



**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO**  
**FACULTAD DE CIENCIAS**  
**ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA**

**“EVALUACIÓN DE LA FERMENTACIÓN DEL LACTOSUERO  
PARA LA OBTENCIÓN DE UNA BEBIDA PROBIÓTICA  
UTILIZANDO *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus casei*”**

**Trabajo de titulación**

**Tipo:** Proyecto de investigación

**Presentado para alcanzar el grado académico de:**

**INGENIERO QUÍMICO**

**AUTORES:** DANYA SILVANA BRITO HEREDIA  
JEAN CARLO VÁSCONEZ CASTILLO

**TUTORA:** ING. MABEL MARIELA PARADA RIVERA, M.Sc

Riobamba – Ecuador

2019

**©2019, Danya Silvana Brito Heredia; Jean Carlo Vásconez Castillo**

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

**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA**

El Tribunal de trabajo de titulación certifica que: El trabajo de titulación: Tipo proyecto de investigación "EVALUACIÓN DE LA FERMENTACIÓN DEL LACTOSUERO PARA LA OBTENCIÓN DE UNA BEBIDA PROBIÓTICA UTILIZANDO *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus casei*", de responsabilidad de los señores Danya Silvana Brito Heredia y Jean Carlo Vásconez Castillo, ha sido minuciosamente revisado por los miembros del tribunal del trabajo de titulación, quedando autorizada su presentación.

**FIRMA**

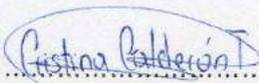
**FECHA**

Ing. Mabel Mariela Parada Rivera  
**DIRECTORA DEL TRABAJO  
DE TITULACIÓN**



**2019-06-26**

Ing. Cristina Gabriela Calderon Tapia  
**MIEMBRO DEL TRIBUNAL**



**2019-06-26**

Nosotros, **Danya Silvana Brito Heredia y Jean Carlo Vásquez Castillo**, somos responsables de las ideas, doctrinas y resultados expuestos en esta Tesis y el patrimonio intelectual de la Tesis de grado pertenece a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

Danya Silvana Brito Heredia  
Jean Carlo Vásquez Castillo

## **DEDICATORIA**

Dedico el presente trabajo de investigación a Dios por todas las bendiciones que he recibido durante mi vida. Se lo dedico a mi familia que siempre ha estado invirtiendo sus oraciones, recursos y consejos para que sea un profesional integro un ser humano honorable y humilde ya que he tratado de ser el reflejo de mi familia. Se lo dedico a mi mejor amiga Danya, ya que este esfuerzo ha sido un trabajo continuo y dedicado, ya que ella ha sido uno de los pilares más importantes de mi vida y ha sido la persona más fiel, intachable y dedicada que he tenido la dicha de conocer.

**Jean**

Dedico este trabajo de titulación a mis padres Jesús y Blanca, y a mi hermana Johanna que me han amado, cuidado y apoyado incondicionalmente en cada etapa de mi vida. A Jean, que ha estado a mi lado en cada paso de la carrera y que ha sido un gran apoyo.

**Danya**

## **AGRADECIMIENTO**

Primero a Dios y sólo a Dios, agradezco por haber puesto en mi camino las oportunidades y de manera muy especial a mis padres, Sonia y César, y a mi hermano David los cuales han sido el pilar fundamental de apoyo y sostén de mi formación académica y de valores. Los que han sido el modelo perfecto de esfuerzo, sacrificio y dedicación. Agradezco a mis abuelitos que han sido apoyo y consejo durante este trayecto de trabajo y esfuerzo. Agradezco a mi compañera y mejor amiga Danya, quién ha sido un apoyo incondicional durante el transcurso de mi formación académica universitaria y de esta investigación, ya que sin su esfuerzo este trabajo no hubiera sido posible. Agradezco a la Ing. Mabel Parada quien de manera muy humilde nos ha brindado su apoyo en el desarrollo de la investigación. Agradezco a la Ing. Blanca Heredia y al Ing. Jesús Brito quienes nos han abierto las puertas de su planta láctea con los brazos abiertos para permitirnos realizar la investigación y brindarnos el apoyo más fiel e incondicional.

**Jean**

Agradezco a mis padres Jesús y Blanca por todo el amor que me han dado, por ser mi ejemplo a seguir y por ser mi apoyo incondicional. A mi hermana Johanna por ser mi compañera de risas, complicidades y aventuras, por entenderme y estar siempre para mí. A mí familia por estar presente de una u otra forma. Agradezco a mi compañero y mejor amigo Jean por compartir tantos momentos conmigo y por ser mi apoyo en muchos aspectos de la vida. A todos mis compañeros por todas las experiencias que compartimos. A todos los profesores y colaboradores de la ESPOCH por la dedicación a su trabajo, especialmente, agradezco a la Ing. Mabel Parada y a la Ing. Cristina Calderón por brindarnos su apoyo y conocimientos para poder realizar este trabajo de titulación.

**Danya**

## TABLA DE CONTENIDO

<b>RESUMEN</b> .....	xvi
<b>ABSTRACT</b> .....	xvii
<b>CAPÍTULO I</b> .....	1
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
1.1. <b>Identificación del problema</b> .....	1
1.2. <b>Justificación del proyecto</b> .....	2
1.3. <b>Objetivos</b> .....	3
1.3.1. <i>General</i> .....	3
1.3.2. <i>Específicos</i> .....	3
<b>CAPÍTULO II</b> .....	4
<b>2. MARCO TEÓRICO</b> .....	4
2.1. <b>Antecedentes de la investigación</b> .....	4
2.1.1. <i>Antecedentes de la empresa</i> .....	6
2.2. <b>Marco Conceptual</b> .....	7
2.2.1. <i>Lactosuero</i> .....	7
2.2.2. <i>Clasificación y composición del lactosuero</i> .....	7
2.2.2.1. <i>Requisitos físico-químicos del suero de leche</i> .....	7
2.2.2.2. <i>Requisitos microbiológicos del suero de leche</i> .....	8
2.2.3. <i>Usos industriales del lactosuero</i> .....	8
2.2.3.1. <i>Aplicaciones de lactosuero en alimentos:</i> .....	8
2.2.3.2. <i>Bebidas fermentadas:</i> .....	9
2.2.3.3. <i>Obtención de ácido láctico:</i> .....	9
2.2.3.4. <i>Aislamiento de proteínas lácticas:</i> .....	10
2.2.3.5. <i>Obtención de PHB (Polihidroxibutirato)</i> .....	10
2.2.3.6. <i>Permeado de suero lácteo como abono</i> .....	10
2.2.4. <i>Fermentación láctea</i> .....	10
2.2.5. <i>Bacterias lácticas probióticas</i> .....	11
2.2.6. <i>Lactobacillus casei</i> .....	11
2.2.6.1. <i>Ruta metabólica para la obtención de ácido láctico</i> .....	12
2.2.6.2. <i>Beneficios para la salud de Lactobacillus casei</i> .....	12
2.2.7. <i>Streptococcus thermophilus</i> .....	13
2.2.7.1. <i>Ruta metabólica para la obtención de ácido láctico</i> .....	13
2.2.7.2. <i>Beneficios para la salud de Streptococcus thermophilus</i> .....	14
2.2.8. <i>Alimentos probióticos</i> .....	15
2.2.9. <i>Ácido láctico</i> .....	15

2.2.10.	<i>Acidificación y proteólisis</i> .....	15
2.2.11.	<i>Lactosa</i> .....	16
2.2.12.	<i>Determinación de la cantidad de microorganismos de una muestra</i> .....	16
2.2.13.	<i>Aditivos alimentarios</i> .....	17
2.2.14.	<i>Aditivos usados bebidas</i> .....	17
2.2.15.	<i>Pasteurización</i> .....	18
<b>CAPÍTULO III</b> .....		<b>20</b>
3.	<b>METODOLOGÍA</b> .....	<b>20</b>
3.1.	<b>Hipótesis y especificación de las variables</b> .....	<b>20</b>
3.1.1.	<i>Hipótesis General</i> .....	20
3.1.2.	<i>Hipótesis Específicas</i> .....	20
3.1.3.	<i>Identificación de variables</i> .....	21
3.1.3.1.	<i>Variables Independientes</i> .....	21
3.1.3.2.	<i>Variables dependientes</i> .....	21
3.1.4.	<i>Operacionalización de variables</i> .....	22
3.1.5.	<i>Matriz de consistencia</i> .....	23
3.2.	<b>Tipo y diseño de la investigación</b> .....	<b>26</b>
3.2.1.	<i>Diseño Experimental</i> .....	26
3.3.	<b>Unidad de análisis</b> .....	<b>27</b>
3.4.	<b>Población de estudio</b> .....	<b>28</b>
3.5.	<b>Tamaño de muestra</b> .....	<b>28</b>
3.6.	<b>Selección de muestra</b> .....	<b>28</b>
3.7.	<b>Técnicas de recolección de datos</b> .....	<b>28</b>
3.7.1.	<i>Caracterización del lactosuero</i> .....	28
3.7.2.	<i>Determinación de parámetros de estudio</i> .....	28
3.7.3.	<i>Obtención del lactosuero fermentado</i> .....	29
3.7.4.	<i>Recuento de colonias en placa y calculo total de bacterias ácido lácticas en el lactosuero fermentado</i> .....	29
3.7.5.	<i>Análisis del diseño experimental y análisis de varianza</i> .....	30
3.7.6.	<i>Comparación de formulaciones</i> .....	30
3.7.7.	<i>Formulación de la bebida probiótica</i> .....	31
3.7.8.	<i>Caracterización de la bebida probiótica</i> .....	31
3.7.9.	<i>Análisis sensorial de la bebida probiótica</i> .....	31
3.7.10.	<i>Tiempo de vida de anaquel</i> .....	32
<b>CAPÍTULO IV</b> .....		<b>33</b>
4.	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	<b>33</b>
4.1.	<b>Análisis de resultados</b> .....	<b>33</b>
4.1.1.	<i>Caracterización del lactosuero</i> .....	33

4.1.1.1.	<i>Caracterización física del lactosuero</i> .....	33
4.1.1.2.	<i>Caracterización bromatológica del lactosuero</i> .....	33
4.1.1.3.	<i>Caracterización microbiológica del lactosuero</i> .....	34
<b>4.1.2.</b>	<b><i>Determinación de parámetros de estudio</i></b> .....	<b>34</b>
4.1.2.1.	<i>Fermentación con Streptococcus thermophilus</i> .....	35
4.1.2.2.	<i>Fermentación con Lactobacillus casei</i> .....	35
<b>4.1.3.</b>	<b><i>Obtención del lactosuero fermentado</i></b> .....	<b>36</b>
<b>4.1.4.</b>	<b><i>Fermentación con Streptococcus thermophilus</i></b> .....	<b>36</b>
4.1.4.1.	<i>Tratamiento 1</i> .....	36
4.1.4.2.	<i>Tratamiento 2</i> .....	38
4.1.4.3.	<i>Tratamiento 3</i> .....	41
4.1.4.4.	<i>Tratamiento 4</i> .....	43
<b>4.1.5.</b>	<b><i>Fermentación con Lactobacillus casei</i></b> .....	<b>47</b>
4.1.5.1.	<i>Tratamiento 1</i> .....	47
4.1.5.2.	<i>Tratamiento 2</i> .....	50
4.1.5.3.	<i>Tratamiento 3</i> .....	52
4.1.5.4.	<i>Tratamiento 4</i> .....	55
4.1.5.5.	<i>Análisis del diseño experimental y Análisis de varianza entre los 4 tratamientos con Lactobacillus casei</i> .....	57
<b>4.1.6.</b>	<b><i>Comparación de formulaciones</i></b> .....	<b>59</b>
<b>4.1.7.</b>	<b><i>Formulación de la bebida probiótica</i></b> .....	<b>60</b>
<b>4.1.8.</b>	<b><i>Caracterización de la bebida probiótica</i></b> .....	<b>61</b>
4.1.8.1.	<i>Caracterización física de la bebida probiótica</i> .....	61
4.1.8.2.	<i>Caracterización bromatológica de la bebida probiótica</i> .....	61
4.1.8.3.	<i>Caracterización microbiológica del lactosuero</i> .....	62
<b>4.1.9.</b>	<b><i>Análisis sensorial de la bebida probiótica</i></b> .....	<b>62</b>
4.1.9.1.	<i>Color</i> .....	63
4.1.9.2.	<i>Consistencia</i> .....	65
4.1.9.3.	<i>Sabor</i> .....	66
4.1.9.4.	<i>Olor</i> .....	67
<b>4.1.10.</b>	<b><i>Tiempo de vida de anaquel</i></b> .....	<b>69</b>
<b>4.2.</b>	<b><i>Pruebas de hipótesis</i></b> .....	<b>71</b>
<b>4.2.1.</b>	<b><i>Hipótesis General</i></b> .....	<b>71</b>
<b>4.2.2.</b>	<b><i>Hipótesis Específicas</i></b> .....	<b>72</b>
4.2.2.1.	<i>Hipótesis 1</i> .....	72
4.2.2.2.	<i>Hipótesis 2</i> .....	73
4.2.2.3.	<i>Hipótesis 3</i> .....	74
<b>4.3.</b>	<b><i>Discusión de resultados</i></b> .....	<b>76</b>

<b>CAPÍTULO V</b> .....	<b>79</b>
<b>5. IMPLEMENTACIÓN DEL PROYECTO</b> .....	<b>79</b>
<b>5.1. Propuesta para la implementación del proyecto</b> .....	<b>79</b>
<i>5.1.1. Descripción del proceso de elaboración de la bebida probiótica</i> .....	<i>79</i>
<i>5.1.2. Requerimientos de los Equipos</i> .....	<i>82</i>
<b>5.2. Costos de la implementación de la propuesta</b> .....	<b>82</b>
<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>84</b>
<b>RECOMENDACIONES</b> .....	<b>85</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	
<b>ANEXOS</b>	

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1-2:</b> Evolución del concepto “probiótico” .....	5
<b>Tabla 2-2:</b> Requisitos físico-químicos del suero de leche líquido .....	7
<b>Tabla 3-2:</b> Requisitos microbiológicos para el suero de leche líquido. ....	8
<b>Tabla 4-2:</b> Aplicaciones de lactosuero en alimentos.....	9
<b>Tabla 5-2:</b> Beneficios para la salud de <i>Lactobacillus casei</i> .....	13
<b>Tabla 6-2:</b> Beneficios para la salud de <i>Streptococcus thermophilus</i> .....	14
<b>Tabla 1-3:</b> Operacionalización de variables.....	22
<b>Tabla 2-3:</b> Matriz de consistencia .....	23
<b>Tabla 3-3:</b> Tratamientos del lactosuero con <i>Lactobacillus casei</i> .....	27
<b>Tabla 4-3:</b> Tratamientos del lactosuero con <i>Streptococcus thermophilus</i> .....	27
<b>Tabla 5-3:</b> Asignación de números al azar para las formulaciones.....	32
<b>Tabla 1-4:</b> Resultados de la caracterización física del lactosuero .....	33
<b>Tabla 2-4:</b> Resultados de la caracterización bromatológica del lactosuero .....	33
<b>Tabla 3-4:</b> Resultados de la caracterización microbiológica del lactosuero .....	34
<b>Tabla 4-4:</b> Tratamientos del lactosuero con <i>Streptococcus thermophilus</i> .....	35
<b>Tabla 5-4:</b> Tratamientos del lactosuero con <i>Lactobacillus casei</i> .....	35
<b>Tabla 6-4:</b> Parámetros de fermentación para el tratamiento 1 con <i>Streptococcus thermophilus</i> .	36
<b>Tabla 7-4:</b> pH de lactosuero con el Tratamiento 1 con <i>Streptococcus thermophilus</i> .....	37
<b>Tabla 8-4:</b> Recuento en placa de colonias en agar M17 con el Tratamiento 1.....	38
<b>Tabla 9-4:</b> Cantidad total de microorganismos por muestra (Tratamiento 1) .....	38
<b>Tabla 10-4:</b> Parámetros de fermentación para el tratamiento 2 con <i>Streptococcus thermophilus</i> .....	39
<b>Tabla 11-4:</b> pH de lactosuero con el Tratamiento 2 con <i>Streptococcus thermophilus</i> .....	39
<b>Tabla 12-4:</b> Recuento en placa de colonias en agar M17 con el Tratamiento 2 .....	40
<b>Tabla 13-4:</b> Cantidad total de microorganismos por muestra (Tratamiento 2) .....	40
<b>Tabla 14-4:</b> Parámetros de fermentación para el tratamiento 3 con <i>Streptococcus thermophilus</i> .....	41
<b>Tabla 15-4:</b> pH de lactosuero con el Tratamiento 3 con <i>Streptococcus thermophilus</i> .....	41
<b>Tabla 16-4:</b> Recuento en placa de colonias en agar M17 con el Tratamiento 3 .....	42
<b>Tabla 17-4:</b> Cantidad total de microorganismos por muestra (Tratamiento 3) .....	42
<b>Tabla 18-4:</b> Parámetros de fermentación para el tratamiento 4 con <i>Streptococcus thermophilus</i> .....	43
<b>Tabla 19-4:</b> pH de lactosuero con el Tratamiento 4 con <i>Streptococcus thermophilus</i> .....	43
<b>Tabla 20-4:</b> Recuento en placa de colonias en agar M17 con el Tratamiento 4 .....	44

<b>Tabla 21-4:</b> Cantidad total de microorganismos por muestra (Tratamiento 4).....	45
<b>Tabla 22-4:</b> Diseño factorial 2 <sup>2</sup> para la fermentación del lactosuero con <i>Streptococcus thermophilus</i> .....	45
<b>Tabla 23-4:</b> Análisis de Varianza para la Cantidad total de Bacterias Ácido Lácticas para la fermentación del lactosuero con <i>Streptococcus thermophilus</i> .....	47
<b>Tabla 24-4:</b> Parámetros de fermentación para el tratamiento 3 con <i>Lactobacillus casei</i> .....	47
<b>Tabla 25-4:</b> pH de lactosuero con el Tratamiento 1 con <i>Lactobacillus casei</i> .....	48
<b>Tabla 26-4:</b> Recuento en placa de colonias en agar MRS con el Tratamiento 1.....	49
<b>Tabla 27-4:</b> Cantidad total de microorganismos por muestra (Tratamiento 1).....	49
<b>Tabla 28-4:</b> Parámetros de fermentación para el tratamiento 2 con <i>Lactobacillus casei</i> .....	50
<b>Tabla 29-4:</b> pH de lactosuero con el Tratamiento 2 con <i>Lactobacillus casei</i> .....	50
<b>Tabla 30-4:</b> Recuento en placa de colonias en agar MRS con el Tratamiento.....	51
<b>Tabla 31-4:</b> Cantidad total de microorganismos por muestra (Tratamiento 2).....	52
<b>Tabla 32-4:</b> Parámetros de fermentación para el tratamiento 3 con <i>Lactobacillus casei</i> .....	52
<b>Tabla 33-4:</b> pH de lactosuero con el Tratamiento 3 con <i>Lactobacillus casei</i> .....	53
<b>Tabla 34-4:</b> Recuento en placa de colonias en agar MRS con el Tratamiento 3.....	54
<b>Tabla 35-4:</b> Cantidad total de microorganismos por muestra (Tratamiento 3).....	54
<b>Tabla 36-4:</b> Parámetros de fermentación para el tratamiento 4 con <i>Lactobacillus casei</i> .....	55
<b>Tabla 37-4:</b> pH de lactosuero con el Tratamiento 4 con <i>Lactobacillus casei</i> .....	55
<b>Tabla 38-4:</b> Recuento en placa de colonias en agar MRS con el Tratamiento 4.....	56
<b>Tabla 39-4:</b> Cantidad total de microorganismos por muestra (Tratamiento 4).....	57
<b>Tabla 40-4:</b> Diseño factorial 2 <sup>2</sup> para la fermentación del lactosuero con <i>Lactobacillus casei</i> ..	57
<b>Tabla 41-4:</b> Análisis de Varianza para la Cantidad total de Bacterias Ácido Lácticas del lactosuero fermentado con <i>Lactobacillus casei</i> .....	59
<b>Tabla 42-4:</b> Resultados de la fermentación del lactosuero con <i>Streptococcus thermophilus</i> y <i>Lactobacillus casei</i> .....	59
<b>Tabla 43-4:</b> Resultados de la caracterización física de la bebida probiótica.....	61
<b>Tabla 44-4:</b> Resultados de la caracterización bromatológica de la bebida probiótica .....	61
<b>Tabla 45-4:</b> Resultados de la caracterización microbiológica del lactosuero .....	62
<b>Tabla 46-4:</b> Frecuencia y porcentaje de preferencia de las formulaciones de la bebida probiótica encuestados. ....	63
<b>Tabla 47-4:</b> Preferencia de los consumidores con respecto al atributo color para las formulaciones propuestas.....	64
<b>Tabla 48-4:</b> Estadísticos descriptivos para el análisis del atributo color.....	64
<b>Tabla 49-4:</b> Prueba de Kruskall-Wallis para el análisis sensorial del atributo color .....	65
<b>Tabla 50-4:</b> Preferencia de los consumidores con respecto al atributo consistencia para las formulaciones propuestas.....	65

