultivos andinos fue base nutricional en los principales culturas americanas, con la llegada de los españoles a América, se introdujo a otros cultivos, muchos de los cuales desplazaron a los tradicionales, razón por la cual la quinoa paso a constituirse en un cultivo marginal practicado por algunas comunidades campesinas, con tecnologías propias de la cultura andina. Hoy este cultivo ha tomado una inusitada importancia entre los agricultores y

agroindustriales, como consecuencia de la promoción sobre sus bondades nutricionales que la quinua ofrece en sus granos, hojas e inflorescencias, para la alimentación humana. La saponina de los granos puede ser utilizada como detergente y medicina. En Cuba ha sido introducido el cultivo de quinua a través del instituto de Ciencia Animal, con vista a su empleo al estudio de los aspectos de medicina humana relativo a las saponinas y el colesterol sérico; así la quinua se convierte en un producto de exportación, con un potencial enorme para ampliar la frontera agrícola de cultivo (Apaza *et al.*, 2005).

2.4.1. Descripción

Nomenclatura Común de la Quinua

Español	:	quinua, quinoa, quinquá, kinoa, trigo inca.
Quechua	:	kiuna, quinua.
Aymara	:	shupa, Jopa, Jupha, jiura, aara, ccallapi.
Chibcha	:	suba, pasca.
Mapuche	:	quinhua, quinua.
Azteca	:	huatzontle.
Francés	:	quinoa, riz de peruo, anserine, petit riz de perou.
Inglés	:	quinoa, Petty rice, inca rice, Peruvian rice.
Alemán	:	Reismelde, ankaweizen, peruanisher, Reis- Gerwacks.
Italiano	:	quinua, chinua.

Portugués : arroz miudo do Peru, quinoa.

La importancia de las proteínas de la quinua se debe a la calidad de las mismas (Repo-Carrasco *et al.*, 2001). Las proteínas de quinua tienen una composición balanceada de aminoácidos esenciales parecida a la composición aminoácídica de la caseína, la proteína de la leche.

2.4.2. Valor Nutritivo

2.4.2.1. Proteínas

Lo que caracteriza a la quinua es su elevado valor proteico, y que la calidad de sus proteínas y equilibrio, son superiores a las de los demás cereales, fluctuando entre 12,5 a 16,7%. El 37% de las proteínas que posee la quinua está formado por aminoácidos esenciales. Los aminoácidos esenciales son aquellos que no produce el organismo, por lo que necesitan ser ingeridos a través de la dieta. La carencia de estos aminoácidos en la dieta limita el desarrollo del organismo, ya que no es posible reponer las células de los tejidos que mueren o crear nuevos tejidos, en el caso del crecimiento. Los aminoácidos esenciales para el ser humano son: valina, leucina, treonina, lisina, triptófano, histidina, fenilalanina, isoleucina, arginina y metionina. Los aminoácidos que contiene en mayor cantidad con respecto a otros cereales son: ácido glutámico, ácido aspártico, isoleucina, lisina, fenilalanina, tirosina y valina. El ácido glutámico participa en los procesos de producción de energía para el cerebro y en fenómenos tan importantes como el aprendizaje, la memorización y la plasticidad neuronal, el ácido aspártico mejora la función hepática y es indispensable para el mantenimiento del sistema cardiovascular, la tirosina tiene un importante efecto antiestrés y juega un papel fundamental en el alivio de la depresión y la ansiedad, entre otras funciones, la lisina por ser su contenido el doble en la quinua que en los demás cereales, mejora la función

inmunitaria al colaborar en la formación de anticuerpos, favorece la función gástrica, colabora en la reparación celular, participa en el metabolismo de los ácidos grasos, ayuda al transporte y absorción del calcio e, incluso, parece retardar o impedir -junto con la vitamina C- las metástasis cancerosas, por mencionar sólo algunas de sus numerosas actividades terapéuticas (FAO, 2001). En la Tabla 3 se observa el valor nutritivo de la quinua.

Tabla 3. Valor Nutritivo en Variedades de Quinua.

Componentes	Blanca de Juli	Kancolla	Salcedo-INIA	Pasankalla	Chullpi
Humedad %	7.71	8.09	7.94	7.69	7,69
Cenizas %	2.81	2.58	2.36	3.30	1.20
Proteínas %	14.73	14.73	14.49	20.80	8.60
Grasa %	5.79	6.89	8.08	6.10	1.50
Fibra %	3.50	3.29	3.34	2.78	1.99
Carbohidratos %	65.45	64.41	63.78	59.37	84.13
Energía (Kcal./100g)	396.2	402.10	409.4	401.3	382.9

Fuente: Laboratorio EE. Illpa.INIA;2004, mencionado por Apaza *et al.*, 2005

2.4.2.2. Vitaminas

La quinua posee un alto contenido de vitaminas del complejo B, C y E, y su contenido de vitamina B y C es superior a la del trigo. Es rica en caroteno y niacina (B3). Contiene sustancialmente más riboflavina (B2), tocoferol (vitamina E) y caroteno que el trigo y el arroz (FAO, 2001).

2.4.2.3. Grasa

En la quinua la mayoría de sus grasas son monoinsaturadas y poliinsaturadas, que son beneficiosas para el cuerpo por ser elementales en la formación de la estructura y en la funcionalidad del sistema nervioso y visual del ser humano, a la vez que disminuyen el nivel de colesterol total y el colesterol LDL (colesterol malo) en la sangre, sólo por nombrar algunos de los múltiples beneficios que tiene el consumo de los ácidos grasos omega para el organismo. Los valores de ácidos grasos en el grano crudo son de 8,1%, 52,3%, 23% de omega 3, omega 6, omega 9 respectivamente (FAO/OMS, 2001).

2.4.2.4. Minerales

El grano de la quinua tiene casi todos los minerales en un nivel superior a los cereales, contiene fósforo, calcio, hierro, potasio, magnesio, manganeso, zinc, litio y cobre. Posee 1,5 veces más calcio en comparación con el trigo - este mineral es responsable de varias funciones estructurales de huesos y dientes - y participa en la regulación de la transmisión neuromuscular de estímulos químicos y eléctricos, la secreción celular y la coagulación sanguínea. Por esta razón el calcio es un componente esencial de la alimentación. El aporte recomendado de calcio en niños de 4 a 9 años es de 600-700 mg/día y para adultos va entre 1000 a 1300 mg/día. El calcio es absorbido por el organismo, debido a la presencia simultánea del zinc, lo que la hace muy recomendable para, por ejemplo, evitar la descalcificación y la osteoporosis, a diferencia de otros alimentos que si contienen calcio pero que no logra ser absorbido por el cuerpo. El contenido de zinc en la quinua es el doble que en el trigo, y comparada con el arroz y el maíz, las diferencias son aún mayores (FAO/OMS, 2001).

2.4.3. Proceso de Transformación de la Quinua

La quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.), constituye un cultivo nativo de mucha importancia para la alimentación en la zona andina, es necesario darle la prioridad

necesaria en la investigación desde el punto de vista agroindustrial para realizar el uso adecuado de sus enormes potencialidades, a través de una transformación industrial que permite valorar verdaderamente estos productos. La quinua perlada, hojuelas, harina, expandido, colorantes, fideos, extruidos y otros, son productos que pueden ser elaborados a través de una serie de procesos y operaciones, mediante los cuales son convertidos en alimentos muy apreciados y necesarios para la dieta del hombre. La quinua es un alimento que reúne características favorables y excepcionales para ser transformadas y obtener productos agroindustriales que permita un uso mas elaborado y directo, por ello es necesario tener una definición clara de cada proceso (Rurales y Fair, 1992; mencionado por Apaza *et al.*, 2005).

2.4.3.1. Sucedáneo de Leche a partir de Quinua

De la quinua se han obtenido, productos transformados y que actualmente se encuentran en el mercado, los cuales requieren promoción e incluso difusión de la forma de consumo puesto que la población no conoce plenamente sus cualidades y formas de preparación: sin embargo, dada la necesidad de disponer de productos nutritivos y cuyo conocimiento ya son de dominio público y de la población consumidora, se ha efectuado investigación en los laboratorios de la Universidad Nacional del Altiplano, para obtener leche de quinua, dado el gran potencial que tendría esta forma de consumo de la proteína vegetal de alta calidad nutritiva (Mujica *et al.*, 2006).

2.4.3.2. Beneficios del Sucedáneo de Leche a partir de Quinua

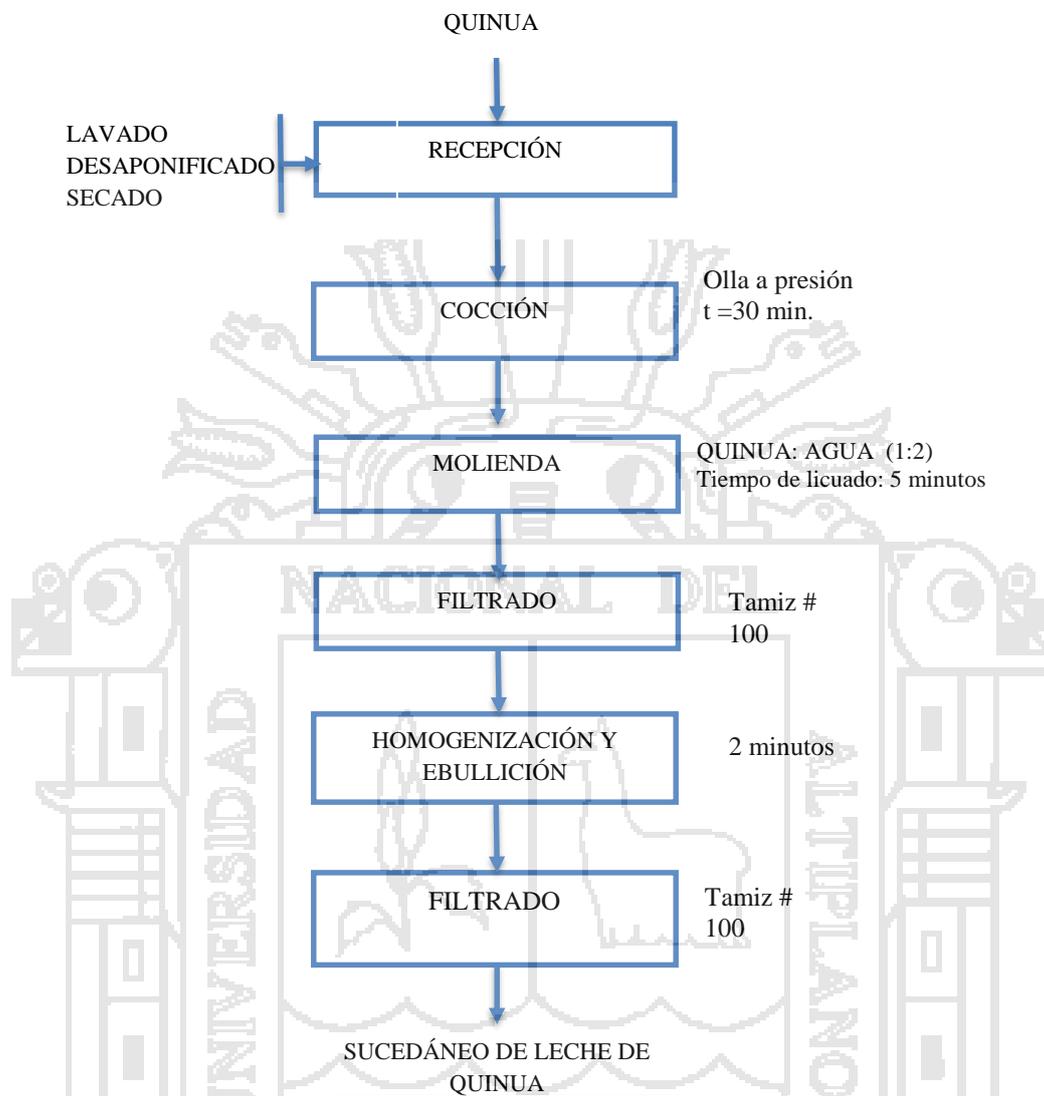
La nutrición moderna, va confirmando con su minuciosa descripción química las razones por las que los indígenas americanos, intuitivamente, eligieron la quinua y otros cultivos andinos como preciosas semillas para incluir en la alimentación. Entre un 14 y

18% de su composición esta formada por sus proteínas, predominando tres aminoácidos importantes para la asimilación de otras pequeñas sustancias fundamentales en el crecimiento. Todo parece indicar que la ausencia de osteoporosis tiene relación con la dieta del altiplano que es rica en granos que contienen fitoestrogenos que son sustancias que permiten la absorción de calcio y esto hace que las mujeres de esta región no sufran osteoporosis ni problemas propios de la menopausia (Mujica *et al.*, 2006).

2.4.3.3. Elaboración del Sucedáneo de Leche a partir de Quinoa

La elaboración del sucedáneo de leche de quinoa se muestra en la Figura 2, cuyo proceso consiste en recepcionar la quinoa variedad Chullpi lavada, desaponificada y secada; se lleva a cocción en una olla de presión durante 30 minutos, utilizando 5 litros de agua para 1kg. de quinoa, luego se procede a enfriar a temperatura ambiente. Se licua, agregando su propio líquido en la que se produjo la cocción del grano, la relación de quinoa: agua es de 1:2, la licuación se da a alta velocidad durante 5 – 10 minutos. Se separa la parte solida de la liquida, pasando por un tamiz # 100, para obtener un sucedáneo de leche a partir de quinoa de alta calidad. Se da una emulsión homogénea, lo cual la hará más cremosa y más uniforme. Se somete a ebullición durante 2 minutos.

Figura 2. Diagrama de flujo del Proceso de Elaboración del Sucedáneo de leche a partir de quinua



Fuente: Mujica, 2006

2.5. MICROBIOLOGÍA PREDICTIVA

La microbiología predictiva consiste en la predicción a través de modelos, el comportamiento de microorganismos alimentarios en respuesta a las condiciones ambientales que se dan en la producción de alimentos y en las operaciones del procesado. Los modelos predicen el tiempo que tardarían estos microorganismos en

empezar a proliferar bajo determinadas condiciones y a qué velocidad crecerían una vez que comienzan (Aguirre y Aquino, 2008).