<b>Tabla 51-4:</b> Estadísticos descriptivos para el análisis del atributo consistencia .....	66
<b>Tabla 52-4:</b> Prueba de Kruskal-Wallis para el análisis sensorial del atributo color .....	66
<b>Tabla 53-4:</b> Preferencia de los consumidores con respecto al sabor para las formulaciones.....	66
<b>Tabla 54-4:</b> Estadísticos descriptivos para el análisis del atributo color.....	67
<b>Tabla 55-4:</b> Prueba de Kruskal-Wallis para el análisis sensorial del atributo color .....	67
<b>Tabla 56-4:</b> Preferencia de los consumidores con respecto al olor para las formulaciones .....	68
<b>Tabla 57-4:</b> Estadísticos descriptivos para el análisis del atributo olor .....	68
<b>Tabla 58-4:</b> Prueba de Kruskal-Wallis para el análisis sensorial del atributo color .....	69
<b>Tabla 59-4:</b> Parámetros de la bebida probiótica durante los 21 días desde su elaboración. ....	69

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 1-2:</b> Ubicación de la Planta Láctea JB .....	6
<b>Gráfico 2-4:</b> pH vs Tiempo de fermentación con <i>S. thermophilus</i> (Tratamiento 1) .....	37
<b>Gráfico 3-4:</b> pH vs Tiempo de fermentación con <i>S. thermophilus</i> (Tratamiento 2) .....	39
<b>Gráfico 4-4:</b> pH vs Tiempo de fermentación con <i>S. thermophilus</i> (Tratamiento 3) .....	41
<b>Gráfico 5-4:</b> pH vs Tiempo de fermentación con <i>S. thermophilus</i> (Tratamiento 4) .....	44
<b>Gráfico 6-4:</b> Cantidad promedio de bacterias ácido lácticas por tratamiento para el lactosuero fermentado con <i>Streptococcus thermophilus</i> . .....	46
<b>Gráfico 7-4:</b> pH vs Tiempo de fermentación con <i>L. casei</i> (Tratamiento 1) .....	48
<b>Gráfico 8-4:</b> pH vs Tiempo de fermentación con <i>L. casei</i> (Tratamiento 2) .....	51
<b>Gráfico 9-4:</b> pH vs Tiempo de fermentación con <i>L. casei</i> (Tratamiento 3) .....	53
<b>Gráfico 10-4:</b> pH vs Tiempo de fermentación con <i>L. casei</i> (Tratamiento 4) .....	56
<b>Gráfico 11-4:</b> Cantidad promedio de bacterias ácido lácticas por tratamiento para el lactosuero fermentado con <i>Lactobacillus casei</i> .....	58
<b>Gráfico 12-4:</b> Porcentajes de preferencia de acuerdo a la preferencia de las personas encuestadas.....	63
<b>Gráfico 13-4:</b> Preferencia de los consumidores con respecto al atributo color para las formulaciones propuestas.....	64
<b>Gráfico 14-4:</b> Preferencia de los consumidores con respecto al atributo consistencia para las formulaciones propuestas.....	65
<b>Gráfico 15-4:</b> Preferencia de los consumidores con respecto al atributo color para las formulaciones propuestas.....	67
<b>Gráfico 16-4:</b> Preferencia de los consumidores con respecto al atributo color para las formulaciones propuestas.....	68
<b>Gráfico 17-4:</b> Cantidad de bacterias ácido lácticas durante los 21 días siguientes a la obtención de la bebida probiótica. ....	70
<b>Gráfico 18-4:</b> pH durante os 21 días siguientes a la obtención de la bebida probiótica. ....	70
<b>Gráfico 19-4:</b> Comparación de la cantidad de bacterias ácido lácticas obtenidas mediante el mejor tratamiento de <i>Lactobacillus casei</i> y <i>Streptococcus thermophilus</i> . ....	75
<b>Gráfico 1-5:</b> Proceso de obtención de una bebida probiótica.....	80

## ÍNDICE DE ANEXOS

**ANEXO A:** Requisitos para suero de leche de acuerdo a la norma NTE INEN 2594:2011

**ANEXO B:** Requisitos para bebidas de suero de acuerdo a la norma NTE INEN 2609:2012

**ANEXO C:** Requisitos de la norma NTE INEN 2395:2011 para leches fermentadas. Cantidad de bacterias probióticas

**ANEXO D:** Caracterización bromatológica del lactosuero

**ANEXO E:** Caracterización microbiológica del lactosuero

**ANEXO F:** Caracterización de la bebida probiótica

**ANEXO G:** Recuento en placa de bacterias ácido lácticas del lactosuero fermentado con *Streptococcus thermophilus*

**ANEXO H:** Recuento en placa de bacterias ácido lácticas del lactosuero fermentado con *Lactobacillus casei*

**ANEXO I:** Preparación de las diluciones y sembrado en placa de las muestras

**ANEXO J:** Encuestas para determinar la aceptación del producto en el mercado

**ANEXO K:** Hoja de respuestas para la encuesta de aceptación del producto

**ANEXO L:** Fermentación del lactosuero en el laboratorio de biotecnología de la Facultad de Ciencias de la ESPOCH-Control de pH

**ANEXO M:** Fermentación del lactosuero en el laboratorio de biotecnología de la Facultad de Ciencias de la ESPOCH

**ANEXO N:** Toma de muestras de lactosuero en la Planta Láctea JB

**ANEXO O:** Propuesta de etiqueta para la bebida probiótica

## RESUMEN

El presente trabajo investigativo tuvo como finalidad la elaboración de una bebida probiótica mediante la fermentación láctica del lactosuero con el uso de bacterias ácido lácticas probióticas. Los microorganismos seleccionados fueron *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus casei* debido a los beneficios que proveen al ser ingeridos por el ser humano. Se evaluó bromatológicamente y microbiológicamente al lactosuero, se prepararon 4 tipos de formulaciones para la fermentación usando la temperatura y la cantidad de inóculo como parámetros de evaluación. Las muestras se sometieron a recuento microbiológico para evaluar la supervivencia de las cepas utilizadas y se determinó la mejor formulación para la elaboración de la bebida, siendo la resultante la elaborada con *Streptococcus thermophilus* a 42 C y 0,09 g/L, dando un recuento final de  $2,8 \times 10^9$  UFC/g. Se utilizó los aditivos necesarios para realizar la bebida y se realizó tres tipos de bebida, las cuales fueron sometidas a encuesta para identificar su grado de aceptación ante potenciales consumidores y se determinó estadísticamente la bebida con más aceptación. La bebida escogida fue la 2062 (mora), de la cual se realizó los análisis microbiológicos y bromatológicos para asegurar la calidad e inocuidad del producto final. Además, se estableció la línea de proceso y el análisis de costos de la implantación del proyecto por parte de la planta láctea. La presente investigación puede servir de modelo para el estudio de otro tipo de fermentaciones usando bacterias probióticas, debido a los beneficios potenciales que estas brindan para elaborar otro tipo de productos.

**PALABRAS CLAVE:** <INGENIERÍA Y TECNOLOGÍA QUÍMICA>, <ALIMENTOS>, <BEBIDA PROBIÓTICA>, <*Streptococcus thermophilus* (BACTERIA)>, <*Lactobacillus casei* (BACTERIA)>, >, <LACTOSUERO>.



## Abstract

The purpose of this research work was to prepare a probiotic beverage by lactic acid fermentation with the use of probiotic lactic acid bacteria. The selected microorganisms were *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus casei* due to the benefits they provide when ingested by humans. The whey was evaluated bromatologically and microbiologically; 4 types of formulations were prepared for the fermentation using the temperature and the inoculum quantity as evaluation parameters. The samples were subjected to microbiological counting to evaluate the survival of the strains used and the best formulation for the elaboration of the drink was determined, the resulting one being elaborated with *Streptococcus thermophilus* at 42 C and 0.09 g / L, giving a recount end of  $2.8 \times 10^9$  CFU / g. The necessary additives were used to make the drink, and three types of drink were made, which were subjected to a survey to identify their degree of acceptance before potential consumers and the most popular drink was statistically determined. The chosen beverage was 2062 (blackberry), from which the microbiological and bromatological analyses were carried out to ensure the quality and safety of the final product. Besides, the process line and cost analysis of the implementation of the project was established by the dairy plant. This research can serve as a model for the study of other types of fermentation using probiotic bacteria, due to the potential benefits that these they offer to elaborate a different kind of products.

**Keywords:** <CHEMICAL ENGINEERING AND TECHNOLOGY>, <FOODS>, <PROBIOTIC DRINK>, <*Streptococcus thermophilus* (BACTERIA)>, <*Lactobacillus casei* (BACTERIA)>, <WHEY>.



# CAPÍTULO I

## 1. INTRODUCCIÓN

### *1.1. Identificación del problema*

La planta láctea JB ubicada en el kilómetro 5 vía a Macas en la parroquia de Cebadas, cantón Guamote, provincia de Chimborazo, procesa diariamente alrededor de 700 litros de leche para la producción de queso fresco. Como residuo del proceso se desecha alrededor del 85% del volumen de leche en forma de lactosuero, este contiene lactosa, proteínas solubles, lípidos y sales minerales que constituyen alrededor del 55% del valor nutricional de la leche. La empresa no cuenta con un sistema de tratamiento de residuos y, además, debido a su bajo valor comercial, una parte pequeña del lactosuero es destinado para la alimentación del ganado bovino, ovino y porcino, y la mayor parte del suero es desechado al suelo o hacia los recursos hídricos cercanos a la planta.

Esto constituye el desperdicio de un recurso con alto valor nutricional y la generación de un agente contaminante con alta carga orgánica que genera a su vez reducción del rendimiento de cultivos y contaminación en ríos y aguas subterráneas (Trujillo, Suarez y Gallego 1998).

Se han realizado varios estudios para encontrar el método menos costoso de desechar el lactosuero, identificar nuevas opciones de uso, prevenir la pérdida potencial de nutrientes valiosos y reducir la contaminación ambiental. Una opción a considerar es tratar al lactosuero con microorganismos fermentativos que podrían ayudar a constituir un alimento probiótico (Ramírez et al. 2011).

## ***1.2. Justificación del proyecto***

Las bebidas probióticas tienen dentro de su composición microorganismos vivos que ofrecen beneficios para el organismo, reforzando el equilibrio de la microbiota y el sistema inmunológico, puesto que, a mayor diversidad de la microbiota, menores son los riesgos para la salud (Arenas-Suescún, Zapata-Fernandez y Gutiérrez-Cortés 2012).

Se consideró el uso de *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus casei*, para que, a través de la evaluación de su proceso fermentativo considerando la variación de parámetros característicos como la temperatura de fermentación y la cantidad de inóculo. Así como la realización de varios ensayos, determinar cuál de estos ofrece un mejor rendimiento y potencia las características nutritivas del lactosuero para la obtención de una bebida probiótica destinada al consumo.

Al proponer la obtención de bebidas probióticas a base del lactosuero se ofrece una vía de reducción de la liberación de este contaminante al medio y al mismo tiempo la Planta Láctea JB puede obtener beneficios sociales y económicos.

### **1.3. Objetivos**

#### **1.3.1. General**

Evaluar la fermentación del lactosuero de la Planta Láctea JB para la obtención de una bebida probiótica utilizando *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus casei*.

#### **1.3.2. Específicos**

- Determinar la composición bromatológica y las características microbiológicas del lactosuero producido como residuo del proceso de producción de quesos en la planta Láctea JB.
- Realizar ensayos experimentales con diferentes parámetros de operación en la fermentación del lactosuero usando *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus casei*.
- Evaluar el proceso de fermentación del lactosuero con la bacteria *Streptococcus thermophilus* para la obtención de una bebida probiótica.
- Evaluar el proceso de fermentación del lactosuero con la bacteria *Lactobacillus casei* para la obtención de una bebida probiótica.
- Comparar los resultados obtenidos entre los procesos de fermentación con *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus casei*
- Determinar el microorganismo más adecuado, así como las condiciones ideales de operación para la obtención de una bebida probiótica a partir del lactosuero en la Planta Láctea JB.

## CAPÍTULO II

### 2. MARCO TEÓRICO

#### *2.1. Antecedentes de la investigación*

El lactosuero constituye uno de los residuos más importantes generados por la industria lechera alrededor del mundo, por lo general se lo considera un desperdicio. En la actualidad se han realizado varias investigaciones empleando diferentes tecnologías como la concentración, deshidratación, fermentación, entre otras, para transformar esta materia prima en diferentes productos. Uno de los procesos más importantes es la fermentación, mediante la cual se pueden obtener varios productos entre los que se encuentran los alimentos mejorados, biomasa, solventes e incluso insecticidas (Ramírez, 2011). El lactosuero se ha utilizado para la obtención de bebidas nutritivas o con propiedades curativas desde la antigüedad, se tiene documentado que el médico Hipócrates recomendaba ingerir lactosuero con fines terapéuticos (Muset y Castells 2017).

Actualmente, los consumidores buscan alimentos que contengan altos valores nutricionales y que aporten con pocas calorías, por lo tanto, se han desarrollado productos mejorados con microorganismos probióticos, por ejemplo, con bacterias ácido lácticas entre ellas *Lactobacillus casei* y *Streptococcus thermophilus*. Se considera que al ingerir periódicamente estos alimentos se puede reducir el colesterol, prevenir varios tipos de cáncer y contribuye a mejorar el sistema digestivo (Londoño et al. 2008).

El concepto “probiótico” se ha desarrollado a lo desde los primeros años del siglo XX por medio de investigadores que han propuesto diferentes conceptos a lo largo de los años. A continuación, se describe la evolución del concepto de probiótico:

**Tabla 1-2:** Evolución del concepto “probiótico”

<b>Año</b>	<b>Descripción</b>	<b>Autor</b>
1907	Primera hipótesis sobre un rol positivo de ciertas bacterias	Metchnikoff
1953	El término “probiotika” es utilizado por primera vez para describir suplementos orgánicos o inorgánicos necesarios para restaurar la salud.	Kollath
1954-1955	Se define a los probióticos como opuestos a los antibióticos. Se considera que pueden ser efectivos contra los efectos nocivos de los antibióticos.	Vergin, Kolb
1965	Los probióticos son sustancias secretadas por microorganismos que estimulan el crecimiento de otros.	Lilly y Stillwell
1974	Organismos y sustancias que contribuyen al equilibrio microbiano del intestino.	Parker
1992	Suplementos de alimento microbiano vivos que benefician al huésped a mejorar el equilibrio microbiano.	Fuller
1996	Se define a los probióticos como microorganismos vivos que, al ser consumidos en ciertas cantidades, son beneficiosos para la salud.	Schaafsma
2001	Productos que contienen microorganismos vivos que, en cantidades suficientes, alteran la microflora (por implantación o colonización) del huésped y de esta forma ejerce efectos beneficiosos para la salud.	Schrezenmeir y de Vrese
2014	Microorganismos vivos, que cuando son administrados en cantidades adecuadas, confieren beneficios a la salud de su huésped.	OMS, FAO

**Fuente:** (Uriot et al. 2017)

Se han observado numerosos beneficios para la salud a partir de la ingesta de probióticos, tanto en experimentos en animales como en ensayos con seres humanos. Los beneficios para la salud están principalmente asociados con la prevención y tratamiento de los síntomas de la diarrea, prevención de enfermedades relacionadas con el colon irritable, colitis y ayudan a reducir la intolerancia a la lactosa. Además, ciertos probióticos se han recomendado para el tratamiento de otras patologías como dermatitis atópica, hipercolesterolemia y alergias (Uriot et al. 2017).

Una cepa de *Lactobacillus casei* se aisló a partir de heces humanas en 1930, el mismo que posteriormente se cultivaría y utilizaría para la obtención de bebidas probióticas. Existen investigaciones que le atribuyen al microorganismo *L. casei* propiedades benéficas para la salud como para combatir la diarrea intestinal y la que se produce por el consumo de antibióticos,

además de que ayuda a prevenir el cáncer de colon (Rodríguez 2000) (Manzano A, Estupiñán G y Poveda E 2012).

Estudios recientes realizados en seres humanos y animales han demostrado que la cepa *S. thermophilus* puede tener efectos beneficiosos en la salud de su huésped. Entre varios estudios se ha llegado a la conclusión que este microorganismo probiótico puede contribuir a aliviar la intolerancia a la lactosa, a prevenir la gastritis crónica, prevenir la diarrea, entre otros (Uriot et al. 2017).

### **2.1.1. Antecedentes de la empresa**

La planta Láctea JB se encuentra ubicada en la parroquia Cebadas del cantón Guamote provincia de Chimborazo. Es una empresa artesanal que se dedica a la producción de queso fresco y queso mozzarella.



**Gráfico 1-2:** Ubicación de la Planta Láctea JB

Fuente: Google Earth

La empresa cuenta con los servicios básicos de agua potable, luz y línea telefónica. Además que la empresa se encuentra en una zona ganadera, de producción avícola y productos agrícolas como papas, chocho, cebolla, maíz, entre otros. Pero la materia prima fundamental de la zona es la leche que se obtiene del ganado principalmente bovino.

Actualmente la empresa no cuenta con una planta de tratamiento para la descarga de fluidos, pero se tienen proyectos a futuro para poder procesar los residuos contaminantes de la producción misma de la planta.

## 2.2. Marco Conceptual

### 2.2.1. Lactosuero

Es un subproducto de la elaboración de queso, resultado de la coagulación de las proteínas caseicas de la leche. El lactosuero representa del 85-90% del volumen de leche y está formado por una gran porción de los componentes de la leche que se solubilizan en agua (Chávez et al. 2017).

### 2.2.2. Clasificación y composición del lactosuero

Existen diferentes tipos de suero dependiendo de varios factores. Para París (2009), los constituyentes del suero dependen de varios factores como las técnicas utilizadas durante el proceso, la composición de la leche, las condiciones de almacenamiento del lactosuero y el tipo de queso del que se obtuvo. Se pueden distinguir dos tipos de suero, el suero dulce, que es obtenido de una coagulación de la leche por enzimas y el suero ácido que es generado a partir de una coagulación ácida de la caseína de la leche. En términos generales, el lactosuero contiene alrededor de la mitad de los sólidos totales de la leche, un 20% de las proteínas, lactosa, minerales, vitaminas, entre otros (Hernández-Rojas y Vélez-Ruíz 2014).

#### 2.2.2.1. Requisitos físico-químicos del suero de leche

La norma NTE INEN 2594:2011 establece los requerimientos de suero de leche líquido donde se muestran los valores máximos y mínimos que éste debe cumplir de acuerdo a los parámetros físico químicos como se indica en la tabla 2-2.