La microbiología predictiva utiliza modelos matemáticos (construidos a partir de datos de pruebas de laboratorio) conocidos como los “modelos predictivos” en software para describir gráficamente esta respuesta. Las pruebas microbiológicas básicas de laboratorio se utilizan típicamente en la toma de decisiones críticas relacionadas con la inocuidad alimentaria y la vida de anaquel de los productos. El crecimiento, supervivencia e inactivación de los microorganismos en los alimentos son respuestas reproducibles, es por ello que los modelos predictivos sirven para evaluar de forma combinada el efecto de factores ambientales que puedan afectarlos (Gutiérrez, 2011)

2.5.1. Modelos Matemáticos Predictivos

Los modelos se evalúan bajo condiciones específicas para ver cuales satisfacen los estándares establecidos y demuestran un nivel de aceptabilidad que permita su uso por la industria agroalimentaria (Aguirre y Aquino, 2008).

2.5.1.1. Modelo Gompertz Modificado

La ecuación de Gompertz fue originalmente desarrollada para describir la mortalidad humana como una función de la edad. Gibson *et al.*, (1987) fueron los primeros en utilizar la ecuación de Gompertz para ajustar las curvas de crecimiento microbiano y encontraron que la ecuación podía describir con precisión las fases exponencial y estacionaria de las curvas sigmoides de crecimiento microbiano, pero no era eficaz para la fase de latencia. En la Figura 3 se observa el modelo de Gompertz.

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

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

t = tiempo (h).

Si tomamos la ecuación modificada de Gompertz en una curva de crecimiento, los parámetros del modelo pueden representarse gráficamente como se muestra en la Figura 3:

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

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

Tiempo de generación: $T_g = \log_2 \frac{e}{BC}$ (horas)

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

2.5.2. Construcción del Modelo

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

2.5.2.1. Generación de Datos

El desarrollo del modelo requiere la generación de datos de experimentación bajo condiciones controladas y conocidas. Mientras mayor sea la cantidad de datos recolectados, mayor será el carácter predictivo y la confiabilidad del modelo. Para

encajar en un modelo, se deben recolectar los datos durante todo el periodo de crecimiento y frecuentemente se deben crear cientos de curvas primarias de crecimiento (Cayré *et al.*, 2010).

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

2.5.2.2. Método de Recuento Total en Placa

El método estándar utilizado para monitorizar el crecimiento de la población bacteriana es el recuento total (Potter y Hotchkiss, 1999). Para la estimación exacta de los parámetros de una curva de crecimiento, son importantes el número y la calidad de las observaciones (recuentos) hechas (Poschet *et al.*, 2004)

Según Madigan y Martinko (2004) el recuento microscópico directo se cuenta tanto las células vivas como muertas. En muchos casos interesa contar solo las células vivas, y con este fin se han desarrollado métodos de recuento de células viables. Una célula viable se define como aquella que es capaz de dividirse y dar lugar a una descendencia; y el método usual para realizar una determinación de células viables se basa en contar el número de las células de la muestra que es capaz de formar colonias sobre un medio solido adecuado. Por esta razón, el recuento de células viables también se llama recuento en placa o recuento de colonias. En este procedimiento se supone que cada célula viable puede formar una colonia. Hay dos maneras de realizar un recuento en placa para viables: el método de extensión en placa y el método de vertido en placa:

- En el método de extensión en placa un cierto volumen de cultivo diluido que no suele ser superior a 0,1 ml, se extiende sobre la superficie de una placa con medio sólido utilizando un asa estéril de extensión. La placa se incuba después hasta que aparecen en las colonias y se cuenta su número. Es importante que la superficie del medio este seca de modo que el líquido de la muestra se absorba. No se suelen usar volúmenes mayores de 0,1 ml porque el exceso de líquido no se absorbe, y origina problemas en el recuento al favorecer la extensión y mezcla de las colonias.
- En el método de vertido en placa se pipetea un volumen conocido (normalmente 0,1-1,0 ml) de cultivo en una placa Petri estéril sobre la que se añade el medio con agar fundido y se mezcla todo bien con suaves movimientos de la placa sobre la superficie de la mesa antes de dejar que se solidifique. Como la muestra se mezcla con el medio fundido, se puede usar volúmenes de inóculo mayores que en el método de recuento por extensión; sin embargo, con este método el organismo que se cuenta debe ser capaz de resistir la temperatura del agar fundido a 45°C.

2.5.3. Descripción Matemática del Modelo

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

cuadrados de las diferencias entre los valores observados y predictivos (Mc Meekin *et al.*, 1993).

2.6. CRECIMIENTO MICROBIANO

El crecimiento se define como un aumento en el número de células microbianas de una población; también puede medirse como un incremento de la masa celular. La velocidad de crecimiento es el cambio en el número de células o en la masa celular experimentando por unidad de tiempo. Durante el ciclo de división celular, todos los componentes estructurales de la célula se duplican. El intervalo para la formación de dos células a partir de una supone una generación, y el tiempo transcurrido para que esto ocurra se llama tiempo de generación. Por tanto el tiempo de generación es el tiempo que se requiere para que la población se duplique razón por la cual a veces el tiempo de generación se llama tiempo de duplicación. Durante cada generación, tanto el número de células como la masa celular se duplican. Los tiempos de generación varían ampliamente entre los distintos microorganismos. Muchas bacterias tienen tiempo de generación comprendidos entre 1-3 horas, pero unas cuantas crecen muy rápidamente y se dividen en tan solo 10 minutos mientras que otras tardan varios días. Además el tiempo de generación de un microorganismo determinado también es función del medio de cultivo utilizado y de las condiciones de incubación empleadas (Farnworth, 2003).

2.6.1. Fase de Crecimiento

La fase de latencia, es el período de ajuste que las células experimentan al ser transferidas de un medio al otro antes de iniciar su crecimiento. La duración de esta fase puede variar dependiendo del crecimiento de las células en el inóculo, el cual debe tener una edad tal que la mayor parte de las células que contiene deben encontrarse en fase exponencial y metabólicamente activas. Las células se adaptan al nuevo ambiente. No

existe o existe muy poco crecimiento (Castillo, 2013). Durante esta fase los microorganismos se toman un tiempo para adaptarse a su nuevo ambiente fisicoquímico y en ocasiones se sintetizan nuevas enzimas o componentes estructurales (Sánchez, 2003; Duarte, 1998). **La fase exponencial o logarítmica** es aquella durante la cual los microorganismos crecen y se dividen hasta el nivel máximo posible, en función de su potencial genético, tipo de medio y las condiciones en que crece. En este período hay una relación lineal entre el logaritmo del número de células (o cualquier otra propiedad medible de la población) y el tiempo. Los microorganismos se dividen y duplican en número en intervalos regulares. Como cada célula se divide en un momento ligeramente diferente del resto, la curva de crecimiento aumenta suavemente, en lugar de realizar discretos saltos. **La fase estacionaria** es resultado del agotamiento de los nutrientes disponibles o del efecto de acumulación de productos tóxicos de metabolismo que tienen como consecuencia la disminución de la velocidad del crecimiento. La transición entre la fase exponencial y la fase estacionaria se caracteriza por un crecimiento desequilibrado, durante el cual los diversos componentes celulares son sintetizados a diferentes velocidades. Y la **fase de muerte** es consecuencia de diversos factores: uno importante es el agotamiento de las reservas celulares de energía. Al igual que el crecimiento, la muerte también asume una función exponencial que puede ser representada por una disminución lineal del número de las células viables a lo largo del tiempo (Madigan *et al.*, 1997; Prescott *et al.*, 1999)

2.6.2. Parámetros cinéticos del Crecimiento Microbiano

2.6.2.1. Tiempo de Latencia (λ)

El tiempo de latencia es la duración de la fase de latencia. Un fenómeno inherente a la cinética microbiana es la latencia, la cual es típicamente observada como la respuesta retardada de la población microbiana ante un (repentino) cambio en el ambiente. La fase

de latencia puede producirse en ambos procesos, de crecimiento y de inactivación (Swinnen *et al.*, 2004).

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

La fase de latencia del crecimiento microbiano fue definida en 1914 por Penfold como el intervalo entre la inoculación del cultivo bacteriano y el tiempo del comienzo de su velocidad máxima de crecimiento. Y suele ser convencionalmente medido como el punto en el cuál la pendiente de la fase exponencial de crecimiento (en una gráfica semi-logarítmica) intercepta la línea horizontal trazada desde la concentración celular inicial (Robinson *et al.*, 1998).

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

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

2.6.2.2. Tiempo de Generación (Tg)

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

Según Garcia (1995) llamado también tiempo de duplicación (g) de una generación (“doubling time”) es el tiempo que tarda una población en reproducirse hasta alcanzar el doble de población o lo que es lo mismo el tiempo medio que tarda una célula en reproducirse.

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

Agatangelo (2007) asocia el tiempo de generación (Tg) a la fase exponencial, donde los microorganismos se dividen y duplican en número en intervalos regulares, también indica que cada célula se divide en un momento ligeramente diferente al resto, y la curva de crecimiento aumenta suavemente. Ishibashi y Shimamura (1993) menciona que el *S. thermophilus* actúa como un eliminador de oxígeno en el bio-yoghurt facilitando el crecimiento del *Bifidobacterium*.

El tiempo de generación está directamente relacionado con la velocidad de crecimiento exponencial, que se define como la pendiente de la curva de crecimiento logarítmico en

la fase de crecimiento exponencial. Generalmente, estos dos parámetros son estimados por el ajuste de los modelos primarios (Delignette y Muller, 1998), tales como la ecuación modificada de Gompertz (Gibson *et al.*, 1988; Zwietering *et al.*, 1990) o el modelo propuesto por (Baranyi y Roberts, 1994).

2.6.2.3. Velocidad Máxima de Crecimiento (μ_{max})

Como ya se ha indicado anteriormente, el crecimiento se define como un incremento en el número de células microbianas en una población, lo cual también puede ser medido como un incremento en masa microbiana. En este contexto, la velocidad de crecimiento se define como el cambio en número de células o masa celular por unidad de tiempo (Madigan *et al.*, 1999). Según (Orozco, 2003), los microorganismos toman los nutrientes del medio y lo utilizan para llevar a cabo todas sus funciones metabólicas: mantenimiento, crecimiento, reproducción y biosíntesis de metabolitos. Según Montes (2013) en promedio las bacterias poseen valores de μ_{max} cercanos a 0.9 UFC/ml/h¹, y Saura (2003) menciona que las bacterias están entre 0,6-1,0 UFC/ml/h¹.

Un cultivo microbiano creciendo en equilibrio imita una reacción autocatalítica de primer orden, es decir, la velocidad del aumento de bacterias en un tiempo dado es proporcional al número o masa de bacterias presentes durante ese tiempo (Stanier *et al.*, 1989).. La tasa del crecimiento exponencial se ve influenciada por las condiciones ambientales (temperatura, composición del medio), así como por las características genéticas del microorganismo (Madigan *et al.*, 1997) y afectada por el incremento de la acidez en el medio (Cury, 2003).

La velocidad máxima de crecimiento específico es de considerable importancia a nivel industrial, debido a que es en este punto donde se obtiene el valor máximo de μ a niveles de saturación de sustrato, relacionando la dependencia de los microorganismos

con las condiciones del fermentador, donde a medida que aumenta la densidad de población decrece la concentración del sustrato limitante del crecimiento, causando un descenso de μ (Sanchez, 2003) (Duarte, 1998). A bajas concentraciones de nutriente, se establece que la velocidad de crecimiento específica depende de la concentración de nutrientes. A altas concentraciones, la velocidad de crecimiento específica alcanza valores máximos, fijados por la cinética intrínseca de las reacciones intracelulares, las cuales están relacionadas en la transcripción y traslación del DNA (Orozco, 2003).



III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. LUGAR DE EJECUCIÓN

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

3.2. MATERIAL EXPERIMENTAL

Las materias primas que se utilizaron fueron: leche entera fresca adquirida del Distrito de Paucarcolla y Quinoa variedad Chullpi que se adquirió de la Asociación de Productores Agroindustriales del Distrito de Cabana.

3.3. MATERIALES Y EQUIPOS

3.3.1. Materiales

- Matraces Erlenmeyer, boca angosta graduado de 100, 250 y 500 ml Pírex
- Probeta graduada, con pie hexagonal y pico de 50, 100 y 250 ml
- Espátulas de acero inoxidable
- Frasco lavador piceta de polietileno boca angosta cap. 500ml
- Gradilla esterilizable sin alambre No-Wire
- Mechero de alcohol
- Placas Petri marca STERIPLAN, en vidrio cal soda de Ø 60
- Vasos de precipitado de 50ml Pírex
- Pipetas volumétricas 0.5, 1, 5, 10 y 20 ml
- Tubo de ensayo de 20 ml
- Vasos precipitados de 25 y 50 ml, graduado con pico Beaker
- Fiólas de 500 ml Pírex
- Varillas de agitación

3.3.2. Equipos de Laboratorio

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

3.3.3. Reactivos

- Hidróxido de sodio (NaOH 0,1N)
- Solución alcohólica de fenolftaleína al 1%
- Alcohol etílico puro 96°

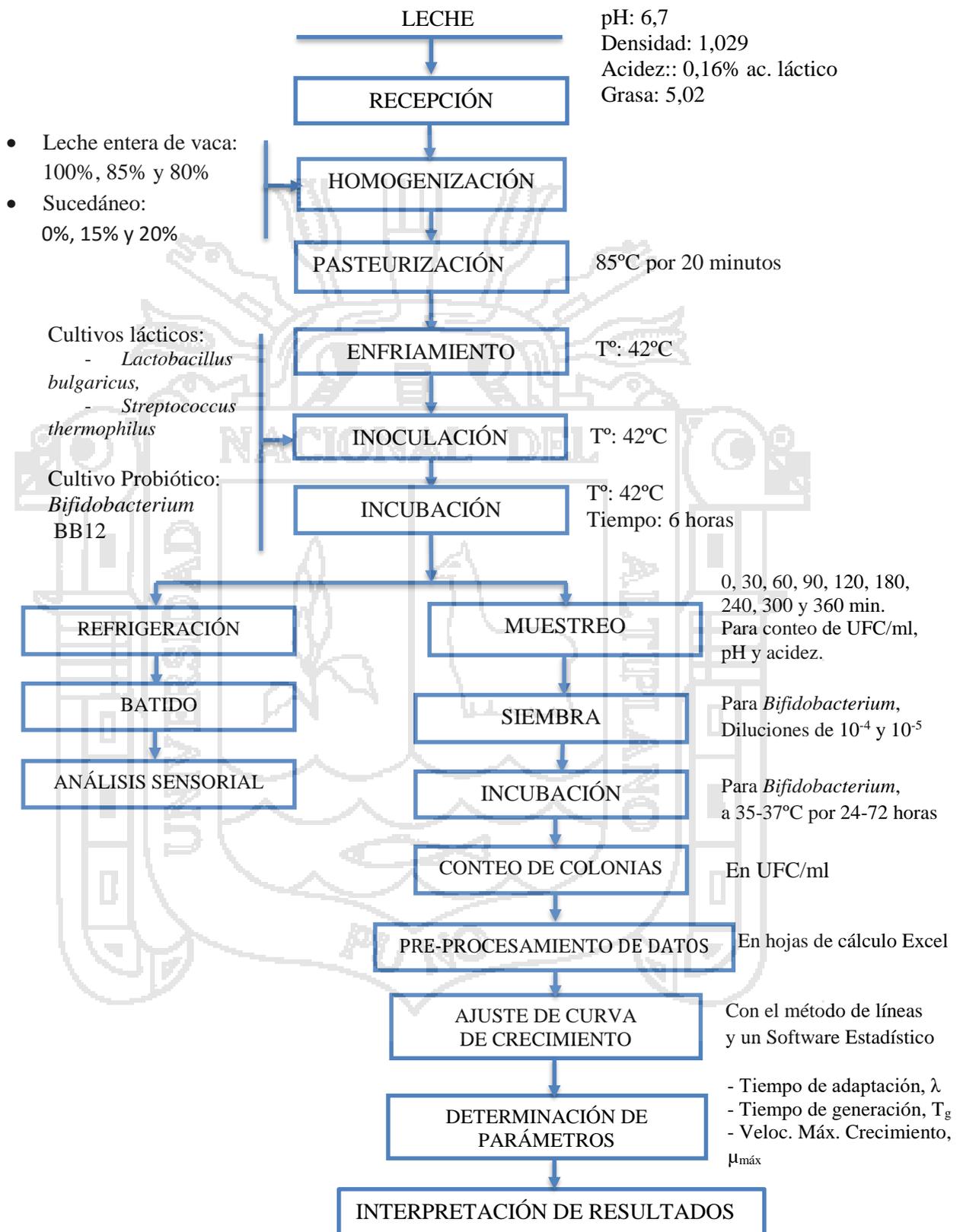
3.3.4. Medio de Cultivo

- Agar Man Rogosa Sharpe (MRS) proveído por MERCK KGaA.
- Agua de Peptona marca MAST, proveído por Biosym E.I.R.L. Peruana.
- Agua destilada químicamente pura desmineralizada desionizada DIAMEDSA.

3.4. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

El presente trabajo de investigación se ha realizado según el diagrama experimental mostrado en la Figura 4.

Figura 4. Diagrama de flujo del comportamiento cinético del *Bifidobacterium* BB12, en el yogurt probiótico enriquecido con sucedáneo de leche de quinua.



3.4.1. Descripción del Proceso Experimental

➤ **Recepción de la materia prima**

En esta etapa se realizó la recepción de la leche, se filtró, para retener materias extrañas presentes, se analizó la densidad ($1,029\text{g/cm}^3$), pH (6,7), acidez (0,16% ácido láctico) y grasa (5,02%) en el equipo analizador LACTOSCAN LA.

➤ **Homogenizado**

Se adiciono el sucedáneo de leche de quinua (0%, 15% y 20%) a la leche entera de vaca, homogenizándolo para obtener uniformidad.

➤ **Pasteurización**

En esta operación se calentó la leche con agitación constante para que no se adhiriera en el fondo de la olla y fundamentalmente para destruir bacterias contaminantes (flora bacteriana competente del cultivo láctico). La temperatura adecuada de pasteurización fue de $85\text{ }^\circ\text{C}$ por 30 minutos (Gómez, 1999).

➤ **Enfriamiento**

Después de la pasteurización se enfrió a una temperatura de $42\text{ }^\circ\text{C}$ para llegar a una temperatura adecuada para el desarrollo de las bacterias ácido láctica del yogurt.

➤ **Inoculación**

Se inoculo con las cepas de *Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*, que se preparó y dosifico según lo indicado por el proveedor de los cultivos, aquí también se adiciono el cultivo probiótico (*Bifidobacterium* BB-12). La temperatura que se trabajo es de $42\text{ }^\circ\text{C}$.

➤ **Incubación**

En esta operación se colocó la muestra en la cámara incubadora por un tiempo de 6 horas a una temperatura constante de 42° C, para el desarrollo del coagulo.

➤ **Muestreo**

En esta etapa de la investigación se sacó muestras de 10 ml de muestra para la siembra de la bacteria probiótica estudiada (leche en proceso de fermentación) a los 0, 30, 60, 90, 120, 180, 240, 300 y 360 minutos. Así mismo se ha extraído muestras de 25 ml y 9 ml para determinar el pH y la acidez respectivamente.

➤ **Siembra**

En esta operación se realizó las diluciones para la siembra de la bacteria probiótica. Para *Bifidobacterium* se hizo la siembra por duplicado las diluciones bajas de 10^{-4} y 10^{-5} .

➤ **Incubación**

Se colocó las placas Petri estériles en forma invertida en las estufas calibradas a temperaturas indicadas para el desarrollo y crecimiento de las bacterias.

➤ **Conteo de colonias**

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

➤ **Pre procesamiento de datos**

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

➤ **Ajuste de curvas de crecimiento**

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

➤ **Determinación de parámetros**

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

➤ **Interpretación de resultados**

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

➤ **Refrigeración**

Se colocó en la refrigeradora, controlando una temperatura entre 4° - 10°C.

➤ Análisis Sensorial

Se realizó una prueba de escala hedónica de 7 puntos (Anexo 6), donde se convocaron a 16 evaluadores para calificar el yogur probiótico enriquecido con sucedáneo de leche de quinua y que calificaron según su agrado en cuestión de sabor, aroma y acidez.

3.5. MÉTODO DE ANÁLISIS

3.5.1. Método para el Análisis Microbiológico

3.5.1.1. Preparación de Muestras y Diluciones

Para la realización de los análisis microbiológicos, se utilizó la metodología propuesta por Montiel *et al.*, (2010). Utilizando 10 g de muestra, los cuales fueron diluidos en 90 ml de una solución de agua peptonada al 0.1% estéril. Posteriormente se realizó las diluciones decimales pertinentes, de las cuales se inoculó 1 mL, en placas Petri estériles (100 mm x 15 mm).

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

3.5.1.2. Cuantificación del *Bifidobacterium*

Se utilizó Agar MRS (De Man Rogosa Sharpe), el cual se disolvió en agua destilada desionizada, ajustando el pH a 5.7, posteriormente se esterilizó a 118°C durante 20 min. A las placas Petri estériles se les adicionó de 15 a 20 ml de medio de cultivo entre 40 y 45°C, se dejó solidificar para luego hacer la siembra en superficie de las muestras (10^{-5}

y 10^{-4}) homogenizadas, luego se incubaron entre 35 y 37°C, durante 72 horas, la cuantificación se realizó contando el número de unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/ml), con la ayuda de un contador de colonias.

3.5.2. Método para el análisis Físicoquímico

3.5.2.1. Determinación del pH

La medición del pH fue realizada a los 0, 30, 60, 90, 120, 180, 240, 300 y 360 minutos de incubación (proceso de fermentación) con un pH-metro marca SevenGo™ de METTLER TOLEDO, de acuerdo con el método de Coloma (2009). Se tomó 25 ml de muestra, en un vaso de 50 ml, posteriormente se midió el pH por introducción directa del electrodo en la misma.

3.5.2.2. Determinación de Acidez Titulable

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

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

Dónde:

ml NaOH: Gasto de NaOH

N: Normalidad del NaOH

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

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

3.5.3. Determinación de la Curva de Crecimiento y Parámetros de Crecimiento Cinético

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

3.5.3.1. Modelo Gompertz Modificado

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

El modelo utilizado queda expresado de la siguiente forma:

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

Dónde:

Log N: Es el logaritmo decimal (Log₁₀) del número de microorganismos (Log UFC/ml) al tiempo t.

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

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

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

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

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

- Velocidad máxima de crecimiento: $\mu_{\text{máx}} = \frac{BC}{e}$ (log UFC/ml)/hora
- Fase de latencia: $\lambda = M - \frac{1}{B}$ (horas)
- Tiempo de generación: $T_g = \log 2 \frac{e}{BC}$ (horas)

3.6. UNIDADES DE ANÁLISIS Y OBSERVACIONES

3.6.1. Factores de Estudio

- a) Temperatura constante: 42°C
- b) Porcentaje de sucedáneo de leche de quinua
 - 0%
 - 15%
 - 20%

3.6.2. Factores de Respuesta

- a) Parámetros cinéticos de crecimiento microbiano
 - Tiempo de adaptación (λ)
 - Velocidad máxima de crecimiento ($\mu_{\text{máx.}}$)
 - Tiempo de generación (T_g)
- b) Propiedades Fisicoquímicas
 - pH

- Acidez titulable (expresado en % ácido láctico)

c) Características Sensoriales

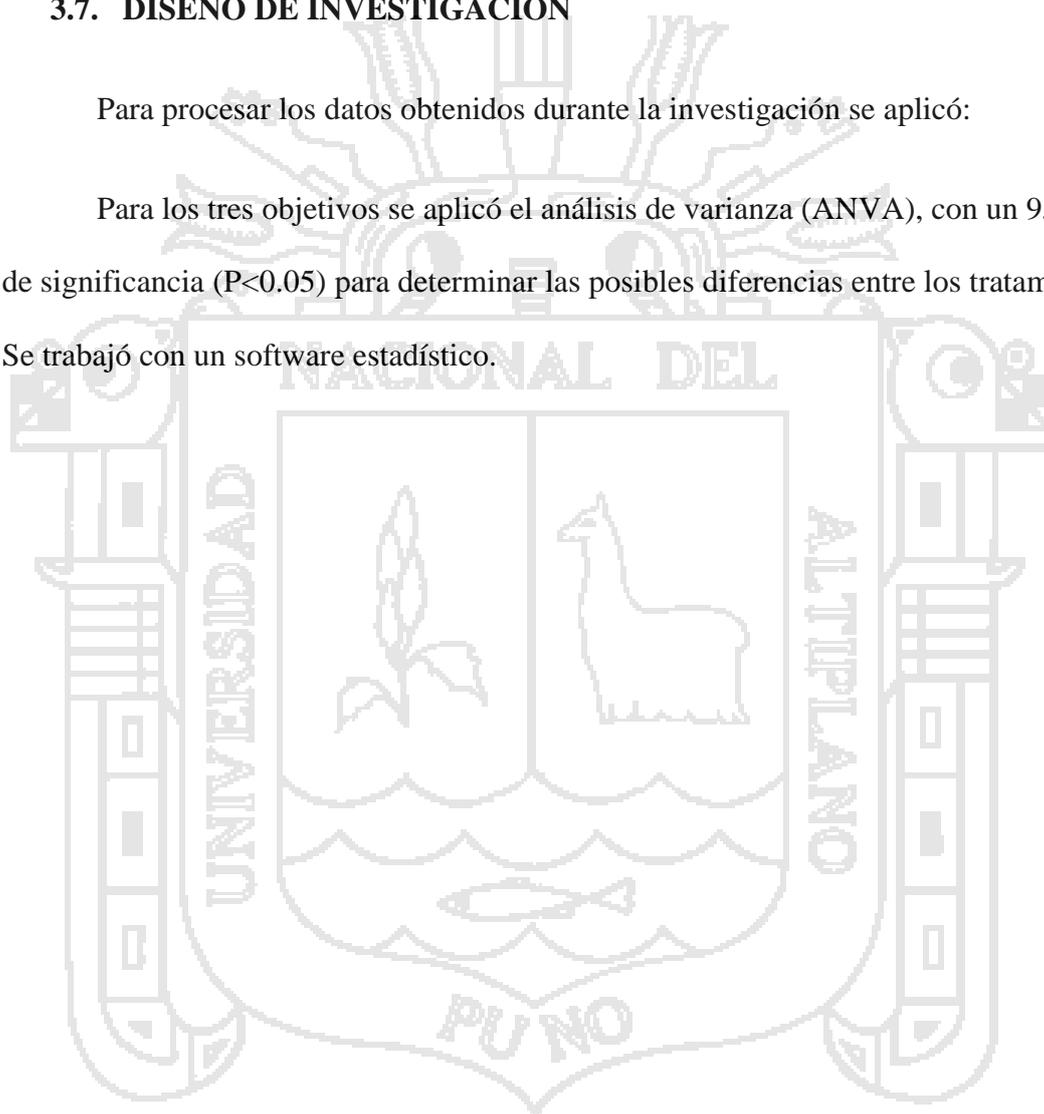
- Aroma
- Sabor
- Acidez

3.7. DISEÑO DE INVESTIGACIÓN

Para procesar los datos obtenidos durante la investigación se aplicó:

Para los tres objetivos se aplicó el análisis de varianza (ANVA), con un 95.0% de significancia ($P < 0.05$) para determinar las posibles diferencias entre los tratamientos.

Se trabajó con un software estadístico.



IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. TIEMPO DE ADAPTACIÓN (λ), TIEMPO DE GENERACIÓN (T_g) Y VELOCIDAD MÁXIMA DE CRECIMIENTO (μ_{max}) DEL *Bifidobacterium* BB12 EN EL PROCESO DE ELABORACIÓN DEL YOGURT PROBIÓTICO A DIFERENTES SUSTITUCIONES DE SUCEDÁNEO DE LECHE DE QUINUA (*Chenopodium quinoa* Wild)

Para el mejor entendimiento de los resultados se ha visto conveniente presentarlos en forma independientemente, siendo estos, los siguientes:

4.1.1. Tiempo de adaptación (λ) del *Bifidobacterium* en el proceso de elaboración del yogurt probiótico a diferentes sustituciones de sucedáneo de leche de quinua

En la Tabla 4, se presenta los resultados del tiempo de adaptación (λ), determinada con los valores (M y B) mostrado en el Anexo 1, obtenidos por la metodología de ajuste de la curva de crecimiento con el modelo matemático de Gompertz modificado expresado por (Gibson *et al.*, 1987); las curvas de crecimiento ajustadas para los 3 Tratamientos, se observan en las figuras del Anexo 3.