**Tabla 2-2:** Requisitos físico-químicos del suero de leche líquido

Requisitos	Suero de leche dulce		Suero de leche ácido		Método de ensayo
Lactosa, % (m/m)	---	5,0	---	4,3	AOAC 984.15
Proteína láctea, % (m/m)	0,8	---	0,8	---	NTE INEN 16
Grasa láctea, % (m/m)	---	0,3	---	0,3	NTE INEN 12
Ceniza, % (m/m)	---	0,7	---	0,7	NTE INEN 14
Acidez titulable, % (calculada como ácido láctico)	---	0,16	0,35	---	NTE INEN 13
pH	6,8	6,4	5,5	4,8	AOAC 973.41

Fuente: NTE INEN 2594, 2011

### 2.2.2.2. Requisitos microbiológicos del suero de leche

La tabla 3-2 especifica los valores máximos y mínimos de los parámetros microbiológicos que la norma NTE INEN 2594:2011 establece para suero de leche líquido.

**Tabla 3-2:** Requisitos microbiológicos para el suero de leche líquido.

Requisito	N	M	M	C	Método de ensayo
Recuento de microorganismos aerobios mesófilos UFC/g.	5	30000	100000	1	NTE INEN 1529-5
Recuento de <i>Escherichia coli</i> UFC/g.	5	< 10	-	0	NTE INEN 1529-8
<i>Staphylococcus aureus</i> UFC/g.	5	< 100	100	1	NTE INEN 1529-14
<i>Salmonella</i> UFC/25g.	5	ausencia	-	0	NTE INEN 1529-15
Detección de <i>Listeria monocytogenes</i> UFC/25g.	5	ausencia	-	0	ISO 11290-1

Fuente: NTE INEN 2594, 2011

### 2.2.3. Usos industriales del lactosuero

Se ha buscado la forma de reutilizar el lactosuero aprovechando sus componentes para utilizarlo como materia prima en la elaboración de subproductos en diferentes industrias, de esta forma se incrementa el valor de la empresa y se reduce la contaminación ambiental que este ocasiona al ser descargado como un residuo (Parra 2009).

#### 2.2.3.1. Aplicaciones de lactosuero en alimentos:

El lactosuero se puede utilizar como materia prima en la obtención de varios productos debido a su valor nutricional, entre algunas de las aplicaciones tenemos:

**Tabla 4-2:** Aplicaciones de lactosuero en alimentos

<b>Aplicaciones</b>	<b>Algunos beneficios</b>
Productos en panadería	El valor nutricional se potencia, tiende a funcionar como agente emulgente y sirve como reemplazo del huevo (sustancia coloidal) que le da cuerpo a la masa.
Quesos	Potencia el valor nutricional, funciona como emulgente, incrementa las características organolépticas y mejora la cohesividad.
Bebidas	Potencia el valor nutricional, incrementa varias propiedades de las bebidas como la solubilidad, viscosidad y la estabilidad de los coloides.
Postres	Actúa como agente emulgente y espesante. A demás mejora la textura de los productos.
Confitería	Actúa como agente emulgente y permite realizar una mejor mezcla de los componentes.
Productos cárnicos	Actúa en forma de pre-emulgente, gelificante, y potenciador de la solubilidad.
Otros	Producción de alimentos altamente nutricionales y de bajo costo económico, alimentos para deportistas (proteicos y energizantes), para personas de la tercera edad (dietéticos), alimentos adelgazantes y de bajo contenido calórico, concentrados proteicos, fórmulas infantiles y compotas, alimentos usados en pacientes con dietas rigurosas de origen hospitalario.

Fuente: (Poveda 2013)

#### 2.2.3.2. *Bebidas fermentadas:*

El suero lácteo tiene gran cantidad de lactosa dentro de su composición que puede ser aprovechada por organismos fermentadores capaces de elaborar bebidas a base de suero o bebidas lácteas (con una base de leche del 51%) (Poveda 2013).

#### 2.2.3.3. *Obtención de ácido láctico:*

El ácido láctico es producto de la extracción y purificación de caldos de fermentación donde se usan bacterias lácticas fermentativas usando como sustrato el suero lácteo residual de la producción de queso. El producto principal de esta fermentación es el ácido láctico con un rendimiento favorable. El ácido láctico se obtiene por dos vías, ya sea una síntesis química o a partir de la realización de una fermentación de hidratos de carbono, mediante procesos económicos y viables (Rojas, Montaña, y Bastidas 2016).

#### *2.2.3.4. Aislamiento de proteínas lácticas:*

El suero es rico en proteínas, principalmente en  $\beta$ -lactoglobulina ( $\beta$ -LG) y la  $\alpha$ -lactoalbúmina ( $\alpha$ -LA) a más de otro tipo de proteínas complementarias, por lo cual estudios han permitido el aislamiento de estas mediante técnicas eléctricas con arcos pulsantes y físicas como la ultrafiltración. Mediante este tipo de procesos se puede obtener un concentrado proteínico eficiente que puede ser usado como suplemento o como aditivo alimentario (Tirado, Acevedo y Montero 2015).

#### *2.2.3.5. Obtención de PHB (Polihidroxibutirato)*

Se puede obtener PHB a partir de suero ácido a partir de *Bacillus megaterium* como microorganismo de acumulación de polímero. El PHB es un polímero de tipo poliéster que puede usarse en la industria en la elaboración de distintos materiales de empaque de aceites, botellas y láminas. El PHB es un termoplástico elaborado con bases biotecnológicas (Naranjo 2014).

#### *2.2.3.6. Permeado de suero lácteo como abono*

El permeado de suero lácteo es un subproducto de la ultrafiltración del suero constituido principalmente por agua, lactosa y una gran cantidad de minerales como lo son el nitrógeno (N), fósforo (P), potasio (K), azufre (S), calcio (Ca), magnesio (Mg), los cuales son indispensables para nutrir a los cultivos por lo cual el permeado de suero puede de manera muy efectiva o parcial reemplazar a los abonos comerciales de la industria (Pilatti et al. 2014).

#### **2.2.4. Fermentación láctea**

Es una ruta metabólica anaeróbica que tiene lugar en la matriz citoplasmática de las células procariontas y eucariontas. Consiste en la fermentación de los azúcares presentes en el medio, con el fin de obtener energía de origen metabólico además de un producto de desecho principal llamado ácido láctico y puede ocurrir la generación de otros ácidos (Cuenca y Quicazán 2011). Además, la fermentación también puede ocurrir en tejidos animales en condiciones anaerobias (Ramírez et al. 2011).

Las bacterias ácido lácticas obtienen su energía a partir de carbohidratos. La fermentación anaeróbica empieza a suceder con una glucólisis la cual genera como producto sales del ácido pirúvico, también conocido como piruvato. El resultante puede ser degradado por distintas vías anaerobias de acuerdo al tipo de fermentación siendo homoláctica o heteroláctica (Ramírez et al. 2011).

La fermentación homoláctica se caracteriza por la obtención directa de ácido láctico del piruvato y es propia de los músculos y algunos tipos de hongos y bacterias de los géneros *Streptococcus*, *Pediococcus* y algunas especies de *Lactobacillus*. La fermentación heteroláctica da como resultado ácido láctico, acético y fórmico, dióxido de carbono y etanol. Esta fermentación es típica de las bacterias heterofermentadoras (Ramírez et al. 2011).

#### **2.2.5. Bacterias lácticas probióticas**

Se trata de cultivos en estado puro, o mezcla de cultivos procedentes de microorganismos vivos, que al ser aplicados en cantidades apropiadas contribuyen beneficiosamente a mejorar las propiedades de la microbiota bacteriana nativa del hombre y los animales. La mayor parte de estas son utilizadas dentro de la industria alimentaria para la obtención de productos fermentados (Ramírez et al. 2011).

Las bacterias lácticas son anaerobias aerotolerantes es decir que pueden desarrollarse en la presencia o ausencia de oxígeno. Una característica de las bacterias lácticas radica en productos obtenidos de acuerdo del tipo de fermentación que ocupa el metabolismo del microorganismo (Rodríguez 2000).

Para que un microorganismo se considere como probiótico debe ser capaz de sobrevivir a las condiciones ácidas del estómago de un pH de entre 3,5 y 4 (Vergara 2007). Además, esta debe alcanzar el lugar adecuado de acción en el intestino de y estar en cantidades lo suficientemente grandes para que puedan proceder al efecto deseado. Las bacterias lácticas ayudan a mejorar las características de los alimentos como el sabor, olor, textura además de que contribuyen a mejorar su calidad nutritiva y su preservación (Rodríguez 2000, Manzano A, Estupiñán G y Poveda E 2012).

#### **2.2.6. *Lactobacillus casei***

Es una bacteria probiótica Gram (+), anaerobia facultativa, no esporulada, actúa bajo un metabolismo estrictamente fermentativo, dando como principal producto metabólico el ácido láctico brindando muchos usos en la industria. Además, es resistente en rangos amplios de pH de 3 a 7 y tiene una temperatura óptima de desarrollo de 37 a 39 °C. Es capaz de resistir al ácido de la bilis y al trayecto que siguen a través del estómago (Vergara 2007).

Las cepas de *Lactobacillus casei* se las puede encontrar de manera natural en una serie de vegetales fermentados, leche, carne y en el medio ambiente. Además, se encuentra también dentro del organismo del ser humano específicamente en la boca y el intestino (Rodríguez 2000).

### 2.2.6.1. Ruta metabólica para la obtención de ácido láctico

*Lactobacillus casei* es una especie capaz de adaptarse y forma parte del grupo de las especies facultativas heterofermentativas, produciendo ácido láctico a partir de la ruta hexosa monofosfato ya que estas al carecer de aldolasa no son capaces de descomponer la hexosa difosfato en triosa fosfato. Por lo cual oxidan glucosa 6-fosfato a 6-fosfogluconato y proceden a descarboxilarlo a pentosa fosfato, que luego se convertirá en triosa fosfato y acetilfosfato por la acción de la enzima fosfocetolasa. Al término de esto la triosa fosfato formada se transforma en ácido láctico acompañado de la producción de un mol de ATP. Al mismo tiempo el acetil fosfato recoge electrones de NADH y produce pentosa fosfato, produciendo etanol y dos moles de lactato al contrario de los homofermentadores (Rodríguez, 2000).

De este hecho se destaca que los homofermentadores producen el doble de masa celular que los heterofermentadores a partir de la misma cantidad de glucosa, ya que estos últimos actúan descarboxilando 6-fosfogluconato produciendo CO<sub>2</sub> como un producto de fermentación mientras que los homofermentadores producen poco o nada de CO<sub>2</sub>. (Rodríguez, 2000).

*L. casei* produce ácido láctico a partir de hexosas siguiendo la vía de Embden-Meyerhof y a partir de pentosas por la vía 6-fosfogluconato/fosfocetolasa (Vergara 2007).

### 2.2.6.2. Beneficios para la salud de *Lactobacillus casei*

*Lactobacillus casei* es una bacteria ácido láctica viable que ayuda al equilibrio del microbiota del tracto gastrointestinal y estimulan el sistema inmune. La colonización de la mucosa por parte de *L. casei* es fundamental para la ocurrencia de los beneficios para la salud.

**Tabla 5-2:** Beneficios para la salud de *Lactobacillus casei*

BENEFICIO	AUTOR
<p>Enfermedades gastrointestinales y digestión, ayuda a mermar la población patógena del sistema digestivo a través de la competencia por los nutrientes.</p> <p>La estabilización de la permeabilidad intestinal y fortalecimiento de la barrera de los intestinos, contribuye a la limitación por parte de la colonización de intestinos por medio de patógenos.</p> <p>Facilita la eliminación de antígenos extraños que han ingresado en la mucosa y la regulación de la respuesta inmune específica de antígeno.</p> <p>Reducción de los síntomas clínicos asociados a la acción de rotavirus.</p>	(Guérin-Danan et al. 2001)
Disminución de la cantidad de triglicéridos y de colesterol en los huéspedes.	(Minelli et al. 2004)
Reducción de la liberación de metano intestinal y el crecimiento de la concentración de ácidos grasos de cadena corta totales, particularmente de acetato, propionato y butirato.	(Mani-López, Palou y López-Malo 2014)
Se ha demostrado que <i>L. casei</i> es capaz de lograr una disminución en las enzimas relacionadas con cáncer de colon ( $\beta$ -glucuronidasa, ácido glicocólico hidrolasa y nitroreductasa) al consumir $10^{10-11}$ UFC por día.	(Rodríguez 2000)

Realizado por: Brito Danya, Vásconez Jean, 2019

### 2.2.7. *Streptococcus thermophilus*

Es una bacteria ácido láctica Gram (+), anaerobia aerotolerante además de ser una de las más usadas en la industria láctea en la obtención de queso, yogur y productos probióticos. Siendo la única especie reconocida como segura por la FDA (American Food and Drug Administration) esto lo caracteriza como un potencial probiótico y la segunda de las bacterias ácido lácticas con mayor importancia luego de *Lactococcus lactis*. Es un microorganismo homofermentativo que se manifiesta en hábitats naturales como la mucosa mamaria de los bovinos y la leche producidos por estos. La cepa tiene características termófilas tiene una temperatura óptima de crecimiento de 42-45°C (Blanco 2015).

#### 2.2.7.1. Ruta metabólica para la obtención de ácido láctico

Las cepas de *Streptococcus thermophilus* son capaces de hidrolizar la lactosa a través una  $\beta$ -galactosidasa, a galactosa y glucosa; que luego se transforman en ácido láctico L (+) por la vía Embden Meyerhof Parnas (EMP) con un rendimiento del 0.7-. 08%. Mientras que algunas cepas pueden llegar a producir hasta un 1%. Además, también son capaces de fermentar fructosa y

sacarosa. Otra característica importante es que *S. thermophilus* también influye en el aroma característico del producto final, ya que forma compuestos carbonilo como por ejemplo el acetaldehído y diacetilo (Sevilla 2009).

Para realizar el metabolismo de la lactosa estas se sepa cuentan con dos tipos de enzimas, la  $\beta$ -galactosidasa ( $\beta$ -Gal) presentes en 28 de ellas, la fosfo- $\beta$ -galactosidasa (P-  $\beta$ -Gal) en una cepa únicamente y las dos enzimas en 3 cepas. Lo que implicaría el funcionamiento ya sea de una permeasa específica de los  $\beta$ -galactósidos, pero en realidad la enzima responsable de la hidrólisis parece ser la  $\beta$ -Gal (Sevilla 2009).

#### 2.2.7.2. Beneficios para la salud de *Streptococcus thermophilus*

Se han estudiado los numerosos beneficios que tiene el consumo de productos que contienen *Streptococcus thermophilus*, algunos de ellos se especifican en la tabla 6-2:

**Tabla 6-2:** Beneficios para la salud de *Streptococcus thermophilus*

Beneficio	Fuente
<p>Mejora la condición de intolerancia a la lactosa, gracias a la conversión de la lactosa en ácido láctico a través de la encima <math>\beta</math>-galactosidasa, disminuyendo síntomas de intolerancia como flatulencia, el dolor en el estómago y vómitos asociados.</p> <p>Control de diarreas agudas, al competir con las bacterias patógenas por los nutrientes de la vía gastrointestinal además de producir antioxidantes y sustancias antimicrobianas que alteran el pH y neutralizan las toxinas generadas por los agentes patógenos.</p> <p>Control de diarreas causadas por antibiótico terapia, <i>S. Thermophilus</i> ayuda a restablecer la microbiota del intestino ayudando a la proliferación de otros probióticos y limitando el crecimiento de patógenos.</p>	<p>(Montes y García 2009)</p>
<p>Control de la gastritis e infecciones por <i>Helicobacter pylori</i>: combate los efectos secundarios producidos en el tratamiento para erradicar <i>Helicobacter pylori</i> de manera que estimula los mecanismos inmunes de la mucosa, además que limita su colonización.</p>	<p>(Ruggiero 2014)</p>

Realizado por: Brito Danya, Vásquez Jean, 2019

### **2.2.8. Alimentos probióticos**

Son alimentos compuestos básicamente por microorganismos probióticos los cuales se conocen por proporcionar un balance al sistema digestivo, estos permiten la proliferación de la microbiota normal y compiten con bacterias patógenas. (Ramírez et al. 2011) De esta manera los alimentos probióticos tienen la capacidad de estimular el sistema inmunológico, eliminar otras bacterias patógenas que puedan ser causantes de infecciones, reducir la incidencia de diarreas o desórdenes alimenticios, incrementar la absorción de vitaminas y minerales además de ayudar a la digestión aportando activamente en los procesos digestivos. Estimulando de esta manera al sistema inmunológico y gastrointestinal de los consumidores (Arenas-Suescún, Zapata-Fernandez y Gutiérrez-Cortés 2012).

Se pueden tener casos adversos en el consumo de alimentos probióticos, por ejemplo, en individuos monitoreados se ha observado la presencia de acné, distensión abdominal, calambres, diarreas, flatulencias y gases además de erupciones leves (Rul et al. 2011).

### **2.2.9. Ácido láctico**

El ácido láctico está clasificado por la FDA como un compuesto generalmente reconocido como seguro y es ampliamente utilizado dentro de la industria química, farmacéutica y alimentaria, su uso se principalmente como un compuesto acidificante, conservante, amortiguador, agente saborizante y además tiene la capacidad de aumentar la actividad de algunos antioxidantes (Blanco 2015). El ácido láctico fue aislado por primera vez de la leche a partir de la leche agria en 1780 (Cuenca y Quicazán 2011).

Es producido a nivel industrial básicamente por vías químicas y biotecnológicas, esta última consiste básicamente en seguir una vía fermentativa de los hidratos de carbono por parte de hongos y bacterias que deben cumplir ciertos parámetros dentro del proceso de obtención de ácido láctico. Como sustratos se puede sacarosa de caña de azúcar, lactosa del lactosuero y dextrosa procedente de almidón hidrolizado (Blanco 2015).

### **2.2.10. Acidificación y proteólisis**

Estos términos corresponden a la capacidad de las bacterias ácido lácticas para poder fermentar la lactosa y degradar las proteínas contenidas en la leche, estas dos características son dos factores de gran importancia dentro de la industria a la hora de escoger una cepa de cultivo, puesto que la rapidez de producción de ácido láctico está íntimamente ligada a estos dos factores. Además, se

deben tomar en consideración el tiempo con el que el producto final alcanza el pH y la estabilidad deseados (Moulay et al. 2006).

Una fermentación óptima viene de la mano de la capacidad proteolítica de las bacterias ácido lácticas, ya que estas necesitan una fuente de aminoácidos, en la leche provenientes de la proteólisis de la caseína. Las proteasas de la pared celular de las bacterias ácido lácticas son las responsables de iniciar la proteólisis, en cuanto que los oligopéptidos resultantes se hidrolizan mediante proteasas intracelulares. Así pues dependiendo de la capacidad de las bacterias para realizar la proteólisis se determinará el carácter óptimo de la fermentación (Serna-Cock y Stouvenel 2009).

### **2.2.11. Lactosa**

El CODEX Alimentarius (FAO 2001), define a la lactosa como “*Materia normalmente presente en la leche que se obtiene usualmente del suero, con un contenido de lactosa anhidra de no menos del 99,0% m/m. Puede ser anhidra o contener una molécula de agua de cristalización o consistir en una mezcla de ambas formas*”

### **2.2.12. Determinación de la cantidad de microorganismos de una muestra**

Se usa un método el cual permite determinar la presencia de microorganismos vitales dentro de una muestra de estudio, los mismos que al inoculados en un medio nutritivo sólido serán capaces de reproducirse y formar colonias individuales visibles. Durante el método de conteo es apremiante realizar diluciones decimales que provengan de la suspensión madre, las cuales posteriormente se inoculan en el medio de características más prolijas para el desarrollo del microorganismo. Al término de del procedimiento se realiza el conteo de las colonias formadas. Los valores resultantes se usan para la determinación de la concentración de microorganismos por gramo o mililitro de alimento (Instituto Ecuatoriano de Normalización 2006).