Tabla 4. Tiempo de Adaptación (λ) del *Bifidobacterium*

TRATAMIENTO	λ (horas)
T1 (0% sucedáneo de leche de quinua)	0,957
T2 (15% sucedáneo de leche de quinua)	1,049
T3 (20% sucedáneo de leche de quinua)	1,087

Las curvas de crecimiento del *Bifidobacterium* para los 3 tratamientos, observados en el Anexo 3 muestran la etapa de fase de latencia o adaptación. En este tiempo las bacterias se adaptan al nuevo ambiente y no existe o existe muy poco crecimiento según Castillo (2013). Según Buchanan y Klawitter (1991) esta fase es el período de ajuste durante el cual las células bacterianas se modifican por si mismas con el objetivo de sacar ventaja de las nuevas condiciones ambientales (de abundancia de nutrientes) e iniciar el crecimiento exponencial, Por lo que podemos citar que los microorganismos se toman el tiempo para adaptarse a su nuevo ambiente fisicoquímico según reportado por Sánchez (2003) y Duarte (1998). En la presente investigación se observó que a 0% se registró un tiempo de adaptación de 0,957 horas (57,42 min), mientras que a 15% se registró 1,049 horas (62,94 min) y a 20%, 1,087 horas (65,22 min); se observa que a medida que aumenta el porcentaje de sustitución de sucedáneo de leche de quinua el tiempo de adaptación del *Bifidobacterium* es más largo. Por lo que coincidimos con lo aportado por Fu (2012) a medida que aumenta la concentración de nutrientes en el medio la fase de adaptación se incrementa; y como indica Buchanan y Cygnarowicz (1990) que la duración de la fase de latencia se ve afectada por factores como el fenotipo de la bacteria, el tamaño del inóculo, los cambios en el medio físico-químico, tales como la temperatura, el pH y la disponibilidad de nutrientes.

Tabla 5. Análisis de Varianza (ANVA) del tiempo de adaptación (λ) del *Bifidobacterium*.

F. de V.	G.L.	S.C.	C.M.	RAZÓN-F	VALOR-P	Significancia
Tratamientos	2	0,467	0,233	6,47	0,032	*
Error exptal	6	0,216	0,036			
Total	8	0,683				

En la Tabla 5 se presenta el análisis de varianza (ANVA) observándose que existe una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) entre los tiempos de adaptación del *Bifidobacterium* en los diferentes niveles de sustitución de sucedáneo de leche de quinua), con un nivel de confianza del 95,0 %.

El coeficiente de determinación (R^2) indica que el modelo así ajustado explica 68,33% de la variabilidad en el tiempo de adaptación (λ). El coeficiente de determinación ajustada (R^2), que es más apropiada para comparar el modelo con diferente número de variables independientes, es 57,78%, datos que coincide con lo reportado por Rodríguez (2003), entre 48,30 y 68,53, estos valores bajos se debe a lo mencionado por Agatangelo (2007) un bajo R^2 ajustado podría ser porque es usado con datos recientes y posiblemente expone un comportamiento lógico. Cabe indicar que en este nivel de sustitución el tiempo de adaptación es influido por la sustitución y un 42,22% es influido por otros factores (factores ambientales y nutricionales).

4.1.2. Tiempo de Generación (T_g) del *Bifidobacterium* en el proceso de elaboración del yogurt probiótico a diferentes sustituciones de sucedáneo de leche de quinua

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

El tiempo de generación es el intervalo de tiempo requerido para que el *Bifidobacterium* empiece a duplicarse. Lo que indica que el nivel de sustitución de sucedáneo de leche de quinua influye en el tiempo de generación.

Agatangelo (2007) indica que cada célula se divide en un momento ligeramente diferente al resto, y la curva de crecimiento aumenta suavemente; según Garcia (1995) es el tiempo que tarda una población en reproducirse hasta alcanzar el doble de población o lo que es lo mismo el tiempo medio que tarda una célula en reproducirse; y según Mateos (2010) el tiempo que requiere una célula para completar su ciclo es muy variable y depende de factores nutricionales y genéticos. En la investigación se observa que a 0% se alcanzó un Tg de 0,311 horas (18,66 min), para 15% un Tg de 0,390 horas (23,40 min) y para 20% un Tg de 0,169 horas (10,14 min). Según Madigan *et al.* (1997) la mayoría de las bacterias tienen tiempos de generación de 1 a 3 horas, conociéndose pocos microorganismos que crezcan muy rápidamente dividiéndose en menos de 10 minutos, dato que coincide con el tratamiento al 20% con 10,14 minutos, esto puede ser a las altas concentraciones de nutrientes y a un valor alto de la μ_{max} como lo menciona Yousef y Carlstrom (2006), que durante la fase exponencial, el tiempo de generación alcanza valores bajos debido a que la velocidad máxima de crecimiento alcanza valores elevados. Pisabarro (1998) indica que los tiempos de generación de bacterias en ambientes favorables pueden ser muy cortos (valores de Tg de 20 minutos), en la presente investigación se observó valores cercanos en los tratamientos al 0 y 15%, para lo cual mencionamos que el medio ambiente es óptimo para el crecimiento del *Bifidobacterium*.

Los datos menores de tiempos de generación observados en los 3 tratamientos de la presente investigación pueden estar atribuidos a lo mencionado por Agatangelo (2007) quien indica que el incremento del pH disminuye el tiempo de generación en las bacterias, esto puede ser por varios factores como lo menciona Sánchez (2012) varía significativamente según la especie bacteriana y según las condiciones del medio de cultivo; también como el fenotipo de la bacteria, el tamaño del inóculo, y por los

cambios en el medio físico-químico, tales como el pH y sobre todo por la disponibilidad de nutrientes (Buchanan y Cygnarowicz, 1990).

En la Tabla 6 se muestra el análisis de varianza (ANVA) observándose que existe una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) entre los tiempos de generación del *Bifidobacterium* y los diferentes niveles de sustitución de sucedáneo de leche de quinua, con un nivel de confianza del 95,0 %. Con un coeficiente de determinación (R^2) de 65,96% y ajustada (R^2), de 55,09%, estos valores bajos se debe a lo mencionado por Agatangelo (2007). El 44,91% nos indica que el tiempo de generación puede haber sido afectada por otros factores como el incremento del pH de 4,63-5,33 y las altas concentraciones de nutrientes (niveles de sustitución de sucedáneo de leche de quinua de 0-20%) lo que significa que coincide con el tratamiento 20% el tiempo de generación se reduce, pero en el caso del tratamiento al 15% es mayor al tratamiento anterior, esto podría ser a causa de las bajas concentraciones de nutrientes (sucedáneo de leche de quinua al 15%); u otros factores como indica Buchanan y Cygnarowicz (1990).

Tabla 6. Análisis de Varianza (ANVA) para el tiempo de generación (Tg) del *Bifidobacterium*.

F. de V.	G.L.	S.C.	C.M.	RAZÓN-F	VALOR-P	Significancia
Tratamientos	2	0,188	0,093	5,72	0,041	*
Error exptal.	6	0,097	0,016			
Total	8	0,285				

En conclusión el *Bifidobacterium* crece y se duplica más rápido que otras bacterias y esto va relacionado a la concentración de nutrientes (nivel de sustitución del sucedáneo de leche de quinua) y a valores elevados de la velocidad máxima de

crecimiento como lo indica Yousef y Carlstrom (2006). Por lo tanto Chr Hansen (2006) menciona que el crecimiento es mucho más rápido con menor tiempo de generación.

4.1.3. Velocidad Máxima de Crecimiento (μ_{\max}) del *Bifidobacterium* en el proceso de elaboración del yogurt probiótico a diferentes sustituciones de sucedáneo de leche de quinua.

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

La velocidad máxima de crecimiento es de considerable importancia a nivel industrial, debido a que es en este punto donde se obtiene el valor máximo de μ a niveles de saturación de sustrato, donde a medida que aumenta la densidad de población decrece la concentración del sustrato limitante del crecimiento, causando un descenso de μ (Sánchez, 2003) (Duarte, 1998).

El coeficiente de determinación (R^2) indica que el modelo así ajustado explica 65,77% de la variabilidad en la velocidad máxima de crecimiento (μ_{\max}). El coeficiente de determinación ajustada (R^2), que es más apropiada para comparar el modelo con un diferente número de variables independientes, es 54,30%, estos valores bajos se debe a lo mencionado por Agatangelo (2007). Este efecto significativo del % de sustitución demuestra la variación de los resultados obtenidos en la presente investigación; donde se observa que a 0% se alcanzó un μ_{\max} de 0,968 Log UFC/ml/hora, para 15% un μ_{\max} de 0,771 Log UFC/ml/hora y para 20% un μ_{\max} de 1,780 Log UFC/ml/hora. En donde Montes (2013) indica que en promedio las bacterias poseen de valores de μ_{\max} cercanos a 0,9 UFC/ml/hora; pero Saura (2003) reporta

valores de 0,6-1,0 UFC/ml/hora, datos que coincide con los tratamientos 1 y 2 donde Orozco (2003) reporta que la velocidad de crecimiento específica depende de la concentración de nutrientes, a altas concentraciones la velocidad de crecimiento específica alcanza valores máximos. De acuerdo a lo reportado la velocidad máxima de crecimiento del tratamiento 3 están directamente relacionados con el porcentaje de sustitución de sucedáneo de leche de quinua como menciona Farnworth *et al.* (2007) el crecimiento del *Bifidobacterium* depende de los aminoácidos disponibles que son liberados por bacterias proteolíticas, las cuales fueron utilizadas como iniciadores; sin embargo los aminoácidos esenciales están presentes también en la quinua, contribuyendo en el crecimiento de las bacterias.

En la Tabla 7 se muestra el análisis de varianza (ANVA) observándose que existe una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) entre un tratamiento y otro, con un nivel de 95,0 % de confianza. Por lo que la velocidad máxima de crecimiento es afectada por el incremento de la acidez en el medio y es menor en los tratamientos donde mayor acidificación tiene (Cury, 2013) coincidiendo con el tratamiento 2 que es baja la concentración de nutrientes, y todo lo contrario en el tratamiento 3 donde la acidez es baja, μ_{max} y la concentración de nutrientes es alta como lo reporta Orozco (2003).

Tabla 7. Análisis de Varianza (ANVA) para Velocidad Máxima de Crecimiento ($\mu_{máx}$) del *Bifidobacterium*.

F. de V.	G.L.	S.C.	C.M.	RAZÓN-F	VALOR-P	Significancia
Tratamientos	2	1,681	0,840	5,76	0,0401	*
Error exptal	6	0,875	0,146			
Total	8	2,556				

4.2. DETERMINACIÓN DEL PH Y ACIDEZ EN EL PROCESO DE ELABORACIÓN DEL YOGURT PROBIÓTICO ENRIQUECIDO CON SUCEDÁNEO DE LECHE DE QUINUA

4.2.1. Determinación del pH

En la Figura 5 se muestra la evolución del pH a lo largo del proceso de fermentación de la leche durante la incubación, desde las 0 minutos a 360 minutos, resultados mostrados en el Anexo 4.

Como se observa en la Figura 5, el proceso de fermentación comprendida entre las 0 a 360 minutos (0 a 6 horas) se produce un descenso del pH en los 3 tratamientos a diferentes porcentajes de sustitución de sucedáneo de leche de quinua donde alcanzan valores de 4,63 al 0%, 4,87 al 15% y 5,33 al 20%. Según Scardovi (1996) el pH requerido para el crecimiento del *Bifidobacterium* oscila entre 6,5 – 7, y a $\text{pH} < 6,5$ el crecimiento es muy lento y a $\text{pH} > 8$ no existe crecimiento.

En el tratamiento 1 que es al 0% en los primeros 30 minutos fue óptimo el crecimiento del *Bifidobacterium*, pero los siguientes 330 minutos el crecimiento es más lento, llegando a un pH final de 4,63; datos similares fueron reportados por Cruz (2008) en un producto fermentado con licuado de soya con un pH de 4,60 después de 6 horas de fermentación; y un pH de 4,64 en un yogurt con cepas probióticas (cepas de *Bifidobacterium* y *Lactobacillus acidophilus*) (por Ruiz *et al.*, 2009).

En los tratamientos 2 al 15% tiene un pH de 4,87 y 3 al 20% con 5,33, que entre 0 a 90 minutos tiene el pH óptimo para el crecimiento del *Bifidobacterium*, pero a los siguientes 120 minutos hasta los 360 minutos el pH desciende y el crecimiento es más lento. Estos datos coinciden con lo mencionado por Gómez (1999) y Díaz *et al.*, (2004) que el pH desciende por acción de la fermentación microbiológica de la lactosa y por las