- *Medios de cultivo*

Se trata de cualquier sustancia capaz de ser una fuente de nutrientes y puede estar en una fase sólida o líquida, la misma que es capaz de ser utilizada a nivel laboratorio para lograr el crecimiento y proliferación de microorganismos. A este medio se le puede añadir sustancias de enriquecimiento, selección, indicación o agentes de tipo tamponante (Instituto Ecuatoriano de Normalización 1999).

- *Agar MRS*

Medio de cultivo adecuado para el aislamiento y recuento de bacterias ácido lácticas en especial de tipo que provengan de muestras clínicas o de origen alimentario especialmente de tipo lácteo (Instituto Ecuatoriano de Normalización 1999).

- *Agar M17*

Medio de cultivo apropiado para la identificación y recuento de estreptococos lácticos especialmente para el cultivo de *Streptococcus thermophilus*. Además, al añadirse disodio- $\beta$ -glicerofosfato, este restringe significativamente el desarrollo de muchas especies de *Lactobacillus* (Instituto Ecuatoriano de Normalización 1999).

- *Bactopectona*

Es la peptona estándar para la preparación, recuento, siembra y realización de cultivos bacteriológicos, siendo una fuente rica de nitrógeno orgánico para las bacterias. Se usa dentro de la preparación de cultivos en la realización de diluciones para el recuento y siembra de bacterias. Se usa 0,1g en 100 mL de agua destilada (Instituto Ecuatoriano de Normalización 1999).

### **2.2.13. Aditivos alimentarios**

Aditivos alimentarios son sustancias que pueden tener origen inorgánico o orgánico que se le agregan a los alimentos con diversos objetivos como por ejemplo potenciar su conservación, textura, sabor, contenido nutricional, etc. Este tipo de sustancias pueden ser ingresadas al en diferentes etapas del proceso de elaboración del alimento y cumplen un papel fundamental en la intencionalidad de elaborar el producto final y este dependerá de la cantidad y tipo de aditivos usados a lo largo del proceso productivo. Estos aditivos alimentarios siempre estarán en función de potenciar las cualidades del alimento y nunca deberán atentar en contra de la salud integral de los consumidores (Multon 1999).

### **2.2.14. Aditivos usados bebidas**

- *Sacarosa*

Conocido también como azúcar, es un disacárido formado por glucosa y fructosa que actúa como agente preservante ya que alarga la vida útil del producto, también es un agente antioxidante ya

que limita la formación de óxidos provenientes del hierro; es usado como agente excipiente, granulante y tensoactivo en cosméticos. El azúcar aporta energía gracias a los carbohidratos que lo componen a más de que ayuda al buen funcionamiento de nuestro sistema nervioso y muscular, los ojos y el transporte de los glóbulos rojos. Ayuda en la reducción del colesterol y triglicéridos en la sangre, evita la formación de trombos sanguíneos y mejora la irrigación sanguínea entre otros. El azúcar se compone de un 95% de carbohidratos y 5% de vitaminas (A, B1 y B2) y aporta 4 cal/g, siendo la dosis recomendada de 70g al día (Multon 1999).

- *Saborizante*

Son sustancias que estimulan los sentidos del gusto y del olfato, estos pueden ser de origen natural o de tipo artificial, y actúan potenciando el sabor propio del alimento o pueden actuar como la base del sabor del mismo (FAO/OMS 2000).

- *Estabilizante*

Son sustancias reguladoras de la consistencia de los alimentos, actúan por disgregación y disolución en la muestra para después formar puentes de hidrógeno o enlaces de manera que limitan el movimiento de las moléculas de agua no enlazada. Como resultado de esta red el alimento aumenta su viscosidad y consistencia. La gran mayoría de estabilizantes son gomas o coloides que modifican las propiedades reológicas del producto dando una mejor consistencia al mismo, ya que estabilizan proteínas, homogenizan el producto y reducen la sedimentación de sólidos suspendidos, limitan la separación del suero lácteo y aumentan la cantidad de sólidos totales (FAO/OMS 2000).

### **2.2.15. Pasteurización**

Es un proceso térmico que generalmente es usado en sustancias líquidas con el fin de poder minimizar la carga microbiana y patógena distribuida en protozoos, mohos, levaduras, bacterias, entre otras. El principio básico de la pasteurización es utilizar altas temperaturas, las cuales no son soportadas por los microorganismos por tiempos prolongados o ya sea por la intensidad de la temperatura, donde también debe existir una interacción de tiempo y temperatura dentro de la pasteurización (Instituto Ecuatoriano de Normalización 2012).

- *Condiciones de pasteurización*

El lactosuero es una sustancia rica en azúcares, compuesto principalmente por lactosa, este es un punto fuerte a considerar ya que a elevadas temperaturas el azúcar presente en el medio puede llegar a caramelizarse y dañar la estructura del mismo (Instituto Ecuatoriano de Normalización 2012).

El tipo de pasteurización dependerá del tipo de proceso utilizado:

- Flujo continuo: 72 °C durante 15 segundos
- Lotes: 62°C - 65 °C durante 30 minutos

- *Producto lácteo pasteurizado*

Es aquel derivado de la leche que ha sido sometido a un proceso térmico, el mismo que pretenderá la eliminación completa de los microorganismos patógenos y la gran mayoría de los microorganismos saprofitos o banales, de modo que las características fisicoquímicas, nutricionales y organolépticas de la misma permanecen inalterables (Instituto Ecuatoriano de Normalización 2012).

## CAPÍTULO III

### 3. METODOLOGÍA

#### 3.1. Hipótesis y especificación de las variables

##### 3.1.1. *Hipótesis General*

A partir de la fermentación del lactosuero con *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus casei* se obtendrá una bebida probiótica que cumpla con los parámetros establecidos en la norma NTE INEN 2609.

##### 3.1.2. *Hipótesis Específicas*

- El lactosuero de la planta láctea JB cumplirá con los parámetros bromatológicos y microbiológicos de la norma NTE INEN 2594.
- La bebida obtenida con *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus casei* cumplirá con las características para ser considerada como una bebida probiótica según la norma NTE INEN 2395.
- La evaluación de los distintos tratamientos para la fermentación del lactosuero con *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus casei* permitirá determinar las condiciones óptimas para la obtención de una bebida probiótica.

### ***3.1.3. Identificación de variables***

#### *3.1.3.1. Variables Independientes*

- Materia Prima
- Tipo de fermento (bacteria)
- Concentración de inóculo
- Temperatura

#### *3.1.3.2. Variables dependientes*

- Composición del lactosuero
- Tiempo de fermentación
- Composición de la bebida probiótica
- Cantidad de bacterias ácido lácticas presentes en la muestra

### 3.1.4. Operacionalización de variables

**Tabla 1-3:** Operacionalización de variables

VARIABLE	CONCEPTO	INDICADOR	RANGO	INSTRUMENTO DE MEDICIÓN
Materia Prima	Material susceptible transformaciones para convertirse en productos	--	--	Técnicas de Análisis: NTE INEN 2594-2011
Tipo de fermento	Variedad de microorganismos a utilizar para la fermentación	--	--	Información del proveedor
Tiempo de fermentación	Período de tiempo de fermentación	Horas	--	Cronómetro
Temperatura	Magnitud que mide el nivel térmico o calor que un cuerpo posee	Grados Celsius	30°C-40°C	Termómetro
Concentración de inóculo	Cantidad de inóculo por volumen de suero	g/mL	--	Balanza/Probeta
Composición bromatológica del lactosuero	Análisis de los componentes del lactosuero	% Proteína % Grasa % Cenizas % Acidez titulable	--	Técnicas de Análisis: NTE INEN 2594-2011
Composición de la bebida probiótica	Análisis de los componentes de la bebida probiótica	% Proteína % Grasa % Cenizas % Acidez titulable	--	Técnicas de Análisis: NTE INEN 2609-2012
Cantidad de bacterias ácido lácticas presentes en la muestra	Número de bacterias ácido lácticas presentes en la bebida probiótica	Número de bacterias/mL	--	Recuento en placa

**Realizado por:** Danya Brito, Jean Vásquez, 2019.

### 3.1.5. Matriz de consistencia

**Tabla 2-3:** Matriz de consistencia

PROBLEMA GENERAL		OBJETIVO GENERAL	HIPÓTESIS GENERAL	
La planta láctea JB obtiene el 85% del volumen de leche en forma de lactosuero que se procesa para la elaboración de queso fresco. La empresa no cuenta con un sistema de tratamiento de residuos por lo que se pretende buscar una solución al problema que se sustenta en como poder aprovechar este residuo.		Evaluar la fermentación del lactosuero de la Planta Láctea JB para la obtención de una bebida probiótica utilizando <i>Streptococcus thermophilus</i> y <i>Lactobacillus casei</i> .	A partir de la fermentación del lactosuero con <i>Streptococcus thermophilus</i> y <i>Lactobacillus casei</i> se obtendrá una bebida probiótica que cumpla con los parámetros establecidos en la norma NTE INEN 2609.	
PROBLEMAS ESPECÍFICOS	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	HIPÓTESIS ESPECÍFICAS	VARIABLES	MÉTODOS DE ANÁLISIS
Se desconoce la composición bromatológica del lactosuero producido por la planta láctea JB y no se han hecho estudios previos del mismo.	Determinar la composición bromatológica del lactosuero producido como residuo del proceso de producción de quesos en la planta Láctea JB.	El lactosuero de la planta láctea JB cumplirá con los parámetros bromatológicos y microbiológicos de la norma NTE INEN 2594.	<b>Variable Independiente:</b> Materia Prima <b>Variable Dependiente:</b> Composición Bromatológica del Lactosuero	Técnicas de Análisis: NTE INEN 2594-2011
Se desconoce los parámetros idóneos de operación para la obtención de una bebida probiótica a partir del	Realizar ensayos experimentales con diferentes parámetros de operación en la fermentación del lactosuero usando <i>Streptococcus</i>	La bebida obtenida con <i>Streptococcus thermophilus</i> y <i>Lactobacillus casei</i> cumplirá con las características para ser considerada como una bebida	<b>Variable Independiente:</b> Tipo de fermento Temperatura Concentración de Inóculo <b>Variable Dependiente:</b>	Potenciómetro

lactosuero utilizando <i>Streptococcus thermophilus</i> y <i>Lactobacillus casei</i>	<i>thermophilus</i> y <i>Lactobacillus casei</i>	probiótica según la norma NTE INEN 2395.	pH Tiempo de fermentación	
El comportamiento fermentativo que <i>Streptococcus thermophilus</i> pueda desarrollar frente al lactosuero de la planta láctea JB es desconocido.	Evaluar el proceso de fermentación del lactosuero con la bacteria <i>Streptococcus thermophilus</i> para la obtención de una bebida probiótica.	La bebida obtenida con <i>Streptococcus thermophilus</i> y <i>Lactobacillus casei</i> cumplirá con las características para ser considerada como una bebida probiótica según la norma NTE INEN 2395.	<b>Variable Independiente:</b> Temperatura Concentración de Inóculo <b>Variable Dependiente:</b> Tiempo de fermentación Cantidad de bacterias ácido lácticas presentes en la muestra	Conteo de microorganismos: NTE INEN 1529-5:2006
El comportamiento fermentativo que <i>Lactobacillus casei</i> pueda desarrollar frente al lactosuero de la planta láctea JB es desconocido.	Evaluar el proceso de fermentación del lactosuero con la bacteria <i>Lactobacillus casei</i> para la obtención de una bebida probiótica	La bebida obtenida con <i>Streptococcus thermophilus</i> y <i>Lactobacillus casei</i> cumplirá con las características para ser considerada como una bebida probiótica según la norma NTE INEN 2395.	<b>Variable Independiente:</b> Temperatura Concentración de Inóculo <b>Variable Dependiente:</b> Tiempo de fermentación Cantidad de bacterias ácido lácticas presentes en la muestra	Conteo de microorganismos: NTE INEN 1529-5:2006
Se desconoce cuál de los resultados fermentativos de <i>Streptococcus thermophilus</i> y <i>Lactobacillus casei</i> es más idóneo para la	Comparar los resultados obtenidos entre los procesos de fermentación con <i>Streptococcus thermophilus</i> y <i>Lactobacillus casei</i>	La evaluación de los distintos tratamientos para la fermentación del lactosuero con <i>Streptococcus thermophilus</i> y <i>Lactobacillus casei</i> permitirá determinar las condiciones	<b>Variable Independiente:</b> Tipo de bacteria Temperatura Concentración de Inóculo <b>Variable Dependiente:</b> Tiempo de fermentación	Comparación de resultados

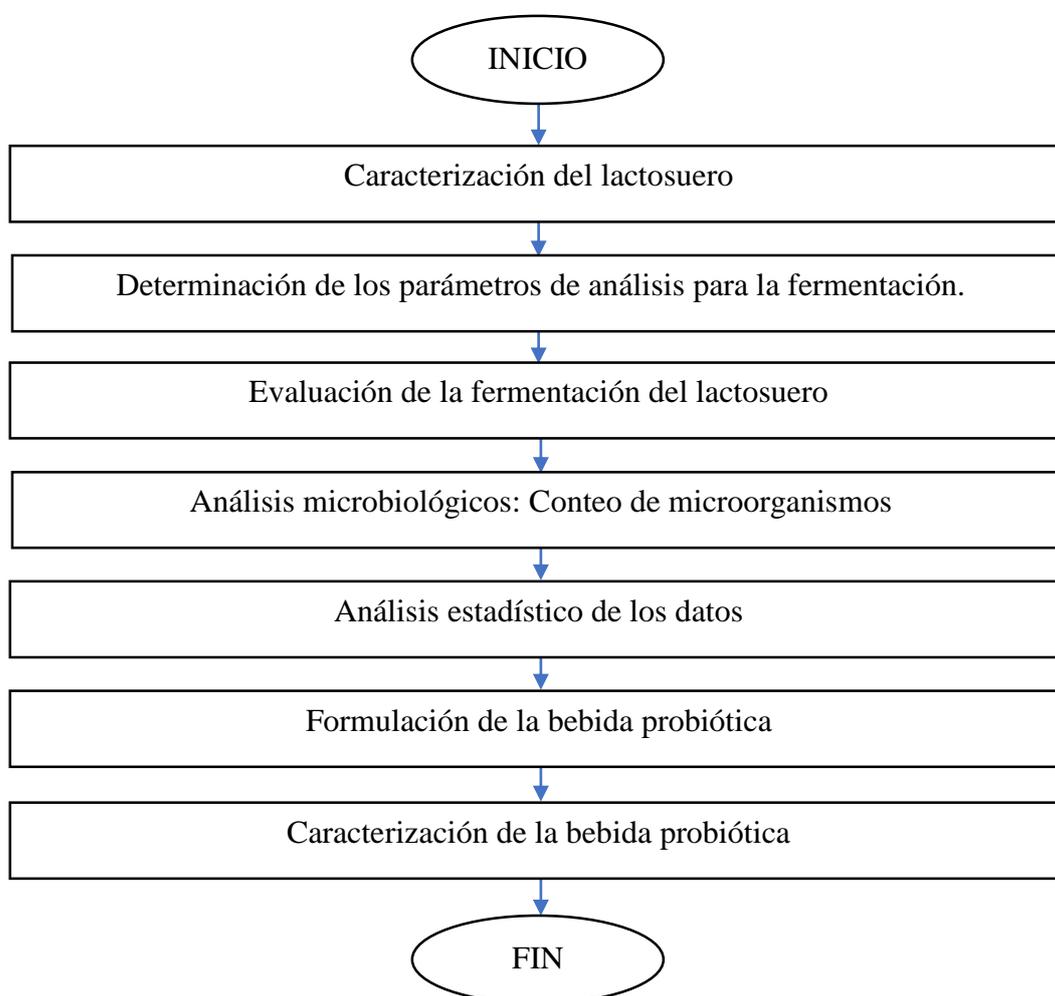
obtención de una bebida probiótica de la planta láctea JB.		óptimas para la obtención de una bebida probiótica	Cantidad de bacterias ácido lácticas presentes en la muestra Composición de la bebida probiótica.	
Se desconoce cuál de los microorganismos y condiciones de operación son más idóneos para la obtención de una bebida probiótica de la planta láctea JB.	Determinar el microorganismo más adecuado, así como las condiciones ideales de operación para la elaboración de una bebida probiótica en la Planta Láctea JB.	La evaluación de los distintos tratamientos para la fermentación del lactosuero con <i>Streptococcus thermophilus</i> y <i>Lactobacillus casei</i> permitirá determinar las condiciones óptimas para la obtención de una bebida probiótica	<b>Variable Independiente:</b> Tipo de bacteria Temperatura Concentración de Inóculo <b>Variable Dependiente:</b> Tiempo de fermentación Cantidad de bacterias ácido lácticas presentes en la muestra Composición de la bebida probiótica.	Evaluación de resultados

Realizado por: Danya Brito, Jean Vásquez, 2019.

### 3.2. Tipo y diseño de la investigación

Este trabajo de titulación es de tipo EXPLORATORIO debido a que se busca encontrar las variables que afectan la investigación, en este caso las variables que intervienen en la fermentación del lactosuero, y es de tipo DESCRIPTIVO ya que describe la relación entre las variables y sus efectos, en este caso los efectos de las variables en la fermentación del lactosuero con las bacterias *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus casei* para la obtención de una bebida probiótica.

La investigación siguió la siguiente metodología general:



#### 3.2.1. Diseño Experimental

La investigación se desarrolló a partir de muestras de lactosuero de la Planta Láctea JB y como pre requisito se realizaron los análisis bromatológicos para comprobar que cumpla con los requisitos de la norma NTE INEN 2594-2011.

Se tomaron en cuenta 2 variables principales: temperatura y concentración de inóculo para determinar las condiciones óptimas del proceso.

El diseño experimental es de tipo factorial 2<sup>2</sup>, utilizando la cepa bacteriana *S. thermophilus* y *L. casei* en 4 tratamientos para cada una como se indica en las siguientes tablas.

**Tabla 3-3:** Tratamientos del lactosuero con *Streptococcus thermophilus*

	C1	C2
T1	X <sub>T1C1</sub>	X <sub>T1C2</sub>
T2	X <sub>T2C1</sub>	X <sub>T2C2</sub>

Realizado por: Danya Brito, Jean Vásquez, 2019.

Donde:

C= Concentración de Inóculo (g/L)

T=Temperatura de fermentación °C

X= Tratamiento del lactosuero con *Streptococcus thermophilus* con diferentes condiciones

**Tabla 4-3:** Tratamientos del lactosuero con *Lactobacillus casei*

	C1	C2
T1	Y <sub>T1C1</sub>	Y <sub>T1C2</sub>
T2	Y <sub>T2C1</sub>	Y <sub>T2C2</sub>

Realizado por: Danya Brito, Jean Vásquez, 2019.

Donde:

C= Concentración de Inóculo (g/L)

T=Temperatura de fermentación

Y=Tratamiento del lactosuero con *Lactobacillus casei*

Finalmente, se analizaron los datos estadísticamente y se determinaron las condiciones óptimas para la fermentación del lactosuero para la obtención de una bebida probiótica.

### 3.3. Unidad de análisis

Bebida probiótica a partir de la fermentación del lactosuero de la Planta Láctea JB con las bacterias *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus casei*.

### ***3.4. Población de estudio***

La investigación se llevó a cabo tomando como sujeto de estudio el lactosuero generado como residuo del proceso de producción de queso fresco de la Planta Láctea JB.

### ***3.5. Tamaño de muestra***

Para el tamaño de la muestra se siguió el procedimiento establecido en la norma NTE INEN 4, para el muestreo de leche y productos lácteos. Se tomaron 3 muestras de lactosuero de la Planta Láctea JB de 1 Litro por día.