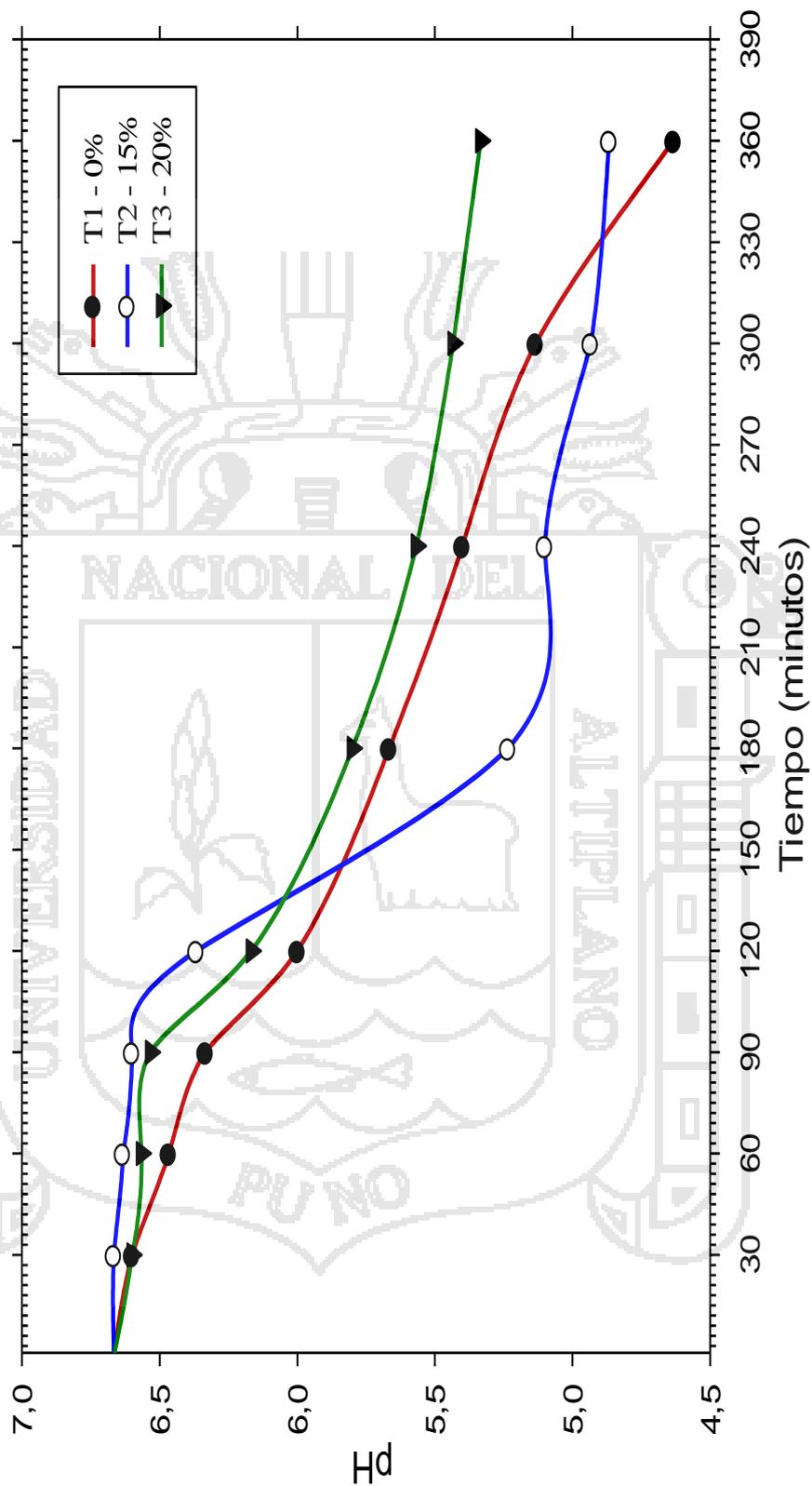
bacterias ácido lácticas (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *Streptococcus salivarius* subsp. *termophilus*). En conclusión el aumento de los niveles de sustitución de sucedáneo de leche de quinua 0-20% aumenta el valor del pH, es decir, que a más concentración de nutrientes (sucedáneo de leche de quinua) más alto es el pH. Para lo cual afirmamos que si aumentamos el nivel de sustitución, la velocidad de crecimiento del *Bifidobacterium* tendría un valor alto, un tiempo de generación muy rápido, pero el tiempo de adaptación sería demasiado largo, es decir, que el proceso de elaboración este yogurt sería más de 6 horas.

El análisis de varianza mostrado en la Tabla 8 se observa que no existe una diferencia estadísticamente significativa ($p > 0,05$) sobre el pH con un 95,0% de nivel de confianza. Es decir que no existe efecto alguno sobre el pH, para los 3 tratamientos (0%, 15% y 20% de sucedáneo de leche de quinua).

Tabla 8. Análisis de varianza (ANVA) para la variación de pH.

F. de V.	G.L.	S.C.	C.M.	RAZÓN-F	VALOR-P	Significancia
Tratamientos	2	0,004	0,002	0,49	0,635	n.s.
Error exptal.	6	0,025	0,004			
Total	8	0,029				

Figura 5. Descenso del pH para los 3 tratamientos



4.2.2. Determinación de la Acidez

En la Figura 6, se muestra la variación de la acidez expresado en % de ácido láctico, durante el proceso de fermentación desde las 0 a 6 horas (360 minutos). Los resultados para los diferentes tratamientos se muestran en el Anexo 5.

En los tratamientos 1 (0%), 2 (15%) y 3 (20%) reportaron valores 0,94; 1,0 y 0,87 % de ácido láctico respectivamente, datos que coinciden con los tratamientos 1 y 3 con lo reportado por Mora *et al.* (2014) que tiene valores de 0,8 – 1 % de ácido láctico en el yogur probiótico de aguaymanto enriquecido con quinua; el tratamiento 2 se encuentra en el rango de acidez reportado por Briceño *et al.*, (2001) y Ramírez, (2007) que menciona los valores de acidez del *Bifidobacterium* que se encuentra entre 1,00 - 1,79% de ácido láctico. Arenas *et al.* (2012), investigo la leche fermentada enriquecida con quinua utilizando una mezcla comercial de BAL y bacterias probióticas, en donde la acidez titulable aumentó con la adición de harina de quinua alcanzando el requerimiento más rápidamente, seguramente producido por la mayor actividad del cultivo ácido láctico ya que se observó mayor crecimiento de BAL en los tratamientos con adición de quinua, lo que sugiere un posible efecto prebiótico.

Arenas (2012), Ventura *et al.* (2007), (Roy (2005) y Hansen (2004) mencionan que durante el tránsito en el tracto gastrointestinal las bífidobacterias son muy estables y tienen una alta resistencia a las condiciones extremas de acidez en el estómago y a la inmediata presencia de sales biliares del duodeno para asegurar su funcionalidad, por lo tanto pueden llegar a su sitio de acción para colonizar y ejercer su efecto probiótico. Pocos fabricantes evalúan la supervivencia de las diferentes cepas en sus fórmulas. Y si las cepas no resisten los ácidos estomacales y la bilis del intestino, los beneficios de los probióticos se ven severamente reducidos, por lo que mencionamos que el

Bifidobacterium tiene tolerancia a la acidez en valores menores de los óptimos. En conclusión el mejor tratamiento para un mejor crecimiento de las bífidobacterias es el 2 con un 15% de sucedáneo de leche de quinua, ya que coincide su acidez con lo reportado por Briceño *et al.*, (2001) y Ramírez, (2007), es decir, que el *Bifidobacterium* se encuentra en un medio con acidez óptima para su crecimiento. Por lo que a un incremento mayor de 15% de sucedáneo de leche de quinua el crecimiento del *Bifidobacterium* es lento ya que tiene menores valores de acidez con respecto al óptimo.

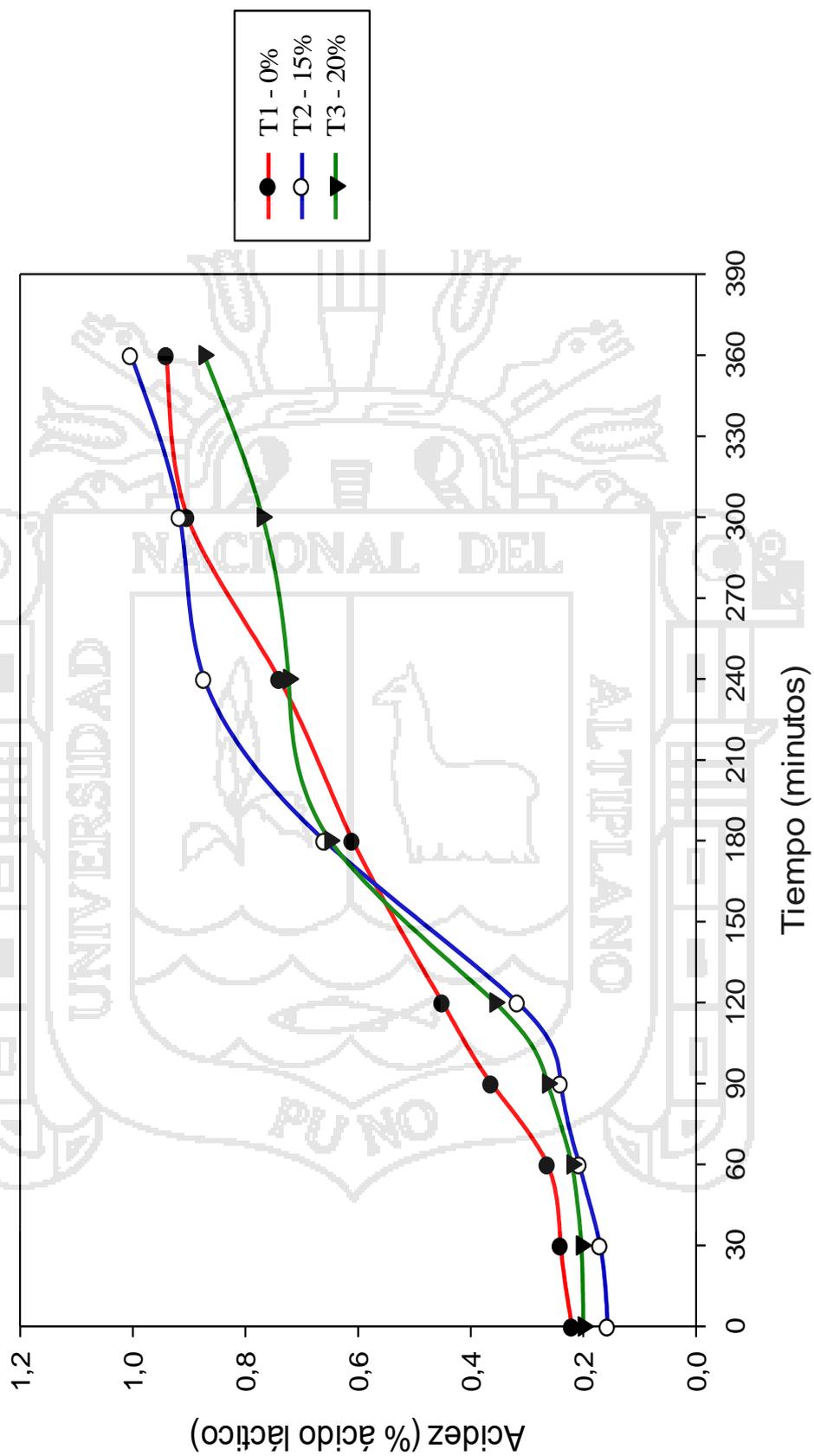
El análisis de varianza mostrado en la Tabla 9 se observa que no existe una diferencia estadísticamente significativa ($p > 0,05$) entre la media de acidez entre un porcentaje de sucedáneo de leche de quinua y otro, con un 95,0% de nivel de confianza.

Tabla 9. Análisis de varianza (ANVA) para la variación de acidez.

F. de V.	G.L.	S.C.	C.M.	RAZÓN-F	VALOR-P	Significancia
Tratamientos	2	0,004	0,002	0,49	0,637	n.s.
Error exptal	6	0,0264	0,004			
Total	8	0,031				

Por lo que se podría decir que la leche aunque sea incubado a diferentes porcentajes de sucedáneo de leche de quinua (0%, 15% y 20%), el comportamiento de la acidez a lo largo del proceso de elaboración. no será diferente en cada tratamiento.

Figura 6. Desarrollo de la acidez (% ácido láctico) para los 3 tratamientos.



4.3. DETERMINAR LAS CARACTERÍSTICAS SENSORIALES (SABOR, AROMA Y ACIDEZ)

Para el mejor entendimiento de los análisis y mayor precisión de los resultados se ha visto conveniente presentar los resultados del estudio en forma independientemente:

4.3.1. Sabor

Reyes (2008) indica que la fermentación de la lactosa (el azúcar de la leche) en ácido láctico es lo que da al yogur su textura y sabor tan distintivo. Se realizó la prueba de comparación múltiple de Tukey mostrado en la Tabla 10, el sabor más aceptado por los evaluadores fue del yogur probiótico con 15% de sucedáneo de leche de quinua mostrados en el Anexo 8, donde se observa el 1,00% de ácido láctico, valor que se encuentra dentro de los rangos y que a su vez aporta con el sabor ácido y fresco de las leches fermentadas (Olivera, 2011); seguido del tratamiento con 0% que no muestra diferencias estadísticamente significativas y está a la vez con el tratamiento con 20% que también no muestra diferencias estadísticamente significativas, pero si existe diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95,0% de confianza entre los tratamientos 15% y 20%, donde el sabor a quinua es mínima al 15% mientras que en el 20% se siente con intensidad.

Tabla 10. Prueba de comparación múltiple de Tukey del Sabor

TRATAMIENTOS	Media	Separación de medias Tukey (P<0.05) *
T2 (15% Sucedáneo de leche de Quinua)	6,13±0,81	A
T1 (0% Sucedáneo de leche de Quinua)	5,75±0,86	A B
T3 (20% Sucedáneo de leche de Quinua)	4,92±1,34	B

*Tratamientos seguidos de diferente letra son significativamente diferentes (P<0.05).

Estos resultados probablemente se deben a la incorporación de *Lb. bulgaricus*, *S. thermophilus* y *Bifidobacterium* que garantizan la producción de características agradables y beneficiosas en la leche, ya que prolongan la vida útil, y producen un sabor y consistencia agradable; además de contribuir a la buena salud de las personas que los consumen habitualmente. Mateos (2004) indica que al yogur se puede agregar saborizantes o trozos de frutas, aunque algunos consumidores lo prefieren en forma natural.

El análisis de varianza mostrado en la Tabla 11 se observa que existe una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$), entre la media de aroma entre un tratamiento y otro, con un nivel del 95,0%. Concluimos que el % de ácido láctico en el tratamiento con 15% de sucedáneo de leche de quinua con acidez de 1,00% de ácido láctico influye en el sabor del yogur probiótico enriquecido con sucedáneo de leche de quinua.

Tabla 11. Análisis de varianza (ANVA) para la variación del sabor.

F. de V.	G.L.	S.C.	C.M.	RAZÓN-F	VALOR-P	Significancia
Tratamientos	2	11,7917	5,89583	5,56	0,0069	*
Error exptal	45	47,6875	1,05972			
Total	47	59,4792				

4.3.2. Aroma

Reyes (2008) reporta que la dependencia entre ambas bacterias se da inicialmente porque actividad la proteolítica del *Lb. bulgaricus* estimula el crecimiento de del *S. thermophilus* por la liberación de aminoácidos y péptidos de la leche, que dan cuerpo y aroma al yogur. En la Tabla 12 se observa que el tratamiento 2 (yogur probiótico con

15% de sucedáneo de leche de quinua) con un pH de 4,87 fue el más aceptado por los evaluadores, seguido de los tratamientos 1 y 3 con pH de 4,63 y 5,33 respectivamente, grafico mostrado en el Anexo 8. Como Amiot (1991) indica que el descenso del pH contribuye al aroma característico del yogur. Se realizó la prueba de comparación múltiple de Tukey mostrado en la Tabla 12 donde nos indica que no hay diferencia estadísticamente significativa entre los tratamientos 15% - 0% y 0% - 20%, pero si existe diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95,0% de confianza entre los tratamientos 15% y 20%.