Para cada tratamiento establecido se realizaron pruebas por triplicado.

### ***3.6. Selección de muestra***

La planta Láctea JB produce diariamente 160 litros de lactosuero dulce aproximadamente. La muestra utilizada en la investigación se tomó al azar del recipiente que contiene el lactosuero producido del proceso de elaboración de queso fresco en la Planta Láctea JB, inmediatamente después de la agitación.

### ***3.7. Técnicas de recolección de datos***

#### ***3.7.1. Caracterización del lactosuero***

Los parámetros físicos se determinaron mediante observación y análisis directo de la bebida probiótica, determinando el olor, color, sabor y aspecto del lactosuero. La caracterización físico-química y microbiológica de la bebida probiótica se realizó siguiendo los parámetros establecidos en la norma NTE INEN 2594:2011 (Ver ANEXO A). Los análisis se llevaron a cabo en el laboratorio SAQMIC, ubicado en la ciudad de Riobamba.

#### ***3.7.2. Determinación de parámetros de estudio***

Los parámetros o condiciones de fermentación del lactosuero para la obtención de una bebida probiótica se determinaron mediante revisión bibliográfica y de las fichas técnicas del proveedor.

### **3.7.3. *Obtención del lactosuero fermentado***

Para la obtención del lactosuero fermentado se sigue el siguiente procedimiento.

1. Toma de muestra de los tanques de lactosuero
2. Filtrar el lactosuero.
3. Pasteurizar el lactosuero.
4. Medir el pH del lactosuero.
5. Añadir el inóculo.
6. Incubar las muestras hasta que el pH alcance los valores deseados.
7. Refrigerar las muestras.

Para el análisis de datos se grafican las curvas de pH se realizaron a partir de las variaciones del pH de las muestras en función del tiempo de fermentación. El proceso se llevó a cabo para cada uno de los cuatro tratamientos establecidos para cada bacteria.

### **3.7.4. *Recuento de colonias en placa y calculo total de bacterias ácido lácticas en el lactosuero fermentado***

Se determinó la cantidad de microorganismos que contiene una muestra mediante un recuento en placa según el siguiente procedimiento (Bonilla et al, 2016):

1. Preparar la primera dilución con 10 mL de muestra en 90 mL de agua peptonada.
2. Las siguientes diluciones se preparan a partir de la anterior, agregando 1 mL de muestra en 9 ml de agua peptonada.
3. Se adiciona 1 mL de cada dilución en placas Petri de vidrio. Cada dilución se siembra por duplicado.
4. Se agrega 15 mL de agar a 45°C en cada caja.
5. Se incluye una caja sin inóculo como blanco. No debe presentar colonias.
6. Homogeneizar el contenido de cada caja.
7. Incubar las cajas en posición invertida a la temperatura especificada por cada microorganismo entre 24 a 72 horas.
8. Contar aquellas placas que contengan entre 15 y 300 colonias.
9. Reportar los resultados.

A partir del recuento en placa de las muestras se determina la cantidad de microorganismos por mililitro que tiene una muestra.

$$N = \frac{\sum c}{V \times n \times d}$$

Donde:

$\sum c$  = Suma total de colonias de las cajas seleccionadas.

$V$  = Volumen inoculado en cada caja Petri.

$n$  = Número de placas seleccionadas.

$d$  = Factor de la dilución seleccionada.

El recuento de colonias en placa y cálculo total de bacterias ácido lácticas se lleva a cabo para cada uno de los tratamientos establecidos para cada bacteria.

### 3.7.5. *Análisis del diseño experimental y análisis de varianza*

Se analizó el diseño experimental con los resultados encontrados para determinar los efectos de los factores (temperatura y concentración) sobre la cantidad total de bacterias ácido lácticas en las muestras de lactosuero fermentado.

Los efectos estimados de los factores sobre el lactosuero fermentado se calcularon mediante las fórmulas:

$$\text{Efecto factor A} = \frac{1}{2n} [a + ab - b - (1)]$$

$$\text{Efecto factor B} = \frac{1}{2n} [b + ab - a - (1)]$$

$$\text{Efecto interacción AB} = \frac{1}{2n} [ab + (1) - a - b]$$

Los datos obtenidos en los tratamientos se analizaron mediante un Análisis de Varianza (ANOVA), para establecer la contribución de los factores y de su interacción en la variable dependiente, en nuestro caso la cantidad total de bacterias ácido lácticas de cada muestra. El análisis de varianza se llevó a cabo mediante la utilización del software IBM SPSS Statistics.

### 3.7.6. *Comparación de formulaciones*

Se compararon los tratamientos del lactosuero fermentado con *Streptococcus thermophilus* y los tratamientos de las muestras de lactosuero fermentado con *Lactobacillus casei* para determinar el tratamiento óptimo para la obtención de una bebida probiótica.

### **3.7.7. *Formulación de la bebida probiótica***

A partir de la determinación de los parámetros adecuados de fermentación del lactosuero se realiza la formulación de una bebida probiótica con los aditivos necesarios para que sea aceptable para los consumidores.

### **3.7.8. *Caracterización de la bebida probiótica***

Los parámetros físicos se determinaron mediante observación y análisis directo de la bebida probiótica, determinando el olor, color, sabor y aspecto del lactosuero.

La caracterización físico-química y microbiológica de la bebida probiótica se realizó siguiendo los parámetros establecidos en la norma NTE INEN 2609:2012 (Ver ANEXO B). Los análisis se llevaron a cabo en el laboratorio SAQMIC, ubicado en la ciudad de Riobamba.

### **3.7.9. *Análisis sensorial de la bebida probiótica***

El análisis sensorial se llevó a cabo para tomar decisiones de producción y comercialización a nivel industrial de acuerdo a las preferencias de personas encuestadas sobre la bebida. Se realizaron tres formulaciones de la bebida con tres sabores diferentes (mora, guanábana y durazno), se encuestó a posibles consumidores (personas no entrenadas o jueces afectivos) para comparar los tres productos elaborados de acuerdo a los criterios de sabor, olor, color y consistencia. Al escoger para la investigación como jueces a personas no entrenadas, se requiere encuestar a 100 o más personas para obtener resultados que se apeguen con la realidad de acuerdo a las preferencias. La encuesta se desarrolló como una prueba hedónica modificada a tres escalas de puntuación para cada atributo analizado, se dio a elegir a 150 personas la bebida que más le gustó y se dieron alternativas para cada bebida de: me gusta, ni me gusta ni me disgusta, no me gusta.

Para la encuesta se designó números al azar a las tres formulaciones establecidas:

**Tabla 5-3:** Asignación de números al azar para las formulaciones

FORMULACIÓN	DESCRIPCIÓN	NÚMERO AL AZAR
Formulación 1	Bebida fermentada de lactosuero sabor a durazno	7508
Formulación 2	Bebida fermentada de lactosuero sabor a guanábana	4886
Formulación 3	Bebida fermentada de lactosuero sabor a mora	2062

**Realizado por:** Danya Brito, Jean Vásquez, 2019.

Una vez realizada la encuesta se tabularon los resultados, se asignaron valores a cada una de las opciones de respuesta: me gusta (3), no me gusta ni me disgusta (2), no me gusta (1) y mediante la prueba de Kruskal-Wallis se determinó la significancia de los atributos analizados en los resultados de aceptación de la bebida probiótica.

La prueba Kruskal-Wallis se utiliza cuando la investigación tiene datos no paramétricos para determinar si las muestras analizadas provienen de la misma población mediante la comparación de sus medianas (Spiegel y Stephens 2009).

### **3.7.10. Tiempo de vida de anaquel**

El tiempo de vida de anaquel representa la cantidad de tiempo, desde su elaboración, que un producto mantiene valores de calidad aceptable para el consumidor. La importancia de la determinación de este parámetro es importante debido a que es necesario para la planta asegurar que las características del producto se mantengan satisfactorias durante el mayor tiempo posible. La determinación del tiempo de vida permite a la empresa manejar los tiempos de consumo y distribución de los productos a partir desde su fabricación, almacenaje, distribución y consumo (Giraldo 1999).

Las bebidas lácteas se consideran productos perecibles por lo que se requiere determinar su tiempo de vida de anaquel, para garantizar condiciones de calidad del producto al consumidor. Se analizó la bebida de preferencia de los consumidores, almacenada en refrigeración ( $4^{\circ} \pm 2^{\circ} \text{C}$ ), en envases de polietileno durante 21 días, determinando cada 7 días, parámetros organolépticos (consistencia, sabor, color y olor), pH y la cantidad de bacterias lácticas presentes en la bebida.

## CAPÍTULO IV

### 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 4.1. Análisis de resultados

##### 4.1.1. Caracterización del lactosuero

##### 4.1.1.1. Caracterización física del lactosuero

Mediante la observación y análisis directo de la muestra se determinaron las características físicas del lactosuero con respecto a los parámetros de olor, color, sabor y aspecto.

**Tabla 1-4:** Resultados de la caracterización física del lactosuero

Parámetro	Descripción
Color	Característico: amarillo
Sabor	Característico: ligeramente dulce
Olor	Característico
Aspecto	Normal, libre de material extraño

Realizado por: Danya Brito, Jean Vásquez, 2019

En el análisis físico realizado se pudo observar que el lactosuero de la Planta Láctea JB tiene el color, sabor y olor característico de un lactosuero dulce. Además, su aspecto es normal y está libre de material extraño. De acuerdo a la caracterización física, el lactosuero está apto para ser utilizado como materia prima para la obtención de una bebida probiótica.

##### 4.1.1.2. Caracterización bromatológica del lactosuero

Se analizaron los parámetros bromatológicos del lactosuero de la planta láctea JB para compararlos con los requisitos establecidos en la norma NTE INEN 2594:2011.

**Tabla 2-4:** Resultados de la caracterización bromatológica del lactosuero

Parámetro	Unidad	Método de análisis	Valor	Requisitos de la norma para suero de leche dulce NTE INEN 2594:2011	
				Min.	Max.
Azúcares totales	%	INEN 398	4,12	-	5
Proteína	%	INEN 016	2,64	0,8	-
Grasa	%	INEN 012	0,10	-	0,3
Acidez titulable	%	INEN 013	0,11	-	0,16
pH		-	6,44	6,8	6,4
Ceniza	%	INEN 544	0,29	-	0,7

Realizado por: Danya Brito, Jean Vásquez, 2019

Mediante la caracterización bromatológica del lactosuero se determina que, en cuanto a los parámetros de azúcares totales, proteína y grasa, el lactosuero de la Planta Láctea JB, se encuentra cumpliendo los requisitos de acuerdo a la norma NTE INEN 2594, para suero de leche dulce.

#### 4.1.1.3. Caracterización microbiológica del lactosuero

Se analizó el lactosuero de la Planta Láctea JB, de acuerdo a los parámetros microbiológicos establecidos en la norma NTE INEN 2594:2011.

**Tabla 3-4:** Resultados de la caracterización microbiológica del lactosuero

Parámetro	Unidad	Método	Resultado	Requisitos de la norma para suero de leche NTE INEN 2594:2011	
				Mínimo	Máximo
Recuento de microorganismos aerobios mesófilos	UFC/mL	Siembra en masa	270000	30000	100000
Recuento de <i>Escherichia coli</i>	UFC/mL	Siembra en masa	10	<10	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	UFC/mL	Siembra en masa	600	-	100
<i>Salmonella</i>	UFC/25mL	Reveal 2.0	Negativo	Ausencia	
Detección de <i>Listeria monocytogenes</i>	UFC/mL	Siembra en masa	Negativo	Ausencia	

Realizado por: Danya Brito, Jean Vásquez, 2019

Se observa que, en cuanto a la caracterización microbiológica, en los análisis de recuento de microorganismos aerobios mesófilos, recuento de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, los valores encontrados sobrepasan los límites permisibles de acuerdo con los requisitos establecidos en la norma NTE INEN 2594, por lo que se requiere de un proceso de pasteurización previo a la fermentación del lactosuero para la obtención de una bebida probiótica. Los indicadores de presencia de *Salmonella* y *Listeria monocytogenes* fueron negativos y se encuentran cumpliendo con la norma.

#### 4.1.2. Determinación de parámetros de estudio

La fermentación se realizó con las bacterias lácticas previamente establecidas (*Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus casei*) al ser denominadas probióticas y tener numerosos beneficios para la salud. Las cepas probióticas utilizadas son de la marca comercial Lactina Ltd., se obtuvo las cepas a través de Rila Import SA.

#### 4.1.2.1. Fermentación con *Streptococcus thermophilus*

De acuerdo al rango de temperatura óptima de crecimiento para *Streptococcus thermophilus* se escogieron 2 valores de temperaturas (42°C y 45°C) como condiciones de fermentación para la obtención del lactosuero fermentado.

Para la concentración de inóculo se tomó en consideración la información especificada por el proveedor (Rila Import SA). Se consideraron concentraciones de 0,07 g/L y 0,09 g/L.

De acuerdo a los valores de los parámetros de estudio establecidos y el análisis experimental se tienen 4 tratamientos para la fermentación del lactosuero con *Streptococcus thermophilus*.

**Tabla 4-4:** Tratamientos del lactosuero con *Streptococcus thermophilus*.

	Concentración de inóculo 0,07 g/L	Concentración de inóculo 0,09 g/L
Temperatura=42°C	Tratamiento 1	Tratamiento 2
Temperatura=45°C	Tratamiento 3	Tratamiento 4

Realizado por: Danya Brito, Jean Vásquez, 2019

#### 4.1.2.2. Fermentación con *Lactobacillus casei*

Se escogieron 2 valores de temperaturas para el estudio de la fermentación del lactosuero con *Lactobacillus casei*, en este caso las temperaturas de 37°C y 39°C, que son temperaturas de crecimiento óptimo para este microorganismo.

Para la concentración de inóculo se consideraron los valores de 0,07 g/L y 0,09 g/L, de acuerdo a información especificada por el proveedor (Rila Import SA.).

De acuerdo al diseño experimental se consideraron 4 tratamientos para la fermentación del lactosuero con *Lactobacillus casei*, combinando los parámetros establecidos.

**Tabla 5-4:** Tratamientos del lactosuero con *Lactobacillus casei*

	Concentración de inóculo 0,07 g/L	Concentración de inóculo 0,09 g/L
Temperatura=37°C	Tratamiento 1	Tratamiento 2
Temperatura=39°C	Tratamiento 3	Tratamiento 4

Realizado por: Danya Brito, Jean Vásquez, 2019

#### 4.1.3. Obtención del lactosuero fermentado

Se siguió el procedimiento establecido para la obtención de lactosuero fermentado y se tomó el pH de las muestras periódicamente para analizar su variación en función del tiempo hasta que se alcanzó un pH entre los valores de 4 y 4,5. La fermentación se llevó a cabo con las dos bacterias probióticas seleccionadas (*Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus casei*), de acuerdo con el análisis experimental, cada uno se llevó a cabo mediante 4 tratamientos con los parámetros establecidos, cada uno de ellos se realizó con 3 repeticiones. Para la evaluación de la fermentación se determinó y se analizó la variación de pH del lactosuero con respecto al tiempo de fermentación, el recuento de bacterias lácticas en el lactosuero fermentado y la relación entre las variables estudiadas (temperatura y concentración del inóculo).

#### 4.1.4. Fermentación con *Streptococcus thermophilus*

El proceso de fermentación de lactosuero con *Streptococcus thermophilus* se llevó a cabo para cada uno de los 4 tratamientos establecidos, cada uno se realizó con 3 repeticiones.

##### 4.1.4.1. Tratamiento 1

El tratamiento 1 para la fermentación de lactosuero con *Streptococcus thermophilus* se realiza con los parámetros de la tabla 6-4.

**Tabla 6-4:** Parámetros de fermentación para el tratamiento 1 con *Streptococcus thermophilus*

Microorganismo: <i>Streptococcus thermophilus</i>	
Temperatura de fermentación	Concentración del inóculo=
42°C	0,07g/L

Realizado por: Danya Brito, Jean Vásquez, 2019

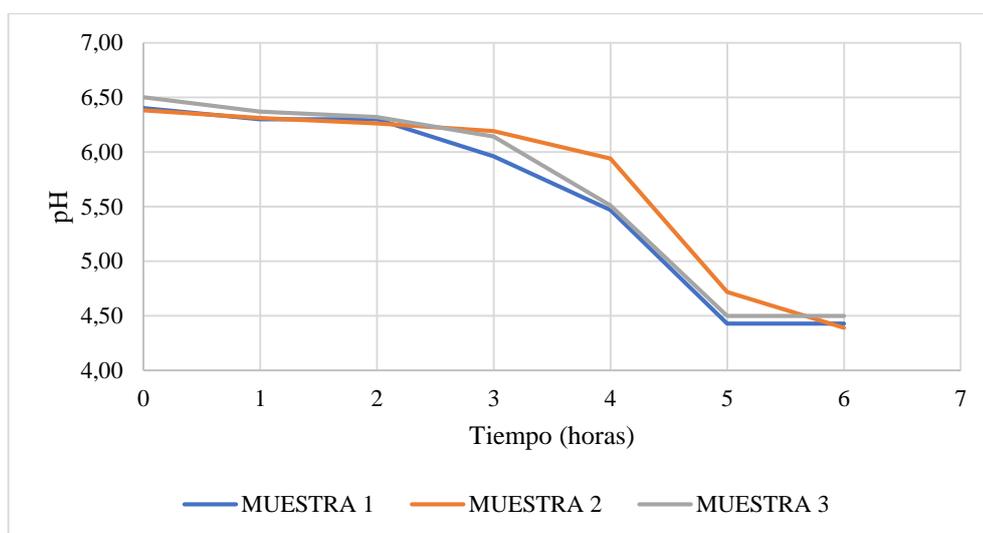
- Variación del pH del lactosuero con respecto al tiempo de fermentación

La fermentación del lactosuero con *Streptococcus thermophilus* se realizó obteniendo los siguientes datos:

**Tabla 7-4:** pH de lactosuero con el Tratamiento 1 con *Streptococcus thermophilus*

Tiempo (horas)	pH		
	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3
0	6,4	6,38	6,5
1	6,3	6,31	6,37
2	6,3	6,26	6,32
3	5,96	6,19	6,14
4	5,47	5,94	5,51
5	4,43	4,72	4,5
6	4,43	4,39	4,5

Realizado por: Danya Brito, Jean Vásquez, 2019



**Gráfico 2-4:** pH vs Tiempo de fermentación con *S. thermophilus* (Tratamiento 1)

Realizado por: Danya Brito, Jean Vásquez, 2019

Las tres muestras fueron sometidas a las mismas condiciones de fermentación previamente establecidas mediante el tratamiento 1. Se observa que mediante la fermentación del lactosuero se alcanzaron los valores deseados de pH deseados entre 4 y 4,5 en 6 horas. Dentro del análisis se destaca que los valores obtenidos de pH comienzan a descender abruptamente desde la segunda hasta la quinta hora donde los valores de pH comienzan a descender lentamente. La disminución de pH verifica la formación de ácido láctico a partir de la lactosa del lactosuero.

- *Recuento de colonias en placa y calculo total de bacterias ácido lácticas en el lactosuero fermentado*

Una vez concluido el proceso de fermentación, se continúa el proceso con el recuento de la cantidad de colonias mediante la técnica de siembra en placa para determinar la cantidad total de bacterias ácido lácticas que contiene el lactosuero fermentado.