Tabla 12. Prueba de comparación múltiple de Tukey del Aroma

TRATAMIENTOS	Media	Separación de medias Tukey (P<0.05) *
T2 (15% Sucedáneo de leche de Quinua)	5,94±0,68	A
T1 (0% Sucedáneo de leche de Quinua)	5,44±0,73	A B
T3 (20% Sucedáneo de leche de Quinua)	4,88±0,62	B

***Tratamientos seguidos de diferente letra son significativamente diferentes (P<0.05).**

A estos resultados Mejia (2006) indica que los productos lácteos tienen mayor aceptación cuando se añaden productos saborizantes, por lo que se debe tomar en cuenta la referencia que exige la Norma general para Aditivos alimentarios (CODEX STAN 192-2000) en el que el yogur debe presentar un aroma característico del producto fresco.

Concluyendo podemos indicar que el pH no influye en el aroma del yogurt probiótico enriquecido con sucedáneo de leche de quinua. Es decir que el aroma del yogurt es mínimamente percibido.

El análisis de varianza mostrado en la Tabla 13 se observa que existe una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$), entre la media de aroma entre un tratamiento y otro, con un nivel del 95,0% de confianza.

Tabla 13. Análisis de varianza (ANVA) para la variación del aroma.

F. de V.	G.L.	S.C.	C.M.	RAZÓN-F	VALOR-P	Significancia
Tratamientos	2	9,04167	4,52083	9,86	0,0003	*
Error exptal	45	20,625	0,458333			
Total	47	29,6667				

4.3.3. Acidez

Gomez (1999) indica que el sabor ácido característico del yogur es causado principalmente por la formación de ácido láctico, originado por las bacterias ácidos lácticas que atacan a la lactosa y que además el ácido láctico es parte esencial en la elaboración de yogur. La acidez más aceptado por los evaluadores fue el del yogur probiótico con 15% de sucedáneo de leche de quinua que tiene 1,00 % de ácido láctico, seguido de los tratamientos de 0% y 20 con 0,94 y 0,87% de ácido láctico respectivamente, grafico mostrado en el Anexo 8. Se realizó la prueba de comparación múltiple de Tukey mostrado en la Tabla 14 donde nos indica que no hay diferencia estadísticamente significativa entre los tratamientos 15% - 0% y 0% - 20%, pero si existe diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95,0% de confianza entre los tratamientos 15% y 20%.

Tabla 14. Acidez

TRATAMIENTOS	Media	Separación de medias Tukey (P<0.05) *
T2 (15% Sucedáneo de leche de Quinua)	5,69±0.79	A
T1 (0% Sucedáneo de leche de Quinua)	5,06±0,68	A B
T3 (20% Sucedáneo de leche de Quinua)	4,94±1,03	B

*Tratamientos seguidos de diferente letra son significativamente diferentes (P<0.05).

Por tal razón podemos mencionar que el % de ácido láctico influye en la acidez del yogurt probiótico enriquecido con sucedáneo de leche de quinua, es decir que mientras más bajo sea la acidez en combinación de sucedáneo de leche de quinua menos tendrá la aceptación de los consumidores.

El análisis de varianza mostrado en la Tabla 15 se observa que existe una diferencia estadísticamente significativa ($p<0,05$), entre la media de la acidez entre un tratamiento y otro, con un nivel del 95,0%.

Tabla 15. Análisis de varianza (ANVA) para la variación de la acidez.

F. de V.	G.L.	S.C.	C.M.	RAZÓN-F	VALOR-P	Significancia
Tratamientos	2	10,1667	5,08333	7,08	0,0021	*
Error exptal	45	32,3125	0,718056			
Total	47	42,4792				

V. CONCLUSIONES

1. Para el *Bifidobacterium*, el Tiempo de Adaptación (λ) es influido por el nivel de sustitución de sucedáneo de leche de quinua, a medida que aumenta los niveles de sustitución, la adaptación del *Bifidobacterium* es más lento; el Tiempo de Generación (T_g) es influido por el nivel de sustitución de sucedáneo de leche de quinua y el pH, el *Bifidobacterium* crece y se duplica en menos tiempo que otros microorganismos; la Velocidad Máxima de Crecimiento ($\mu_{m\acute{a}x}$) es influida por el nivel de sustitución de sucedáneo de leche de quinua, este valor se incrementa a medida que aumenta la concentración de nutrientes (sucedáneo de leche de quinua). Y por último podemos mencionar que el tratamiento 2 (15%) obtuvo valores $>10^7$ UFC/ml por lo que se considera un yogurt probiótico.
2. Los valores de pH obtenidos fueron influenciados por el nivel de sustitución de leche de quinua, a mayor nivel sustitución los valores de pH aumentan. En la acidez (% ácido láctico) no es influido por el nivel de sustitución de sucedáneo de leche de quinua, pero podemos afirmar que la sustitución más adecuada es de 15% porque su valor de acidez se encuentra en los rangos permitidos.
3. El análisis sensorial fue influenciada por la adición de distintos porcentajes de sustitución de sucedáneo de leche de quinua. En general el tratamiento mejor aceptado por los jueces fue el 2 con 15 % de sucedáneo de leche de quinua, seguido de los tratamientos 1 y 3, esto se dio para el sabor, aroma y acidez. El sabor y acidez es influido por el % de ácido láctico y el aroma es influido por el pH.

VI. RECOMENDACIONES

Se recomienda lo siguiente:

1. Estudiar el efecto de la inclusión de otros cereales andinos en el yogur para determinar su efecto en la composición física, química, microbiológica, y organoléptica.



VII. BIBLIOGRAFÍA

- Agatangelo, D.S.E. (2007). Estudio del Comportamiento Cinético de Microorganismos de Interés en Seguridad Alimentaria con Modelos Matemáticos. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona. España.
- Aguirre J. y Aquino E. (2008). Microbiología Predictiva. Universidad Nacional De Trujillo. Trujillo, Perú. 2.
- Alatraste. K. (2002). Efecto de Adición De Fibra y Calcio en un Yogurt con Sabor. La 17 th edición. Association Analytical Chemist.
- Amiot B.H. (1991). yoghurt alimento indiscutible. Rev Ind. Aliment;13; 26-31. La Habana.
- Ankenman L., (1996). Improved Acid, Flavor And Volatile Compound Production In A High Protein And Fiber Soymilk Yogurt-Like Product. J. Food Science. 61(2): 331-336.
- Apaza V., Delgado P. (2005). Manejo Y Mejoramiento De Quinoa Orgánica. Instituto Nacional de Investigación y Extensión Agraria-INIA. Estación Experimental Agraria Illpa-Puno. Puno-Perú.
- Aportela, A. (2003). Estudio de las Propiedades Físicas, Químicas y Sensoriales en un Yogurt Saborizado, Enriquecido Con Fibra Y Calcio. Tesis de Licenciatura. UDLA. Puebla – México.
- Arenas, C., Zapata, R., Gutiérrez, C. (2012). Evaluación De La Fermentación Láctica De Leche Con Adición De Quinoa (Chenopodium Quinoa), Evaluation Of The Lactic Fermentation Of Milk With Addition Of Quinoa (Chenopodium Quinoa) Ingeniería Química. Universidad Nacional De Colombia .Sede Bogotá. Instituto De Ciencia Y Tecnología De Alimentos. Universidad Nacional De Colombia.

- Baranyi, J. and Roberts, T. A. (1994). A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. *International Journal of Food Microbiology* 23:277– 294.
- Briceño, A., Martínez R. y García K., (2001). Viabilidad y actividad de la flora láctica (*Streptococcus salivarius* subsp *thermophilus* *Lactobacillus delbrueckii* subsp *bulgaricus*) del yogurt en Venezuela. *Acta Científica Venezolana*. 52(1):46-54.
- Buchanan, R. L.; Cygnarowicz, M. L. (1990). A mathematical approach toward defining and calculating the duration of the lag phase. *Food Microbiology* 7: 237 – 240.
- Buchanan, R. L.; Klawitter, L. A. (1991). Effect of temperature history on the growth of *Listeria monocytogenes* Scott A at refrigeration temperatures. *International Journal of Food Microbiology* 12:235 – 246.
- Burns P.G., (2010). Cultivos Probióticos Para Productos Lácteos. Respuesta A Nuevos Desafíos Tecnológicos Y Estrategias Para Mejorar Cepas. Universidad Nacional Del Litoral. Facultad De Bioquímica Y Ciencias Biológicas.
- Cabeza, H. E. A. (2013). El Modelo Modificado de Gompertz, Logístico y Modificado Logístico para el ajuste de datos de crecimiento microbiano. Universidad de Pamplona. Colombia: 2-13.
- Cayré, M. E.; Vignolo, G.; Garro, O. (2010). Validación y Comparación de modelos de Crecimiento Microbiano. UNNE. Facultad de Agroindustrias. Argentina.
- Chassy, B., Hlywka, J. J., Kleter, G. A., Kok, E. J., Kuiper, H. A., McGloughlin, M., Munro, I. C., Phipps, R. H., y Reid, R. H. (2006). Capítulo 2: Improved Nutritional Quality through Modern Biotechnology. En: *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety. Nutritional and Safety Assessments of Foods and Feeds Nutritionally Improved through Biotechnology*. ILSI. Pp. 53-54
- Chr. Hansen (2004). FD-DVS BB-12 Probio-Tec, Información de Producto.
- Chr. Hansen (2006). Leche y yogurt. Bio Loncoleche. B. *animalis* spp. *lactis* Bb12.

- Collins, M.D., Gibson, G.R., (1999). Probiotics, prebiotics and synbiotics: approaches for modulating the microbial ecology of the gut. *Am. J. Clin. Nutr.* 69, 1052-1057.
- Coloma, A. (2009). *Métodos de Análisis Agroindustrial: Manual de prácticas de laboratorio.* Universidad Nacional del Altiplano. Puno – Perú.
- Collado, M. C., (2004). Production of bacteriocin-like inhibitory compounds by human fecal *Bifidobacterium* strains. *J Food Prot* 68: 1034-1040.
- Collado, C.M., y Sanz, Y. (2007). Induction of acid resistance in *Bifidobacterium*: a mechanism for improving desirable traits of potentially probiotic strains. *Journal of Applied Microbiology* 103, 1147-1157.
- Cruz, C. 2008. Efecto de la ultra alta presión de homogenización en el licuado de soja y su comportamiento en el desarrollo de un producto fermentado. Memoria para optar el Grado De Doctor En Ciencias De Los Alimentos. Universidad Autónoma De Barcelona.
- Cury, K. (2013). Evaluación Del Proceso De Fermentación Del Lactosuero Ácido (Entero Y Desproteínizado) Utilizando *Lactobacillus*. Título Académico De Máster En Ciencias Agroalimentarias Con Énfasis En Tecnología De Los Alimentos. Universidad De Córdoba Facultad De Ingenierías Maestría En Ciencias Agroalimentarias Berástegui, Córdoba.
- Dairy & Food Culture Technologies. 2006. Products with Probiotics. Consultado en el 2014. Disponible en: <http://www.usprobiotics.org>.
- Del Fabbro P. (2001). Efecto del tipo de sal de calcio en las Características Físicoquímicas y Sensoriales del yogurt con Sabor. Tesis de Licenciatura. UDLA. Puebla – México.

- Dellaglio, F., Torriani, S., Vlaeminck, G., Cornet, R. 1992. Specific Characteristics Of Microorganisms Used For New Fermented Milks. Bulletin Of The IDF 277.
- Diaz B. (2002). Evaluación del Efecto de la Adición de Fibra y Modificación del Nivel de Grasa en las Propiedades Físicas y Reológicas y Sensoriales del Yogurt.
- Díaz, J.; Sosa, M. E.; Vélez, J. F. (2004). Efecto de la adición de fibra y disminución de grasa en las propiedades fisicoquímicas del yogur. Revista Mexicana de Ingeniería Química. Vol. 3. 287 – 305.
- Delignette-Muller, M. L. (1998). Relation between the generation time and the lag time of bacterial growth kinetics. International Journal of Food Microbiology 43: 97 – 104.
- Duarte, P. (1998). Biotecnología de la fermentación, Primera Edición, Editorial Acriba S.A., Zaragoza (España).
- Farnworth, E. (2003). Handbook of fermented functional foods. Crc press. 390pp. Washington, D.C. Pp. 27, 113, 277.
- Farnworth ER, Mainville I, Desjardins M, Gardner N, Fliss I, Champagne C. (2007). Growth of probiotic bacteria and bifidobacteria in a soy yogurt formulation. Inter J Food Microbiol.; 116: 174-181.
- Fennema, O. R. (2000). Química de los alimentos. 2ª edición. Editorial Acriba. Zaragoza (España).
- FAO/OMS (2001). International Year of Quinoa Secretariat.Regional Office for Latin America and the Caribbean, Av. Dag Hammarskjöld 3241, Vitacura, Santiago, Chile. rlc-quinoa@fao.org.
- FAO (2005). Probióticos: utilidad clínica. Consultado en el 2014. Disponible en: <http://colombiamedica.univalle.edu.co/Vol37No4/html/v37n4a08.html>

- Fu, w. (2012). Lactic Acid Pruduccion From Lactose by *Lactobacillus Plantarum*: Kinetic Model and EFFECTS OF Ph, Substrate, and Oxygen. *Science Direct. Biochem Eng J*.
- Fuller, R. (1994). *Probiotics: The Scientific Basis*. Ed: Chapman and Hall, London. Paris.
- Garcia, R. (1995). *Modificaciones Microbiológicas, Fisicoquímicas Y Organolépticas De Vegetales Envasados En Atmósfera Modificada. Bases Para El Establecimiento De Los Modelos Predictivos Del Crecimiento Microbiano*. Universidad De Cordoba Facultad De Veterinaria Departamento De Bromatologia Y Tecnologia De Los Alimentos Tesis Doctoral.
- Gardiner J.S., Jarvis W.R., Emori T.G., Horau T.C., Hughes J.M., (1999). Definitions For Nosocomial Infections. *Am J Infect Control*; 16: 128-40.
- Gibson, A.M.; Bratchell, N.; Roberts, T.A. (1987). The effect of sodium chloride and temperature on rate and extent of growth of *Clostridium botulinum* type A in pasteurized pork slurry. *J. Appl. Bacteriol.* 62: 479-490.
- Gibson, A. M.; Bratchell, N.; Roberts, A. (1988). Predicting microbial growth: growth responses of salmonellae in laboratory medium as affected by pH, sodium chloride and storage temperature. *International Journal of Food Microbiology* 6:155 –178.
- Gómez, J. C., (1999). Tesis. Métodos de Control de Acidez en el yogur. DIA. Universidad Autónoma de Chapingo. México.
- Guarner, F., Malagelada, J.R., (2003). Gut flora in health and disease. *Lancet.* 361, 512-519. Review.
- Gueimonde, M., Delgado, S., Mayo, B., Ruas-Madiedo, P., Margolles, A., (2006). Viability and diversity of probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*

- populations included in commercial fermented milks. *Food Res. Int.* 37, 839-850.
- Guerin-Danan C. (1998). Milk fermented with yoghurt cultures and *Lactobacillus casei* compared with yoghurt and gelled milk: influence on intestinal microflora in healthy infants. *Am J Clin Nutr*; 67:111-8.
- Gutiérrez, B. M. (2011). Modelos Sugeridos Como Herramientas Para La Microbiología Predictiva En La Industria De Los Alimentos. Maestría En Gestión De La Calidad Con Especialidad En Inocuidad De Alimentos. Guatemala.
- Harper, S. (1991). *Journal of Dairy Science* Vol. 74, No. 9, 1991. Sensory Ratings of Commercial Plain Yogurts by Consumer and Descriptive Panels.
- Harper, W. J. y Hall, C.W. (1991). Technology of Dairy Products Manufactured with Selected Microorganisms. Citado en: *Dairy Technology and Engineering*. Westport. The Avi Publishing Company, Inc. Pp 213.
<http://es.wikipedia.org/wiki/Yogur>
- Heller, K. (2006) y. *American Journal of Clinical Nutrition* (2001). Probiotic bacteria in fermented foods: product characteristics and starter organisms.
- Hernández, A., Alfaro, I., Arrieta, R. (2003). *Microbiología Industrial*. Editor EUNED.
- Hilton E., Rindos P. e Isenberg H.D. (1995). *Lactobacillus y Bifidobacterium* . *journal of Clinical microbiology*. 31 (3): 359-375.
- Illescas, C.E. (2001). Curso Teórico Practico sobre Lactología. Pág.13-17,67-73.
- Kneifel, W., et al. (1992). *Journal of Dairy Science* Vol. 75, No. 11, 1991. Screening of Biochemical, Commercially Available Mesophilic Dairy Starter Cultures: sensory, and Microblological Properties.