**Tabla 8-4:** Recuento en placa de colonias en agar M17 con el Tratamiento 1

Dilución	CANTIDAD DE COLONIAS POR PLACA					
	MUESTRA 1		MUESTRA 2		MUESTRA 3	
	Placa 1	Placa 2	Placa 1	Placa 2	Placa 1	Placa 2
10 <sup>-1</sup>	Incontable	Incontable	Incontable	Incontable	Incontable	Incontable
10 <sup>-2</sup>	Incontable	Incontable	Incontable	Incontable	Incontable	Incontable
10 <sup>-3</sup>	Incontable	Incontable	Incontable	Incontable	Incontable	Incontable
10 <sup>-4</sup>	Incontable	Incontable	Incontable	Incontable	Incontable	Incontable
10 <sup>-5</sup>	Incontable	Incontable	Incontable	Incontable	Incontable	Incontable
10 <sup>-6</sup>	Incontable	Incontable	Incontable	Incontable	Incontable	Incontable
10 <sup>-7</sup>	50	60	97	104	70	86
10 <sup>-8</sup>	0	1	9	17	13	3

Realizado por: Danya Brito, Jean Vásquez, 2019

Se realizó el recuento de microorganismo de las tres muestras de lactosuero fermentado con el Tratamiento 1 para determinar la cantidad total de microorganismos presentes, en este caso, es de nuestro interés determinar la cantidad de bacterias lácticas presentes. Se utilizó agar M17, el cual favorece el crecimiento de *Streptococcus thermophilus*. Cada muestra se sembró por duplicado para disminuir el margen de error. Se realizaron 8 diluciones, obteniendo resultados contables a partir de la séptima dilución.

**Tabla 9-4:** Cantidad total de microorganismos por muestra (Tratamiento 1)

	Cantidad total de microorganismos por muestra (UFC/g)
MUESTRA 1	5,5x10 <sup>8</sup>
MUESTRA 2	1,0x10 <sup>9</sup>
MUESTRA 3	7,8x10 <sup>8</sup>

Realizado por: Danya Brito, Jean Vásquez, 2019

El cálculo de la cantidad total de microorganismos por muestra se efectuó tomando el recuento en placa de colonias de las diluciones que contengan entre 15 y 300 colonias. Para las 3 muestras se obtuvieron valores altos. Los valores de las 3 muestras cumplen con el requisito de la norma para bebidas lácteas probióticas que establece que deben contener un número de bacterias lácticas superior a 10<sup>6</sup> UFC/g, por lo que el tratamiento 1 es viable para la obtención de una bebida probiótica.

#### 4.1.4.2. Tratamiento 2

El tratamiento 2 para la fermentación de lactosuero con *Streptococcus thermophilus* se realiza con los parámetros de la tabla 10-4 para las tres repeticiones.

**Tabla 10-4:** Parámetros de fermentación para el tratamiento 2 con *Streptococcus thermophilus*

Microorganismo: <i>Streptococcus thermophilus</i>	
Temperatura de fermentación	Concentración del inóculo
42°C	0,09g/L

Realizado por: Danya Brito, Jean Vásquez, 2019

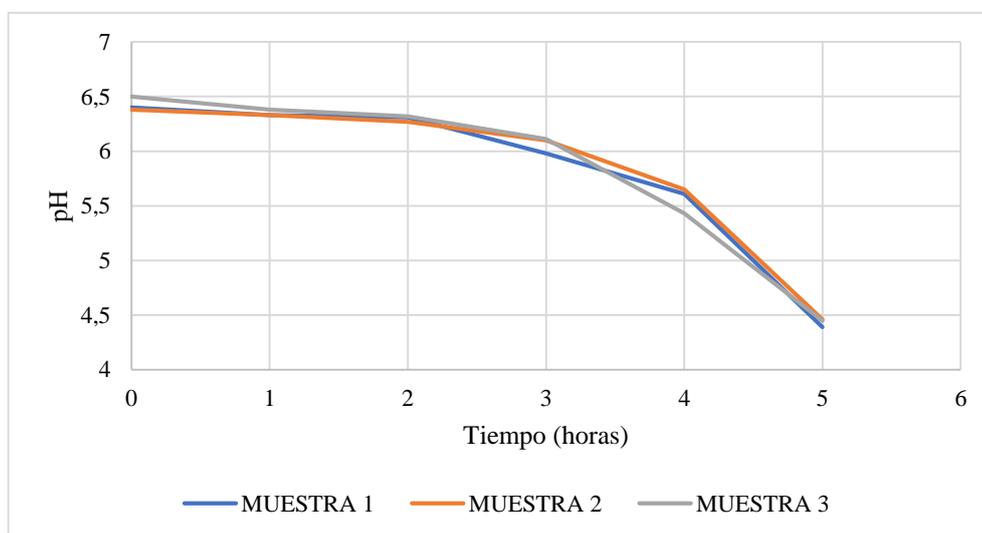
- Variación del pH del lactosuero con respecto al tiempo de fermentación

La fermentación del lactosuero con *Streptococcus thermophilus* mediante el tratamiento 2 se realizó obteniendo los siguientes datos:

**Tabla 11-4:** pH de lactosuero con el Tratamiento 2 con *Streptococcus thermophilus*

Tiempo (horas)	pH		
	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3
0	6,4	6,38	6,5
1	6,33	6,33	6,38
2	6,31	6,27	6,32
3	5,98	6,1	6,11
4	5,61	5,65	5,43
5	4,39	4,46	4,45

Realizado por: Danya Brito, Jean Vásquez, 2019



**Gráfico 3-4:** pH vs Tiempo de fermentación con *S. thermophilus* (Tratamiento 2)

Realizado por: Danya Brito, Jean Vásquez, 2019

La fermentación del lactosuero con los parámetros establecidos para el tratamiento 2 también se realizó con 3 repeticiones. En este caso, el lactosuero fermentado alcanzó el valor de pH deseado entre 4 y 4,5 en 5 horas. Los valores obtenidos de pH disminuyen abruptamente desde la segunda hasta la quinta hora donde los pH alcanzaron el valor deseado.

- *Recuento de colonias en placa y calculo total de microorganismos en el lactosuero fermentado*

Una vez concluido el proceso de fermentación del lactosuero con *Streptococcus thermophilus* mediante el tratamiento 2 se continúa con el recuento de colonias en la muestra mediante la técnica de sembrado en placa.

**Tabla 12-4:** Recuento en placa de colonias en agar M17 con el Tratamiento 2

Dilución	CANTIDAD DE COLONIAS POR PLACA					
	MUESTRA 1		MUESTRA 2		MUESTRA 3	
	Placa 1	Placa 2	Placa 1	Placa 2	Placa 1	Placa 2
10 <sup>-1</sup>	Incontable	Incontable	Incontable	Incontable	Incontable	Incontable
10 <sup>-2</sup>	Incontable	Incontable	Incontable	Incontable	Incontable	Incontable
10 <sup>-3</sup>	Incontable	Incontable	Incontable	Incontable	Incontable	Incontable
10 <sup>-4</sup>	Incontable	Incontable	Incontable	Incontable	Incontable	Incontable
10 <sup>-5</sup>	Incontable	Incontable	Incontable	Incontable	Incontable	Incontable
10 <sup>-6</sup>	446	213	Incontable	Incontable	Incontable	Incontable
10 <sup>-7</sup>	41	24	272	145	62	57
10 <sup>-8</sup>	0	7	32	24	6	2

Realizado por: Danya Brito, Jean Vásquez, 2019

Se sembraron las 3 muestras en agar M17, para establecer la cantidad de bacterias lácticas en cada muestra fermentada con *Streptococcus thermophilus* mediante el segundo tratamiento. Cada una de las muestras se sembró en 2 placas y se efectuaron 8 diluciones. Se obtuvieron valores contables a partir de las sexta y séptima dilución. Para los cálculos del total de microorganismos en una muestra se tomaron en consideración los valores de la séptima dilución debido a que estos valores se encuentran entre 15 y 300 colonias.

**Tabla 13-4:** Cantidad total de microorganismos por muestra (Tratamiento 2)

	Cantidad total de microorganismos por muestra (UFC/g)
<b>MUESTRA 1</b>	3,3x10 <sup>8</sup>
<b>MUESTRA 2</b>	2,1x10 <sup>9</sup>
<b>MUESTRA 3</b>	6,0x10 <sup>9</sup>

Realizado por: Danya Brito, Jean Vásquez, 2019

Se determinó la cantidad total de microorganismos de las 3 muestras fermentadas con los parámetros del tratamiento 2 y se obtuvieron valores superiores al valor mínimo establecido por la norma para bebidas lácteas probióticas 10<sup>6</sup> UFC/g, esto indica que el tratamiento 2 es factible como proceso para obtener una bebida probiótica.

#### 4.1.4.3. Tratamiento 3

El tratamiento 3 para la fermentación de lactosuero con *Streptococcus thermophilus* se realiza con los parámetros de la tabla 14-4 para las tres repeticiones.

**Tabla 14-4:** Parámetros de fermentación para el tratamiento 3 con *Streptococcus thermophilus*

Microorganismo: <i>Streptococcus thermophilus</i>	
Temperatura de fermentación	Concentración de inóculo
45°C	0,07g/L

Realizado por: Danya Brito, Jean Vásquez, 2019

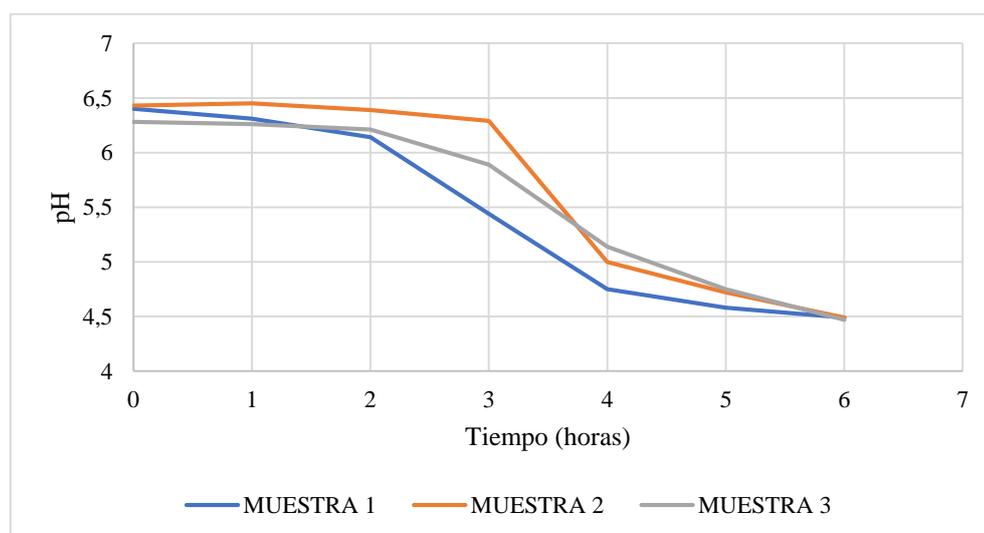
- Variación del pH del lactosuero con respecto al tiempo de fermentación

La fermentación del lactosuero con *Streptococcus thermophilus* mediante el tratamiento 3 se realizó obteniendo los siguientes datos:

**Tabla 15-4:** pH de lactosuero con el Tratamiento 3 con *Streptococcus thermophilus*

Tiempo (horas)	pH		
	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3
0	6,4	6,43	6,28
1	6,31	6,45	6,26
2	6,14	6,39	6,21
3	5,44	6,29	5,89
4	4,75	5,00	5,14
5	4,58	4,72	4,75
6	4,49	4,49	4,47

Realizado por: Danya Brito, Jean Vásquez, 2019



**Gráfico 4-4:** pH vs Tiempo de fermentación con *S. thermophilus* (Tratamiento 3)

Realizado por: Danya Brito, Jean Vásquez, 2019

El tratamiento 3 para la fermentación del lactosuero con *Streptococcus thermophilus* se llevó a cabo obteniendo resultados para 3 repeticiones. El valor de pH deseado entre 4 y 4,5 se obtuvo en 6 horas de fermentación. En este caso, los valores obtenidos de pH comienzan a descender rápidamente desde la tercera hasta la quinta hora donde los valores de pH comienzan a descender lentamente hasta la sexta hora donde se alcanza el valor de pH deseado.

- *Recuento de microorganismos en el lactosuero fermentado*

Una vez concluido el proceso de fermentación del lactosuero con *Streptococcus thermophilus* mediante el tratamiento 3 se continúa con el recuento de colonias en la muestra mediante la técnica de sembrado en placa.

**Tabla 16-4:** Recuento en placa de colonias en agar M17 con el Tratamiento 3

Dilución	CANTIDAD DE COLONIAS POR PLACA					
	MUESTRA 1		MUESTRA 2		MUESTRA 3	
	Placa 1	Placa 2	Placa 1	Placa 2	Placa 1	Placa 2
10 <sup>-1</sup>	Incontable	Incontable	Incontable	Incontable	Incontable	Incontable
10 <sup>-2</sup>	Incontable	Incontable	Incontable	Incontable	Incontable	Incontable
10 <sup>-3</sup>	Incontable	Incontable	Incontable	Incontable	Incontable	Incontable
10 <sup>-4</sup>	Incontable	Incontable	Incontable	Incontable	Incontable	Incontable
10 <sup>-5</sup>	Incontable	Incontable	Incontable	Incontable	Incontable	Incontable
10 <sup>-6</sup>	Incontable	Incontable	Incontable	Incontable	Incontable	Incontable
10 <sup>-7</sup>	113	99	74	78	64	67
10 <sup>-8</sup>	12	6	8	11	4	5

Realizado por: Danya Brito, Jean Vásquez, 2019

Las 3 muestras fueron sembradas en agar M17 para establecer la cantidad de bacterias lácticas en cada muestra fermentada con *Streptococcus thermophilus* mediante el tercer tratamiento. Cada una de las muestras se sembró en por duplicado y se efectuaron 8 diluciones. Se obtuvieron valores contables a partir de la séptima dilución. Los cálculos del total de microorganismos en una muestra se realizaron tomando en consideración los valores de la séptima dilución debido a que estos valores se encuentran entre 15 y 300 colonias.

**Tabla 17-4:** Cantidad total de microorganismos por muestra (Tratamiento 3)

	Cantidad total de microorganismos por muestra (UFC/g)
MUESTRA 1	1,1 x10 <sup>9</sup>
MUESTRA 2	7,6 x10 <sup>8</sup>
MUESTRA 3	6,6 x10 <sup>8</sup>

Realizado por: Danya Brito, Jean Vásquez, 2019

Calculando la cantidad total de bacterias lácticas por muestra, tomando el recuento en placa de colonias de las diluciones que contengan entre 15 y 300 colonias, se obtuvieron valores altos para las 3 muestras fermentadas con el tratamiento 3 con *Streptococcus thermophilus*. Los valores de las 3 muestras cumplen con el requisito de la norma para bebidas lácteas probióticas que establece que deben contener un número de bacterias lácticas superior a  $10^6$  UFC/g, por lo que el tratamiento 3 es viable para la obtención de una bebida probiótica.

#### 4.1.4.4. Tratamiento 4

El tratamiento 3 para la fermentación de lactosuero con *Streptococcus thermophilus* se realiza con los parámetros de la tabla 18-4 para las tres repeticiones.

**Tabla 18-4:** Parámetros de fermentación para el tratamiento 4 con *Streptococcus thermophilus*

Microorganismo: <i>Streptococcus thermophilus</i>	
Temperatura de fermentación	Concentración del inóculo
45°C	0,09g/L

Realizado por: Danya Brito, Jean Vásquez, 2019

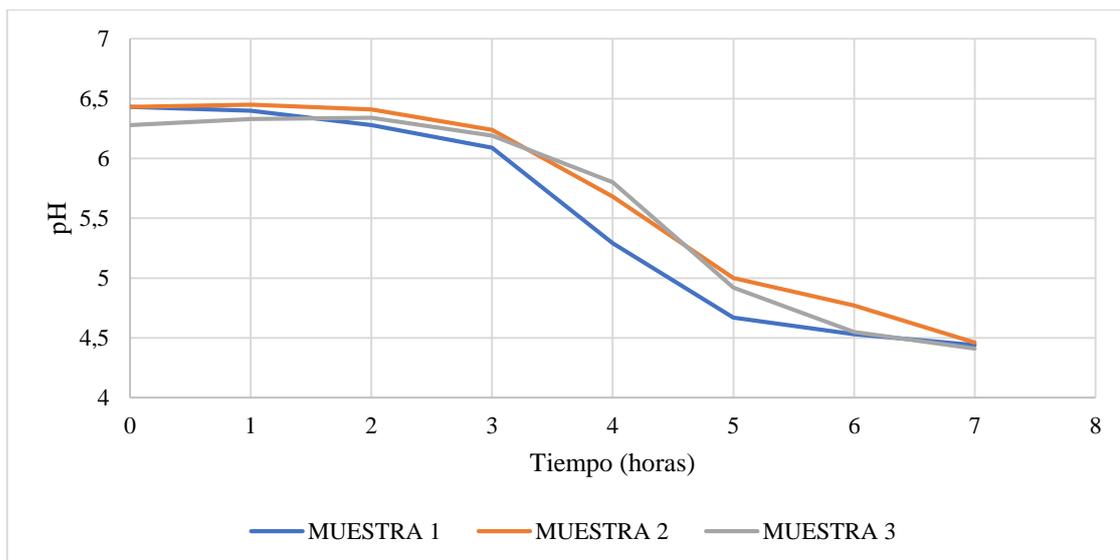
- Variación del pH del lactosuero con respecto al tiempo de fermentación

La fermentación del lactosuero con *Streptococcus thermophilus* mediante el tratamiento 4 se realizó obteniendo los siguientes datos:

**Tabla 19-4:** pH de lactosuero con el Tratamiento 4 con *Streptococcus thermophilus*

Tiempo (horas)	pH		
	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3
0	6,43	6,43	6,28
1	6,4	6,45	6,33
2	6,28	6,41	6,34
3	6,09	6,24	6,19
4	5,29	5,68	5,8
5	4,67	5,00	4,92
6	4,53	4,77	4,55
7	4,44	4,46	4,41

Realizado por: Danya Brito, Jean Vásquez, 2019



**Gráfico 5-4:** pH vs Tiempo de fermentación con *S. thermophilus* (Tratamiento 4)  
**Realizado por:** Danya Brito, Jean Vásconez, 2019

Las 3 repeticiones realizadas para la fermentación del lactosuero con *Streptococcus thermophilus* con el tratamiento 4 alcanzaron el valor de pH requerido entre 4 y 4,5 en 7 horas de proceso fermentativo. Para este proceso, los valores de pH de acuerdo a la curva descienden lentamente hasta la tercera hora a partir de la cual el pH desciende rápidamente hasta la 5 hora, durante la sexta y séptima hora el pH desciende lentamente hasta alcanzar el valor requerido.

- *Recuento de microorganismos en el lactosuero fermentado*

Una vez concluido el proceso de fermentación del lactosuero con *Streptococcus thermophilus* mediante el tratamiento 4 se continúa con el recuento de colonias en la muestra mediante la técnica de sembrado en placa.

**Tabla 20-4:** Recuento en placa de colonias en agar M17 con el Tratamiento 4

Dilución	CANTIDAD DE COLONIAS POR PLACA					
	MUESTRA 1		MUESTRA 2		MUESTRA 3	
	Placa 1	Placa 2	Placa 1	Placa 2	Placa 1	Placa 2
10 <sup>-1</sup>	Incontable	Incontable	Incontable	Incontable	Incontable	Incontable
10 <sup>-2</sup>	Incontable	Incontable	Incontable	Incontable	Incontable	Incontable
10 <sup>-3</sup>	Incontable	Incontable	Incontable	Incontable	Incontable	Incontable
10 <sup>-4</sup>	Incontable	Incontable	Incontable	Incontable	Incontable	Incontable
10 <sup>-5</sup>	Incontable	Incontable	Incontable	Incontable	Incontable	Incontable
10 <sup>-6</sup>	Incontable	Incontable	Incontable	Incontable	Incontable	Incontable
10 <sup>-7</sup>	93	84	66	74	44	42
10 <sup>-8</sup>	11	9	7	12	7	3

**Realizado por:** Danya Brito, Jean Vásconez, 2019

Se sembraron las 3 muestras en agar M17, para establecer la cantidad de bacterias lácticas en cada muestra fermentada con *Streptococcus thermophilus* mediante el segundo tratamiento. Cada una de las muestras se sembró en 2 placas y se efectuaron 8 diluciones. Se obtuvieron valores contables de colonias a partir de la séptima dilución. Se toman los valores de la séptima dilución para calcular la cantidad total de bacterias lácticas en cada muestra debido a que estos valores se encuentran entre 15 y 300 colonias.