- Lee, Y.J., (1995). Identification and screening for antimicrobial activity against *Clostridium difficile* of *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* species isolated from healthy infant faeces. *Int. J. Antimicrob. Agents*. 21, 340-346.
- Lee Y., Salimen S. (1995). The coming age of probiotics. *Trends Food Sci Tech*;6:241-5. Netherlands.
- Lomas, DL., Rojas, DG. (2010). Aprovechamiento de Suero de Leche de Cabra como Sustrato para el Desarrollo de un Producto Fermentado Probiótico con *Bifidobacterium bifidum* y *Lactobacillus acidophilus*. Tecnológico de Monterrey. VII Congreso Nacional de los Alimentos y III Foro de Ciencia y Tecnología de Alimentos Guanajuato Gto. Universidad Autónoma De Nuevo Leon.
- López, Malo A. (2000). Manual de prácticas de análisis de los alimentos. Universidad de las Américas, Puebla, México, inédito.
- Madigan, M. T.; Martinko, J. M.; Parker, J. (1997). *Brock Biología de los Microorganismos*. Ed. Prentice Hall Iberia. 8ª Ed. Revisada, Inc. pp. 149 – 177.
- Madigan M.T. y Martinko J.M. (2004). *Parker Jack. Biología de Los Microorganismos*. Decima Edición. Editorial Pearson Educación S.A. 2004. Madrid.
- Mani, E. 2005. Viabilidad y propiedades fisicoquímicas de productos lácteos fermentados probióticos. UDLA, Puebla.
- Mateos, A. (2010). Determinación microbiológica de vida de anaquel de alimentos proteicos. Universidad Autónoma de Nuevo León.
- McMeekin, T.A.; J.N. Olley; T. Ross y D.A. Ratkowsky (1993) *Predictive Microbiology: Theory and Application*, 61-70. Research Studies Press Ltd., Tounton, Inglaterra.

- Mestres, J., Del Castillo, R. (2004). Productos Lácteos. Tecnología. Universidad Politécnica De Catalunya.
- Méndez, D. J. (2000). Yogurt. Instituto de Productos Lácteos. Universidad de Santiago de Compostela. España.
- Meyer, I. y Marcos, R. (1982). Control de calidad de los Productos Agropecuarios. 2ª edición. Editorial trillas. España.
- Montes, D. (2013). Food Biotechnology (Biotecnología De Alimentos). Atlantic International University Honolulu, Hawaii.
- Montville, T. J. (2000). Principios que influyen en el crecimiento, la supervivencia y la muerte microbiana en los alimentos. In: Doyle, M. P.; Beuchat, L.R.; and Montville, T. J. (2000). Microbiología de los Alimentos. Fundamentos and Fronteras. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza (España).13 – 30.
- Montiel, L.; Delgado, C. H.; Gonzales, D. J.; Montiel, R. G., (2010). Viabilidad de cepas probióticas en leche fermentada almacenada en refrigeración. XII Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos. LA 81-LA89.
- Mora K., Tirado, L. (2014). Viabilidad Economica Y Financiera Del proyecto De Inversión Elaboracion Y Comercializacion De Yogur Probiotico De Aguaymanto Enriquecido Con Quinoa En La Ciudad De Cajamarca. Tesis Para Optar El Título Profesional De Licenciado En Administración. Cajamarca – Perú.
- Mujica, A., Izquierdo J., Marathee J.P. (2006). Origen y Descripción De La Quinoa. En Quinoa (Chenopodium Quinoa Willd.) – Ancestral Cultivo Andino, Alimento Del Presente Y Futuro (Mujica A., Jacobsen S.-E., Izquierdo J., Marathee J., Editores). FAO, UNA-Puno, CIP. Santiago, Chile, 9-29.

- Norma Técnica Peruana (202.092.2008). Leche y productos lácteos. Yogurt. Requisitos. Cuarta Edición. Perú
- Oberam, H. (1985). Tradicional fermented milk products. Elsevier Applied Science Publisher, London, England. Pág. 53-54.
- Ohashi, Y., Tokunaga M., Taketomo N., Ushida K. (2007). Stimulation of indigenous lactobacilli by fermented milk prepared with probiotic bacterium, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* strain 2038, in the pigs. *J Nutr Sci Vitaminol*. 53: 82-6.
- Olivera J. (2011). Caracterización Tecnológica de Cepas de Bacterias Acido lácticas Aisladas de la Leche. Unidad de Tecnología de Alimentos. Universidad La Republica. Facultas de Agronomía
- Oztur, B.A. y Oner, M.D. (1999). Production and evaluation of yogurt with concentrated grape juice. *J. food Science*. 64:530-532.
- Pardío S. y cols (1994). Los probióticos y su futuro. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*. vol 46 No 1 p 6-10. Ecuador.
- Pisabarro, A. G. (2009). Microbiología Clínica 1er Curso De Diplomatura En Enfermería. Universidad Pública de Navarra. Departamento de Producción Agraria. Pamplona
- Potter, N.N. y Hotchkiss, J.H., (1999). Ciencia de los Alimentos. 5ta. Edición. Nueva York. E. U. A. Pp. 78-83
- Prescott, L. M.; Harley, J. P.; Klein, D. A. (1999). Microbiología. 4ª Edición., McGraw-Hill. Interamericana. 114 – 136.
- Ramirez M., (2009). Elaboración de yogurt con probióticos (*Bifidobacterium* spp. y *Lactobacillus acidophilus*) e inulina. Instituto de Química y Tecnología, Facultad

- de Agronomía, Universidad Central de Venezuela. Apdo. 4579. Maracay 2101. Aragua. Venezuela.
- Rasic, J. (1993). The role of dairy foods containing bifidoand acidophilus bacteria in nutrition and health. *North European Dairy J.* 4:1-10.
- Rasic, J.L.y Kurmann, J.A., (1983). Bifidobacteria and their role. *Ann. Péd.* 241, 8-23.
- Repo-Carrasco R., Espinoza C., Jacobsen S.-E. (2001). Valor Nutricional Y Usos De La Quinoa (*Chenopodium Quinoa*) Y De La Kañiwa (*Chenopodium Pallidicaule*). En *Memorias, Primer Taller Internacional Sobre Quinoa – Recursos Genéticos Y Sistemas De Producción* (Jacobsen S.-E., Portillo Z., Editores), 10–14 May, UNALM, Lima, Perú, 391-400.
- Reyes C. I. (2008). *Propuesta para Tecnificar la Producción Artesanal de Yogur Probiótico*. Universidad de San Carlos. EIQ. Guatemala.
- Robinson, T. P.; Ocio, M. J.; Kaloti, A.; Mackey, B. M. (1998). The effect of growth environment on the lag phase of *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology* 44: 83 – 92.
- Rodriguez, R.P. (2003). *Desarrollo y Validación de modelos matemáticos para la predicción de vida comercial de productos cárnicos*. Facultad De Veterinaria. Departamento De Bromatología y Tecnología De Los Alimentos. Tesis Doctoral. Córdoba
- Roy, D. (2005). Technological aspects related to the use of bifidobacteria in dairy foods. *Lait* 85, 39-56.
- Salminen, S., Bouley, C., Boutron-Ruault, M.C., Cummings, J.H., Franck, A., Gibson, G.R., Isolauri, E., Moreau, M.C., Roberfroid, M., Rowland, I., (2004). Functional food science and gastrointestinal physiology and function. *Br. J. Nutr.* 80, 147-171.

- Sánchez, A. (2003). Las Biotecnologías: Desafíos Y Promesas Investigaciones Biológicas. La Habana.
- Sánchez, J. (2012). Determinación De La Curva De Crecimiento De Levadura *Sacharomyces Cerevisae*, Aplicando El Modelo De Gompertz. Universidad Nacional De Trujillo Ingeniería Agroindustrial. Trujillo. Perú.
- Sanz, Y., Collado M.C., Haros M., Dalmau J. (2004). Funciones metabólicas y nutritivas de la microbiota gastrointestinal y su modulación a través de la dieta: probióticos y prebióticos. *Acta pediátrica Española*. 62 (11):520-526.
- Saura, G. (2003). 1er Seminario Nacional De Biotecnología Industrial. Proyecto BID FOMIN. Cámara Agropecuaria Y Agroindustrial De El Salvador (CAMAGRO) Y La Asociación Azucarera De El Salvador. Fundación Para La Innovación Tecnológica Agropecuaria. Publicación FIAGRO.
- Scardovi, V. (1986). Genus *Bifidobacterium*, p. 1418-1434. In P. H. A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharpe, and J. G. Holt (ed.), *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol. 2. Williams and Wilkins, Baltimore, Md.
- Shah N. P. (2001). Functional Foods from Probiotics and Prebiotics. *Food Technology*. 55(11): 46-53
- Spreer (1991). *Lactología Industrial*, Editorial Acribada Zaragoza España.
- Stanier, R. Y.; Ingraham, J. L.; Wheelis, M. L.; Painter, P. R. (1999). *Microbiología*. 2ª Edición. Editorial Reverté. pp. 195 – 209.
- Swinnen, I. A. M.; Bernaerts, K.; Dens, E. J. J.; Geeraerd, A. H.; Van Impe, J. F. (2004). Predictive modelling on the microbial lag phase: a review. *International Journal of Food Microbiology* 94: 137 – 159.
- Tamime A.Y. y Robinson R.K. (1991). *Yogurt Ciencia y Tecnología*. Editorial Acribia, Zaragoza – España.

- Taranto, M. Medici, M. Font, G. (2005). Alimentos funcionales probióticos. Tucumán, Argentina. INTERNET. www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar/v4n1/alimprob.pdf
- Tello P.E., Aparicio A.W., Quispe R.A. (2006). Introducción A La Tecnología De Los Alimentos. Representaciones Offset Continental S.R.L. Puno, Perú.
- Vasconcelos J. A. (2000). Alimentos Funcionesl. Conceptos y Beneficios a la Salud. Departamento de Ciencias de los Alimentos y Nutricion. Universiada de Chapman. USA.
- Vázquez A.M. (2008). Viabilidad Y Propiedades Fisicoquímicas De Leche Fermentada Probiótica. Universidad De Las Américas Puebla. Escuela De Ingeniería Y Ciencias. Departamento De Ingeniería Química Y Alimentos. Cholula, Puebla, México.
- Ventura, M., Canchaya, C., Zhang, Z., Fitzgerald, F. G. y van Sinderen, D. (2007). Molecular characterization of *hsp20*, encoding a small heat shock protein of *Bifidobacterium breve* UCC2003. *Applied and Environmental Microbiology* 73, 4695-4703.
- Villalobos, C. (2005). Los Probióticos del Yogur Dos Pinos. Investigación y Desarrollo Cooperativa de Productores de Leche Dos Pinos. R.L.
- Walstra, P., Geurts, T., Noomen, A., Van Boekel, (1999). Dairy Technology. Ed. New York, Marcel Dekker Ine.
- Yousef, A. E.; Carlstrom C., (2006). Microbiología de los alimentos, manual de laboratorio. Editorial Acribia. Zaragoza, España.
- Zwietering, M.H.; I. Jongenburger; F.M. Rombouts; K. Vant Riet. (1990). Modeling of the bacterial growth curve. *Appl. Environ. Microbiol.* 56 (6): 1875-1881.



ANEXO 1. Parámetros ajustados por el Modelo de Gompertz modificado para *Bifidobacterium* BB-12.

TRATAMIENTO	A		B		C	M	R ²
	Log UFC/ml	Log UFC/ml/hora	Log UFC/ml	Log UFC/ml/hora			
T1 (0% sucedáneo de leche de quinua)	5,882	1,917	1,373	1,479	0,998		
T2 (15% sucedáneo de leche de quinua)	5,659	1,515	1,383	1,709	0,994		
T3 (20% sucedáneo de leche de quinua)	4,304	2,047	2,365	1,094	0,992		

ANEXO 2. Parámetros de crecimiento cinético del *Bifidobacterium* BB-12.