**Tabla 21-4:** Cantidad total de microorganismos por muestra (Tratamiento 4)

	Cantidad total de microorganismos por muestra (UFC/g)
<b>MUESTRA 1</b>	8,9 x10 <sup>8</sup>
<b>MUESTRA 2</b>	7 x10 <sup>8</sup>
<b>MUESTRA 3</b>	4,3 x10 <sup>8</sup>

Realizado por: Danya Brito, Jean Vásquez, 2019

Se determinó la cantidad total de bacterias lácticas de las 3 muestras fermentadas con los parámetros del tratamiento 4 con *Streptococcus thermophilus* y se obtuvieron valores superiores al valor mínimo establecido por la norma para bebidas lácteas probióticas 10<sup>6</sup> UFC/g, esto indica que el tratamiento 4 es factible como proceso para obtener una bebida probiótica.

- *Análisis del diseño experimental y Análisis de varianza entre los 4 tratamientos con Streptococcus thermophilus*

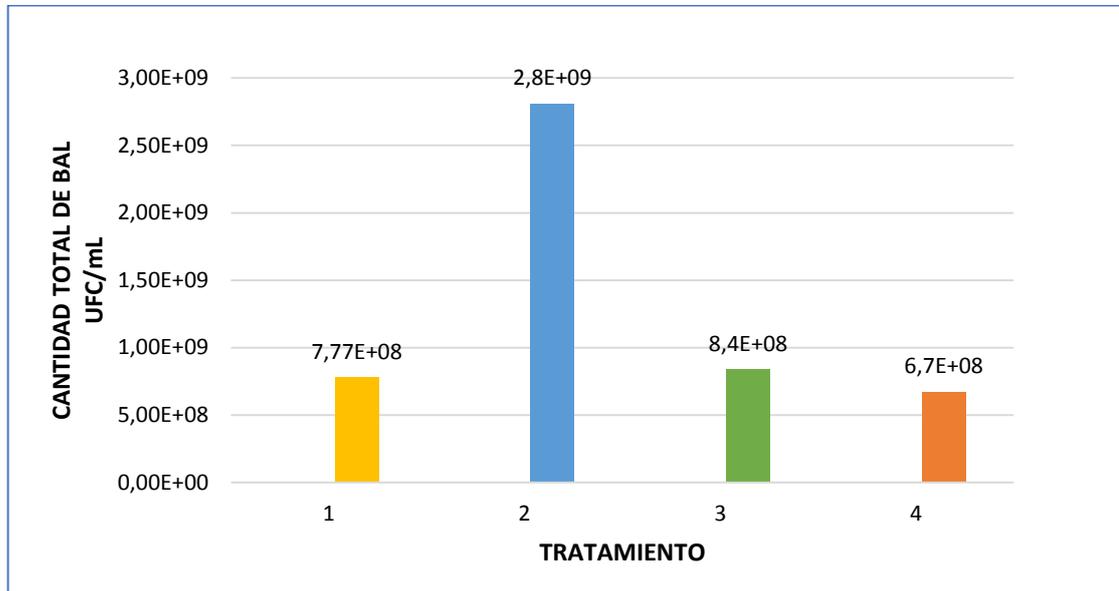
El análisis del diseño experimental se lleva a cabo con el fin de determinar el tratamiento que obtuvo los mejores resultados a partir de los datos obtenidos en la fermentación de las diferentes muestras de lactosuero.

**Tabla 22-4:** Diseño factorial 2<sup>2</sup> para la fermentación del lactosuero con *Streptococcus thermophilus*

Tratamiento	FACTOR A Temperatura °C	FACTOR B Concentración de inóculo g/L	Cantidad total de bacterias ácido lácticas por tratamiento (3 muestras) UFC/g	Promedio UFC/g	Notación Yates
1	42	0,07	5,5x10 <sup>8</sup>	7,77x10 <sup>8</sup>	(1)
			1,0x10 <sup>9</sup>		
			7,8 x10 <sup>8</sup>		
2	42	0,09	3,3x10 <sup>8</sup>	28,1x10 <sup>8</sup>	a
			2,1 x10 <sup>9</sup>		
			6,0 x10 <sup>9</sup>		
3	45	0,07	1,1 x10 <sup>9</sup>	8,4x10 <sup>8</sup>	b
			7,6 x10 <sup>8</sup>		
			6,6 x10 <sup>8</sup>		
4	45	0,09	8,9 x10 <sup>8</sup>	6,73x10 <sup>8</sup>	ab
			7 x10 <sup>8</sup>		
			4,3 x10 <sup>8</sup>		

Realizado por: Danya Brito, Jean Vásquez, 2019

Se compararon los resultados obtenidos en los 4 tratamientos analizados para la fermentación del lactosuero con *Streptococcus thermophilus* para observar la diferencia en los resultados obtenidos con cada uno de ellos.



**Gráfico 6-4:** Cantidad promedio de bacterias ácido lácticas por tratamiento para el lactosuero fermentado con *Streptococcus thermophilus*.

Realizado por: Danya Brito, Jean Vásquez, 2019

Comparando los resultados del conteo total de bacterias ácido lácticas en el lactosuero fermentado con *Streptococcus thermophilus* se observó que el tratamiento 2 obtuvo la mayor cantidad de bacterias.

Efectos estimados de los factores sobre el lactosuero fermentado:

$$\text{Efecto factor A} = -1,04 \times 10^8$$

$$\text{Efecto factor B} = 9,33 \times 10^8$$

$$\text{Efecto interacción AB} = -1,11 \times 10^8$$

Se observa que el efecto del factor A (Temperatura) es menor que el efecto del factor B (Concentración de inóculo) y que el efecto de la interacción entre los 2 efectos. Sin embargo, para aceptar estos datos se debe determinar si estos valores son estadísticamente significativos mediante un análisis de varianza ANOVA.

**Tabla 23-4:** Análisis de Varianza para la Cantidad total de Bacterias Ácido Lácticas para la fermentación del lactosuero con *Streptococcus thermophilus*

Variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	F Calculado	F 0,05	Prob	Sign
Temperatura	3,224E+18	1	3,224E+18	1,50434914	5,32	0,255	ns
Concentración	2,6133E+18	1	2,6133E+18	1,21939365	5,32	0,302	Ns
Interacción	3,63E+18	1	3,63E+18	1,6937751	5,32	0,229	Ns
Subtotal	9,4674E+18	3					
Error	1,71E+19	8	2,1431E+18				
Total	2,66E+19	11					

Realizado por: Danya Brito, Jean Vásquez, 2019

De acuerdo al análisis de varianza de los datos, se observa que ningún factor reporta diferencias significativas ( $P > 0,05$ ) entre sus medias. Es decir, no existen diferencias significativas entre las variables, ni con la interacción de estas en los resultados finales.

Podemos afirmar que para la fermentación de lactosuero con *Streptococcus thermophilus*, tanto las variaciones de temperatura y de concentración de inóculo analizadas no afectan significativamente en los resultados finales, sin embargo, se debe considerar que el segundo tratamiento obtuvo mejores resultados en cuanto al conteo de bacterias ácido lácticas en las muestras finales. Además, se obtuvieron resultados sobresalientes en los 4 tratamientos, es decir en todos ellos se obtuvieron las cantidades de bacterias ácido lácticas requeridas para que una bebida pueda ser considerada como probiótica ( $>10^6$  UFC/g).

#### 4.1.5. Fermentación con *Lactobacillus casei*

El proceso de fermentación de lactosuero con *Lactobacillus casei* se llevó a cabo para cada uno de los 4 tratamientos establecidos, cada uno se realizó con 3 repeticiones.

##### 4.1.5.1. Tratamiento 1

El tratamiento 1 para la fermentación de lactosuero con *Lactobacillus casei* se realiza con los parámetros de la tabla 24-4.

**Tabla 24-4:** Parámetros de fermentación para el tratamiento 3 con *Lactobacillus casei*

Microorganismo: <i>Lactobacillus casei</i>	
Temperatura de fermentación	Concentración de inóculo
37°C	0,07g/L

Realizado por: Danya Brito, Jean Vásquez, 2019

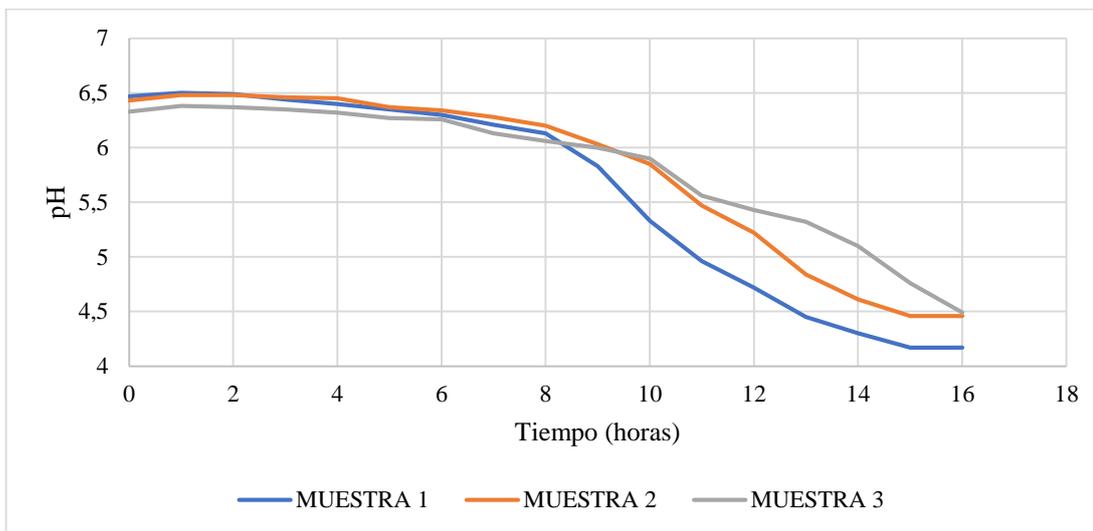
- Variación del pH del lactosuero con respecto al tiempo de fermentación

La fermentación del lactosuero con *Lactobacillus casei* mediante el tratamiento 1 se realizó obteniendo los siguientes datos:

**Tabla 25-4:** pH de lactosuero con el Tratamiento 1 con *Lactobacillus casei*

Tiempo (horas)	pH		
	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3
0	6,47	6,43	6,33
1	6,5	6,48	6,38
2	6,49	6,48	6,37
3	6,44	6,46	6,35
4	6,4	6,45	6,32
5	6,35	6,37	6,27
6	6,3	6,34	6,26
7	6,21	6,28	6,13
8	6,13	6,2	6,06
9	5,83	6,03	6
10	5,33	5,85	5,9
11	4,96	5,47	5,56
12	4,72	5,22	5,43
13	4,45	4,84	5,32
14	4,3	4,61	5,1
15	4,17	4,46	4,76
16	-	-	4,49

Realizado por: Danya Brito, Jean Vásquez, 2019



**Gráfico 7-4:** pH vs Tiempo de fermentación con *L. casei* (Tratamiento 1)

Realizado por: Danya Brito, Jean Vásquez, 2019

El tratamiento 1 para la fermentación del lactosuero con *Lactobacillus casei* se llevó a cabo obteniendo resultados para 3 repeticiones. El valor de pH deseado entre 4 y 4,5 se obtuvo entre

15 y 16 horas de fermentación. En este caso, los valores obtenidos de pH comienzan a descender rápidamente desde la octava hasta la quince y dieciseisava hora donde los valores de pH alcanzando el valor de pH deseado.

- *Recuento de microorganismos en el lactosuero fermentado*

Una vez concluido el proceso de fermentación del lactosuero con *Lactobacillus casei* mediante el tratamiento 1 se continúa con el recuento de colonias en la muestra mediante la técnica de sembrado en placa.

**Tabla 26-4:** Recuento en placa de colonias en agar MRS con el Tratamiento 1

Dilución	CANTIDAD DE COLONIAS POR PLACA					
	MUESTRA 1		MUESTRA 2		MUESTRA 3	
	Placa 1	Placa 2	Placa 1	Placa 2	Placa 1	Placa 2
10 <sup>-1</sup>	Incontable	Incontable	Incontable	Incontable	Incontable	Incontable
10 <sup>-2</sup>	Incontable	Incontable	Incontable	Incontable	Incontable	Incontable
10 <sup>-3</sup>	Incontable	Incontable	Incontable	Incontable	Incontable	Incontable
10 <sup>-4</sup>	Incontable	Incontable	Incontable	Incontable	Incontable	Incontable
10 <sup>-5</sup>	Incontable	Incontable	258	273	Incontable	Incontable
10 <sup>-6</sup>	285	212	53	32	273	206
10 <sup>-7</sup>	24	22	8	7	23	33

Realizado por: Danya Brito, Jean Vásquez, 2019

Se realizó el recuento de microorganismo de las tres muestras de lactosuero fermentado con el Tratamiento 1 para determinar la cantidad total de microorganismos presentes, en este caso, es de interés determinar la cantidad de bacterias lácticas presentes. Se utilizó agar MRS, el cual favorece el crecimiento de *Lactobacillus*. Cada muestra se sembró por duplicado para disminuir el margen de error. Se realizaron 7 diluciones, obteniendo resultados contables a partir de la quinta y sexta dilución.

**Tabla 27-4:** Cantidad total de microorganismos por muestra (Tratamiento 1)

	Cantidad total de microorganismos por muestra (UFC/g)
<b>MUESTRA 1</b>	2,5x10 <sup>8</sup>
<b>MUESTRA 2</b>	4,3x10 <sup>7</sup>
<b>MUESTRA 3</b>	2,4x10 <sup>8</sup>

Realizado por: Danya Brito, Jean Vásquez, 2019

El cálculo de la cantidad total de microorganismos por muestra se efectuó tomando el recuento en placa de colonias de las diluciones que contengan entre 15 y 300 colonias. Los valores de las 3 muestras cumplen con el requisito de la norma para bebidas lácteas probióticas que establece

que deben contener un número de bacterias lácticas superior a  $10^6$  UFC/g, por lo que el tratamiento 1 para la fermentación del lactosuero con *Lactobacillus casei* es viable para la obtención de una bebida probiótica.

#### 4.1.5.2. Tratamiento 2

El tratamiento 2 para la fermentación de lactosuero con *Lactobacillus casei* se realiza con los parámetros de la tabla 28-4.

**Tabla 28-4:** Parámetros de fermentación para el tratamiento 2 con *Lactobacillus casei*

<b>Microorganismo:</b> <i>Lactobacillus casei</i>	
<b>Temperatura de fermentación</b>	<b>Concentración del inóculo=</b>
37°C	0,09g/L

**Realizado por:** Danya Brito, Jean Vásquez, 2019

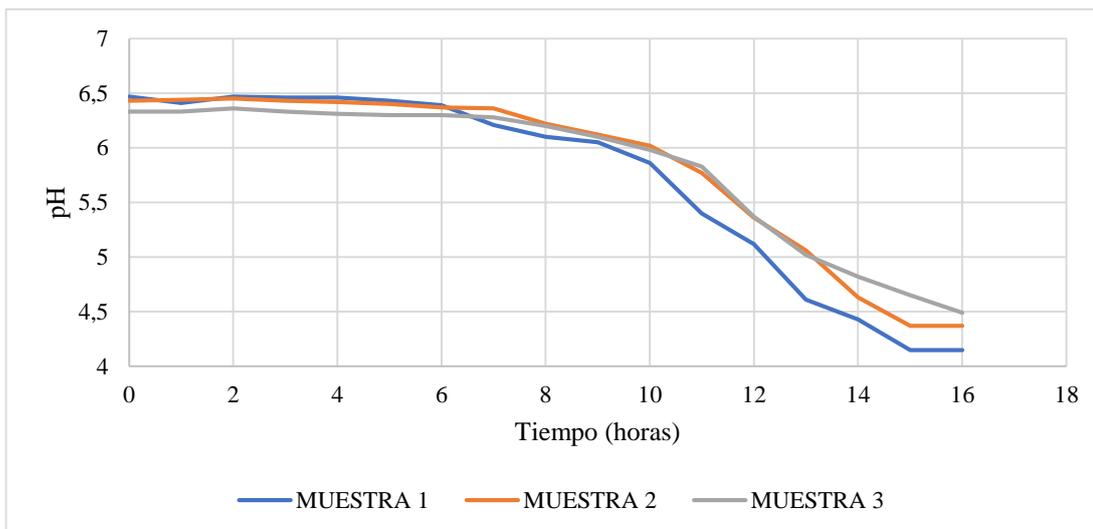
- *Variación del pH del lactosuero con respecto al tiempo de fermentación*

La fermentación del lactosuero con *Lactobacillus casei* mediante el tratamiento 2 se realizó obteniendo los siguientes datos:

**Tabla 29-4:** pH de lactosuero con el Tratamiento 2 con *Lactobacillus casei*

<b>Tiempo (horas)</b>	<b>pH</b>		
	<b>Muestra 1</b>	<b>Muestra 2</b>	<b>Muestra 3</b>
0	6,47	6,43	6,33
1	6,41	6,44	6,33
2	6,47	6,45	6,36
3	6,46	6,43	6,33
4	6,46	6,42	6,31
5	6,43	6,4	6,3
6	6,39	6,37	6,3
7	6,21	6,36	6,28
8	6,1	6,22	6,2
9	6,05	6,12	6,1
10	5,86	6,02	5,98
11	5,4	5,77	5,83
12	5,12	5,36	5,37
13	4,61	5,06	5,02
14	4,43	4,63	4,82
15	4,15	4,37	4,65
16	-	-	4,49

**Realizado por:** Danya Brito, Jean Vásquez, 2019



**Gráfico 8-4:** pH vs Tiempo de fermentación con *L. casei* (Tratamiento 2)  
**Realizado por:** Danya Brito, Jean Vásconez, 2019

Las tres muestras fueron sometidas a las mismas condiciones de fermentación previamente establecidas mediante el tratamiento 2 con *Lactobacillus casei*. Se observa que mediante la fermentación del lactosuero se alcanzaron los valores deseados de pH deseados entre 4 y 4,5 en 15 y 16 horas. Dentro del análisis se destaca que los valores obtenidos de pH comienzan a descender abruptamente desde la décima hasta la treceava hora donde los valores de pH comienzan a descender lentamente. La disminución de pH verifica la formación de ácido láctico a partir de la lactosa del lactosuero.

- *Recuento de microorganismos en el lactosuero fermentado*

Una vez concluido el proceso de fermentación del lactosuero con *Lactobacillus casei* mediante el tratamiento 2 se continúa con el recuento de colonias en la muestra mediante la técnica de sembrado en placa.

**Tabla 30-4:** Recuento en placa de colonias en agar MRS con el Tratamiento

Dilución	CANTIDAD DE COLONIAS POR PLACA					
	MUESTRA 1		MUESTRA 2		MUESTRA 3	
	Placa 1	Placa 2	Placa 1	Placa 2	Placa 1	Placa 2
10 <sup>-1</sup>	Incontable	Incontable	Incontable	Incontable	Incontable	Incontable
10 <sup>-2</sup>	Incontable	Incontable	Incontable	Incontable	Incontable	Incontable
10 <sup>-3</sup>	Incontable	Incontable	Incontable	Incontable	Incontable	Incontable
10 <sup>-4</sup>	Incontable	Incontable	Incontable	Incontable	Incontable	Incontable
10 <sup>-5</sup>	Incontable	Incontable	134	350	193	227
10 <sup>-6</sup>	201	207	43	61	78	60
10 <sup>-7</sup>	21	14	8	0	58	28

**Realizado por:** Danya Brito, Jean Vásconez, 2019

Se sembraron las 3 muestras en agar MRS, para establecer la cantidad de bacterias lácticas en cada muestra fermentada con *Lactobacillus casei* mediante el segundo tratamiento. Cada una de las muestras se sembró en 2 placas y se efectuaron 7 diluciones. Se obtuvieron valores contables de colonias a partir de la quinta y sexta dilución. Se toman los valores, para la muestra 1, de la sexta dilución y de la muestra 2 y 3, los valores de la quinta y sexta dilución, para calcular la cantidad total de bacterias lácticas en cada muestra debido a que estos valores se encuentran entre 15 y 300 colonias.