TRATAMIENTO	λ (horas)	$\mu_{\text{máx}}$ Log UFC/ml/hora	T_g (horas)
T1 (0% sucedáneo de leche de quinua)	0,957	0,968	0,311
T2 (15% sucedáneo de leche de quinua)	1,049	0,771	0,390
T3 (20% sucedáneo de leche de quinua)	1,087	1,780	0,169

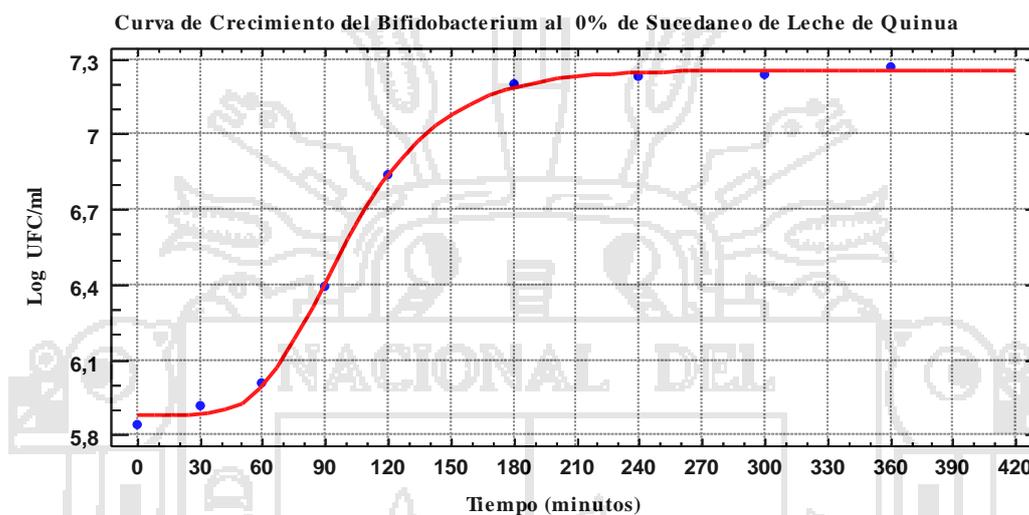
λ : Tiempo de adaptación

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

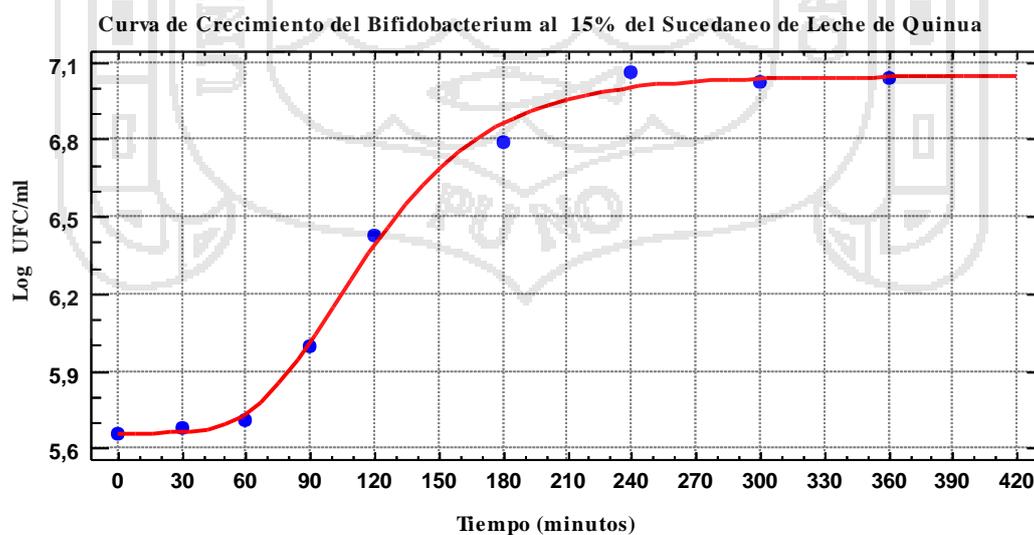
T_g : Tiempo de generación

ANEXO 3. Curvas de crecimiento del *Bifidobacterium* BB-12 ajustadas por el Modelo de Gompertz Modificado.

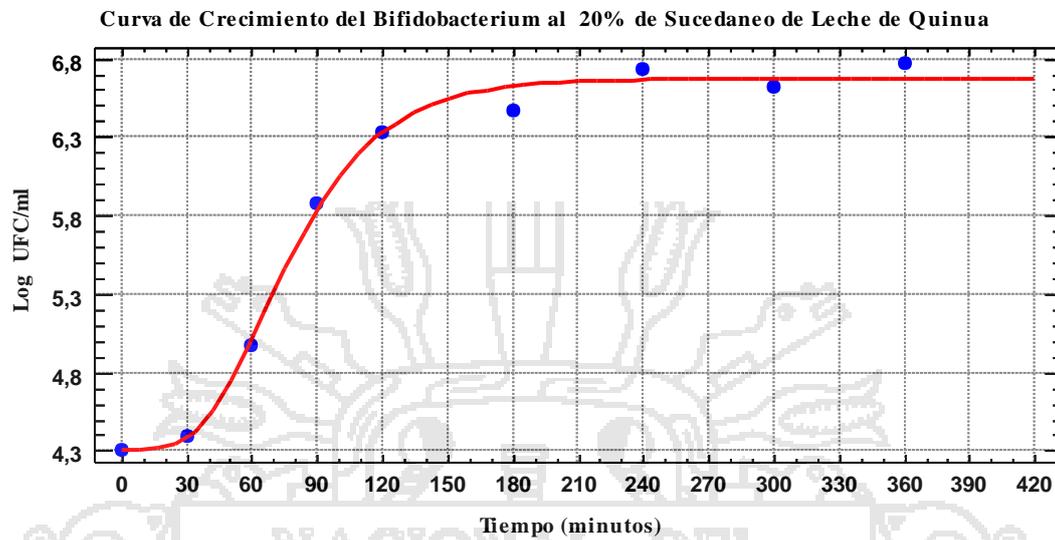
Anexo 3. 1. Curva de crecimiento del *Bifidobacterium* BB-12 para el Tratamiento 1, al 0% de Sucedáneo de Leche de quinua



Anexo 3. 2. Curva de crecimiento del *Bifidobacterium* BB-12 para el Tratamiento 2, al 15% de Sucedáneo de Leche de quinua



Anexo 3. 3. Curva de crecimiento del *Bifidobacterium* BB-12 para Tratamiento 3, para el Tratamiento 2, al 20% de Sucedáneo de Leche de quinua





ANEXO 4. Resultados de la evolución del pH obtenidos en cada tratamiento

TIEMPO	TRATAMIENTO 1 0% Sucedáneo de Leche de Quinua					TRATAMIENTO 2 15% Sucedáneo de Leche de Quinua					TRATAMIENTO 3 20% Sucedáneo de Leche de Quinua				
	R1	R2	R3	PROM		R1	R2	R3	PROM		R1	R2	R3	PROM	
0	6,7	6,6	6,7	6,67		6,7	6,7	6,6	6,67		6,7	6,6	6,7	6,67	
30	6,7	6,5	6,6	6,60		6,7	6,7	6,6	6,67		6,6	6,6	6,6	6,67	
60	6,6	6,2	6,6	6,47		6,7	6,6	6,6	6,63		6,6	6,5	6,6	6,63	
90	6,5	6,0	6,5	6,33		6,6	6,6	6,6	6,60		6,6	6,5	6,5	6,60	
120	6,3	5,8	5,9	6,00		6,2	6,5	6,4	6,37		6,0	6,5	6,0	6,37	
180	5,6	5,6	5,8	5,67		5,3	5,2	5,2	5,23		5,6	5,9	5,9	5,23	
240	5,1	5,4	5,7	5,40		5,4	4,9	5	5,10		5,4	5,7	5,6	5,10	
300	4,8	5	5,6	5,13		5,2	4,8	4,8	4,93		5,4	5,5	5,4	4,93	
360	4,2	4,7	5	4,63		5,2	4,7	4,7	4,87		5,2	5,5	5,3	4,87	

ANEXO 5. Resultados de la evolución de la acidez (% ácido láctico) obtenidos en cada tratamiento

TIEMPO	TRATAMIENTO 1			TRATAMIENTO 2			TRATAMIENTO 3					
	0% Sucedáneo de Leche de Quinoa			15% Sucedáneo de Leche de Quinoa			20% Sucedáneo de Leche de Quinoa					
	R1	R2	R3	PROM	R1	R2	R3	PROM	R1	R2	R3	PROM
0	0,27	0,22	0,17	0,22	0,17	0,15	0,15	0,16	0,17	0,29	0,14	0,20
30	0,31	0,24	0,17	0,24	0,18	0,16	0,17	0,17	0,18	0,29	0,14	0,20
60	0,35	0,25	0,19	0,26	0,23	0,2	0,19	0,21	0,21	0,3	0,15	0,22
90	0,46	0,33	0,3	0,36	0,28	0,23	0,21	0,24	0,26	0,33	0,2	0,26
120	0,55	0,4	0,4	0,45	0,37	0,29	0,29	0,32	0,46	0,4	0,21	0,36
180	0,68	0,65	0,5	0,61	0,71	0,67	0,6	0,66	0,71	0,68	0,56	0,65
240	0,79	0,74	0,69	0,74	0,86	0,93	0,83	0,87	0,72	0,82	0,63	0,72
300	0,86	1,06	0,79	0,90	0,9	0,97	0,88	0,92	0,8	0,84	0,67	0,77
360	0,91	1,06	0,85	0,94	1,02	1,03	0,96	1,00	0,81	1,07	0,74	0,87

ANEXO 6. Análisis sensorial del yogur probiótico enriquecido con sucedáneo de leche de quinua – Escala Hedónica.

Nombre: Muestra N°:

Estimado Sr. (Srta.), lea cuidadosamente cada una de las preguntas y marque con una “x” la respuesta que a ud. le parezca.

A. SABOR DEL PRODUCTO

- Me gusta muchísimo
- Me gusta moderadamente
- Me gusta poco
- No me gusta ni me disgusta
- Me disgusta poco
- Me disgusta moderadamente
- Me disgusta muchísimo

B. AROMA DEL PRODUCTO

- Me gusta muchísimo
- Me gusta moderadamente
- Me gusta poco
- No me gusta ni me disgusta
- Me disgusta poco
- Me disgusta moderadamente
- Me disgusta muchísimo

C. ACIDEZ DEL PRODUCTO

- Me gusta muchísimo
- Me gusta moderadamente
- Me gusta poco
- No me gusta ni me disgusta
- Me disgusta poco
- Me disgusta moderadamente
- Me disgusta muchísimo

ANEXO 7. Resultados de la Evaluación sensorial

0% de Sucedáneo de Leche de Quinua. 15% de Sucedáneo de Leche de Quinua. 20% de Sucedáneo de Leche de Quinua.

100% de Leche Entera Fresca de Vaca. 85% de Leche Entera Fresca de Vaca. 80% de Leche Entera Fresca de Vaca.

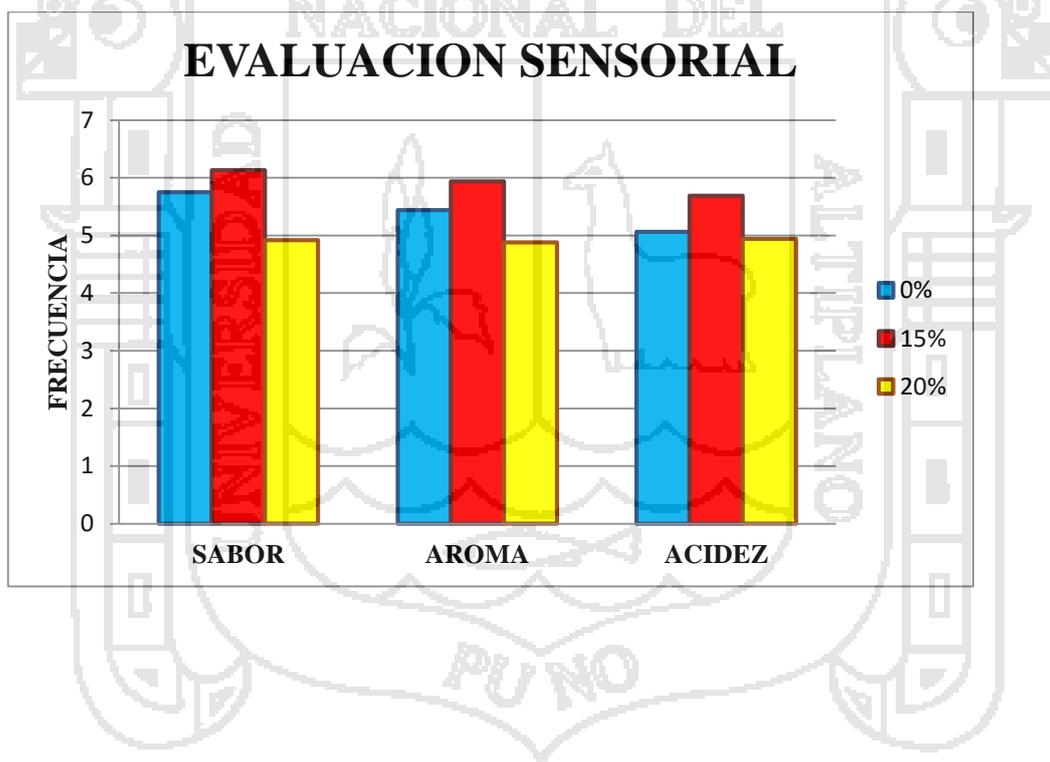
N° Panelistas	0% de Sucedáneo de Leche de Quinua.			15% de Sucedáneo de Leche de Quinua.			20% de Sucedáneo de Leche de Quinua.		
	Sabor	Aroma	Acidez	Sabor	Aroma	Acidez	Sabor	Aroma	Acidez
1	7	5	4	6	6	6	5	5	7
2	5	5	6	6	7	6	4	4	4
3	5	5	6	4	4	4	4	4	4
4	4	5	5	6	6	6	4	4	4
5	6	6	5	6	6	6	3	4	5
6	5	5	6	7	7	7	3	5	5
7	6	5	5	6	6	5	6	5	5
8	6	5	5	6	6	6	7	6	5
9	5	4	4	6	6	5	6	5	5
10	6	6	5	6	6	6	6	5	5
11	6	6	5	7	6	6	3	5	3
12	5	6	5	7	6	6	6	6	6
13	7	5	4	5	5	6	6	5	4
14	6	6	5	7	6	6	6	5	3
15	6	6	5	6	6	6	4	5	4
16	7	7	6	7	6	4	6	5	4

ANEXO 8. Resultados Finales.

Anexo 8.1. Frecuencia

	Puntaje
Me gusta muchísimo	7
Me gusta moderadamente	6
Me gusta poco	5
No me gusta ni me disgusta	4
Me disgusta poco	3
Me disgusta moderadamente	2
Me disgusta muchísimo	1

Anexo 8.2. Resultados



ANEXO 9. Panel Fotográfico.