**Tabla 31-4:** Cantidad total de microorganismos por muestra (Tratamiento 2)

	<b>Cantidad total de microorganismos por muestra UFC/g</b>
<b>MUESTRA 1</b>	2x10 <sup>8</sup>
<b>MUESTRA 2</b>	5,2x10 <sup>7</sup>
<b>MUESTRA 3</b>	6,9x10 <sup>7</sup>

**Realizado por:** Danya Brito, Jean Vásquez, 2019

Se determinó la cantidad total de microorganismos de las 3 muestras fermentadas de lactosuero con *Lactobacillus casei* con los parámetros del tratamiento 2 y se obtuvieron valores superiores al valor mínimo establecido por la norma para bebidas lácteas probióticas 10<sup>6</sup> UFC/g, esto indica que el tratamiento 2 es factible como proceso para obtener una bebida probiótica.

#### 4.1.5.3. Tratamiento 3

El tratamiento 3 para la fermentación de lactosuero con *Lactobacillus casei* se realiza con los parámetros de la tabla 32-4.

**Tabla 32-4:** Parámetros de fermentación para el tratamiento 3 con *Lactobacillus casei*

<b>Microorganismo:</b> <i>Lactobacillus casei</i>	
<b>Temperatura de fermentación</b>	<b>Concentración del inóculo</b>
39°C	0,07g/L

**Realizado por:** Danya Brito, Jean Vásquez, 2019

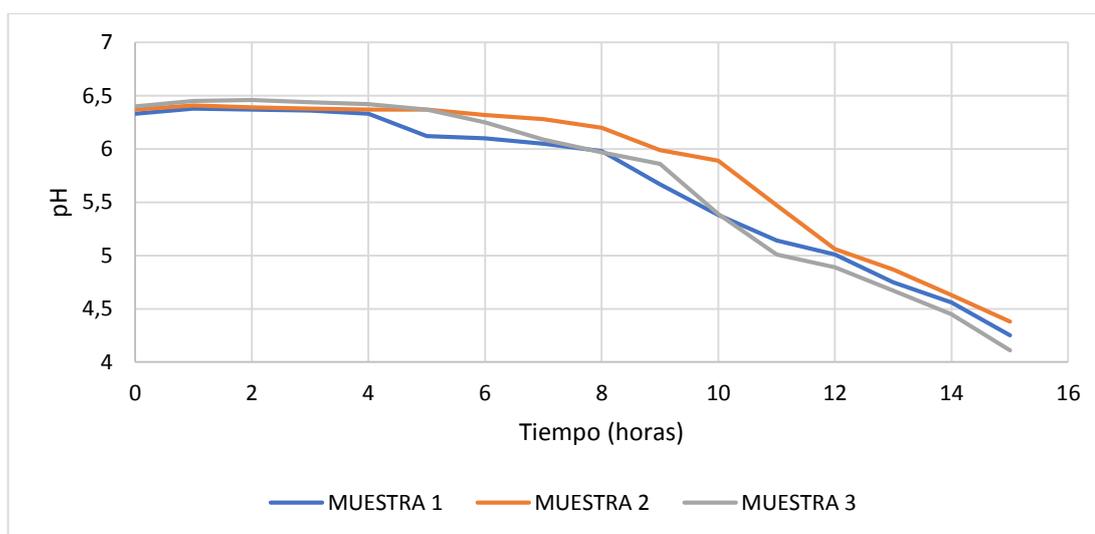
- *Variación del pH del lactosuero con respecto al tiempo de fermentación*

La fermentación del lactosuero con *Lactobacillus casei* mediante el tratamiento 3 se realizó obteniendo los siguientes datos:

**Tabla 33-4:** pH de lactosuero con el Tratamiento 3 con *Lactobacillus casei*

Tiempo (horas)	pH		
	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3
0	6,33	6,37	6,4
1	6,38	6,41	6,45
2	6,37	6,39	6,46
3	6,36	6,38	6,44
4	6,33	6,37	6,42
5	6,12	6,37	6,37
6	6,1	6,32	6,25
7	6,05	6,28	6,09
8	5,98	6,2	5,97
9	5,67	5,99	5,86
10	5,38	5,89	5,39
11	5,14	5,47	5,01
12	5,01	5,06	4,89
13	4,75	4,87	4,67
14	4,56	4,63	4,45
15	4,25	4,38	4,11

Realizado por: Danya Brito, Jean Vásquez, 2019



**Gráfico 9-4:** pH vs Tiempo de fermentación con *L. casei* (Tratamiento 3)

Realizado por: Danya Brito, Jean Vásquez, 2019

La fermentación del lactosuero con los parámetros establecidos para el tratamiento 2 con *Lactobacillus casei* también se realizó con 3 repeticiones. En este caso, el lactosuero fermentado alcanzó el valor de pH deseado entre 4 y 4,5 en 15 horas. Los valores obtenidos de pH disminuyen abruptamente desde la novena hasta la quinceava hora donde los pH alcanzaron el valor deseado.

- *Recuento de microorganismos en el lactosuero fermentado*

Una vez concluido el proceso de fermentación del lactosuero con *Lactobacillus casei* mediante el tratamiento 3 se continúa con el recuento de colonias en la muestra mediante la técnica de sembrado en placa.

**Tabla 34-4:** Recuento en placa de colonias en agar MRS con el Tratamiento 3

Dilución	CANTIDAD DE COLONIAS POR PLACA					
	MUESTRA 1		MUESTRA 2		MUESTRA 3	
	Placa 1	Placa 2	Placa 1	Placa 2	Placa 1	Placa 2
10 <sup>-1</sup>	Incontable	Incontable	Incontable	Incontable	Incontable	Incontable
10 <sup>-2</sup>	Incontable	Incontable	Incontable	Incontable	Incontable	Incontable
10 <sup>-3</sup>	Incontable	Incontable	Incontable	Incontable	Incontable	Incontable
10 <sup>-4</sup>	Incontable	Incontable	Incontable	Incontable	Incontable	Incontable
10 <sup>-5</sup>	Incontable	Incontable	283	249	Incontable	Incontable
10 <sup>-6</sup>	155	143	37	31	117	109
10 <sup>-7</sup>	23	24	2	3	66	67

Realizado por: Danya Brito, Jean Vásquez, 2019

Se sembraron las 3 muestras en agar MRS, para establecer la cantidad de bacterias lácticas en cada muestra fermentada con *Lactobacillus casei* mediante el tercer tratamiento. Cada una de las muestras se sembró en 2 placas y se efectuaron 7 diluciones. Se obtuvieron valores contables a partir de las quinta y sexta dilución. Para los cálculos del total de microorganismos en una muestra se tomaron en consideración, para la muestra 1 y 3, los valores de la sexta dilución y para la muestra 2, los valores de la quinta y sexta dilución debido a que estos valores se encuentran entre 15 y 300 colonias.

**Tabla 35-4:** Cantidad total de microorganismos por muestra (Tratamiento 3)

	Cantidad total de microorganismos por muestra (UFC/g)
MUESTRA 1	1,5x10 <sup>8</sup>
MUESTRA 2	3,4x10 <sup>7</sup>
MUESTRA 3	1,1x10 <sup>8</sup>

Realizado por: Danya Brito, Jean Vásquez, 2019

Calculando la cantidad total de bacterias lácticas por muestra, tomando el recuento en placa de colonias de las diluciones que contengan entre 15 y 300 colonias, se obtuvieron valores altos para las 3 muestras fermentadas con el tratamiento 3 con *Lactobacillus casei*. Los valores de las 3 muestras cumplen con el requisito de la norma para bebidas lácteas probióticas que establece que deben contener un número de bacterias lácticas superior a 10<sup>6</sup> UFC/g, por lo que el tratamiento 3 es viable para la obtención de una bebida probiótica.

#### 4.1.5.4. Tratamiento 4

El tratamiento 4 para la fermentación de lactosuero con *Lactobacillus casei* se realiza con los parámetros de la tabla 32-4.

**Tabla 36-4:** Parámetros de fermentación para el tratamiento 4 con *Lactobacillus casei*

Microorganismo: <i>Lactobacillus casei</i>	
Temperatura de fermentación	Concentración de inóculo
39°C	0,09g/L

Realizado por: Danya Brito, Jean Vásquez, 2019

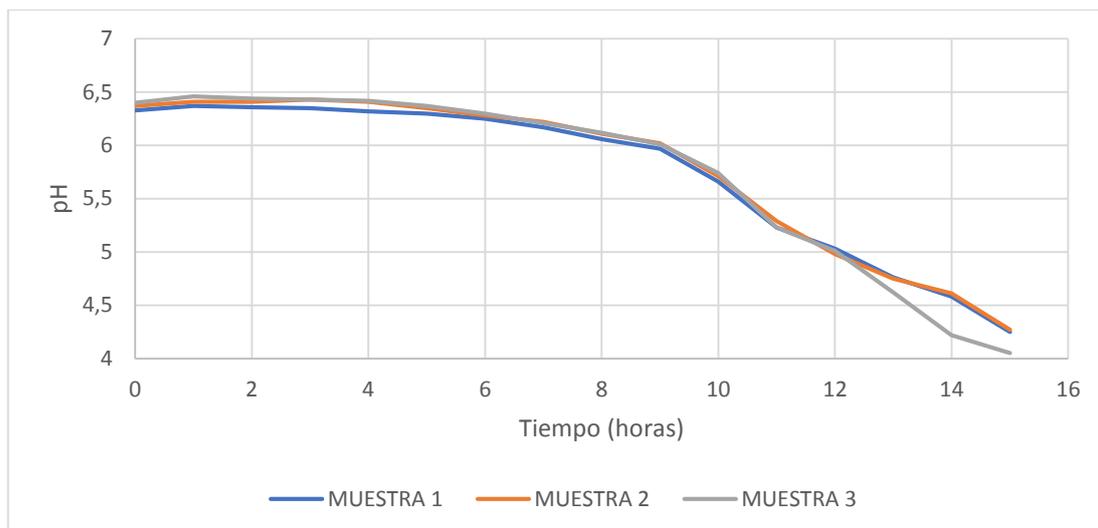
- Variación del pH del lactosuero con respecto al tiempo de fermentación

La fermentación del lactosuero con *Lactobacillus casei* mediante el tratamiento 4 se realizó obteniendo los siguientes datos:

**Tabla 37-4:** pH de lactosuero con el Tratamiento 4 con *Lactobacillus casei*

Tiempo (horas)	pH		
	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3
0	6,33	6,37	6,4
1	6,37	6,41	6,46
2	6,36	6,41	6,44
3	6,35	6,43	6,43
4	6,32	6,41	6,42
5	6,3	6,35	6,37
6	6,25	6,28	6,3
7	6,17	6,22	6,21
8	6,06	6,11	6,12
9	5,97	6,02	6,01
10	5,66	5,71	5,74
11	5,23	5,29	5,23
12	5,03	4,98	5,01
13	4,76	4,75	4,62
14	4,58	4,61	4,22
15	4,25	4,27	4,05

Realizado por: Danya Brito, Jean Vásquez, 2019



**Gráfico 10-4:** pH vs Tiempo de fermentación con *L. casei* (Tratamiento 4)

Realizado por: Danya Brito, Jean Vásquez, 2019

Las 3 repeticiones realizadas para la fermentación del lactosuero con *Lactobacillus casei* con el tratamiento 4 alcanzaron el valor de pH requerido entre 4 y 4,5 en 15 horas de proceso fermentativo. Para este proceso, los valores de pH de acuerdo a la curva descienden lentamente hasta la novena hora a partir de la cual el pH desciende rápidamente hasta la quinceava hora, hasta alcanzar el valor requerido.

- *Recuento de microorganismos en el lactosuero fermentado*

Una vez concluido el proceso de fermentación del lactosuero con *Lactobacillus casei* mediante el tratamiento 4 se continúa con el recuento de colonias en la muestra mediante la técnica de sembrado en placa.

**Tabla 38-4:** Recuento en placa de colonias en agar MRS con el Tratamiento 4

Dilución	CANTIDAD DE COLONIAS POR PLACA					
	MUESTRA 1		MUESTRA 2		MUESTRA 3	
	Placa 1	Placa 2	Placa 1	Placa 2	Placa 1	Placa 2
10 <sup>-1</sup>	Incontable	Incontable	Incontable	Incontable	Incontable	Incontable
10 <sup>-2</sup>	Incontable	Incontable	Incontable	Incontable	Incontable	Incontable
10 <sup>-3</sup>	Incontable	Incontable	Incontable	Incontable	Incontable	Incontable
10 <sup>-4</sup>	Incontable	Incontable	Incontable	Incontable	Incontable	Incontable
10 <sup>-5</sup>	Incontable	Incontable	63	77	Incontable	Incontable
10 <sup>-6</sup>	75	84	12	8	91	116
10 <sup>-7</sup>	6	14	3	0	16	21

Realizado por: Danya Brito, Jean Vásquez, 2019

Las 3 muestras fueron sembradas en agar MRS para establecer la cantidad de bacterias lácticas en cada muestra fermentada con *Lactobacillus casei* mediante el cuarto tratamiento. Cada una de las muestras se sembró en por duplicado y se efectuaron 7 diluciones. Se obtuvieron valores contables a partir de la quinta y sexta dilución. Los cálculos del total de microorganismos en una muestra se realizaron tomando en consideración, para la muestra 1 y 3, los valores de la sexta dilución, y para la muestra 2, la quinta dilución debido a que estos valores se encuentran entre 15 y 300 colonias.

**Tabla 39-4:** Cantidad total de microorganismos por muestra (Tratamiento 4)

	Cantidad total de microorganismos por muestra (UFC/g)
<b>MUESTRA 1</b>	8,0x10 <sup>7</sup>
<b>MUESTRA 2</b>	7,0x10 <sup>6</sup>
<b>MUESTRA 3</b>	1,0x10 <sup>8</sup>

Realizado por: Danya Brito, Jean Vásquez, 2019

Se determinó la cantidad total de bacterias lácticas de las 3 muestras fermentadas con los parámetros del tratamiento 4 con *Lactobacillus casei* y se obtuvieron valores superiores al valor mínimo establecido por la norma para bebidas lácteas probióticas 10<sup>6</sup> UFC/g, esto indica que el tratamiento 4 es factible como proceso para obtener una bebida probiótica.

#### 4.1.5.5. Análisis del diseño experimental y Análisis de varianza entre los 4 tratamientos con *Lactobacillus casei*.

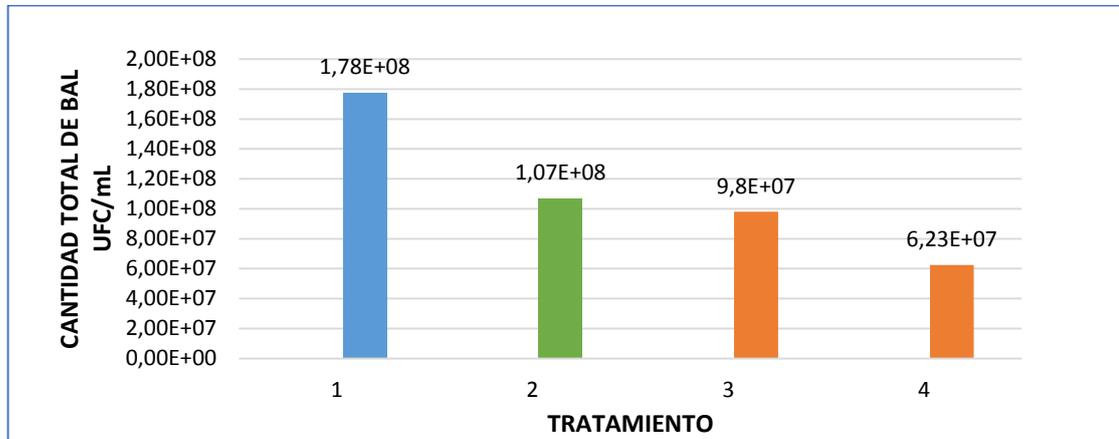
A partir de los datos obtenidos, se llevó a cabo el análisis del diseño experimental con el objetivo de determinar el tratamiento que reporta los mejores resultados para la fermentación del lactosuero con *Lactobacillus casei*.

**Tabla 40-4:** Diseño factorial 2<sup>2</sup> para la fermentación del lactosuero con *Lactobacillus casei*

Tratamiento	FACTOR A Temperatura °C	FACTOR B Concentración de inóculo g/L	Cantidad total de bacterias ácido lácticas por tratamiento (3 muestras) UFC/g	Promedio UFC/g	Notación Yates
1	37	0,07	2,5x10 <sup>8</sup>	1,78x10 <sup>8</sup>	(1)
			4,3x10 <sup>7</sup>		
			2,4x10 <sup>8</sup>		
2	37	0,09	2x10 <sup>8</sup>	1,07x10 <sup>8</sup>	A
			5,2x10 <sup>7</sup>		
			6,9x10 <sup>7</sup>		
3	39	0,07	1,5x10 <sup>8</sup>	9,8x10 <sup>7</sup>	B
			3,4x10 <sup>7</sup>		
			1,1x10 <sup>8</sup>		
4	39	0,09	8,0x10 <sup>7</sup>	6,23x10 <sup>7</sup>	Ab
			7,0x10 <sup>6</sup>		
			1,0x10 <sup>8</sup>		

Realizado por: Danya Brito, Jean Vásquez, 2019

Se compararon los resultados obtenidos en los 4 tratamientos analizados para la fermentación del lactosuero con *Lactobacillus casei* para observar la diferencia en los resultados obtenidos con cada uno de ellos.



**Gráfico 11-4:** Cantidad promedio de bacterias ácido lácticas por tratamiento para el lactosuero fermentado con *Lactobacillus casei*  
**Realizado por:** Danya Brito, Jean Vásconez, 2019

Para la fermentación del lactosuero con *Lactobacillus casei* se observó que con el primer tratamiento se obtiene la mayor cantidad de bacterias ácido lácticas.

Efectos estimados de los factores sobre el lactosuero fermentado con *Lactobacillus casei*.

$$\text{Efecto factor A} = -6,24 \times 10^7$$

$$\text{Efecto factor B} = -5,33 \times 10^7$$

$$\text{Efecto interacción AB} = 1,76 \times 10^7$$

Se observa que el efecto de la interacción de los dos factores (temperatura y concentración del inóculo) es mayor que el efecto de los factores A y B. Sin embargo, para aceptar estos datos se debe determinar si estos valores son estadísticamente significativos mediante un análisis de varianza ANOVA.

**Tabla 41-4:** Análisis de Varianza para la Cantidad total de Bacterias Ácido Lácticas del lactosuero fermentado con *Lactobacillus casei*

Variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	F Calculado	F 0,05	Prob	Sign
Temperatura	1,15941E+16	1	1,15941E+16	1,78003096	5,32	0,219	ns
Concentración	8,48008E+15	1	8,48008E+15	1,30194087	5,32	0,287	ns
Interacción	9,1875E+14	1	9,1875E+14	0,141055	5,32	0,717	ns
Subtotal	2,09929E+16	3					
Error	5,21E+16	8	6,51342E+15				
Total	7,31E+16	11					

Realizado por: Danya Brito, Jean Vásquez, 2019

Analizando los datos con un ANOVA, se observó que no existen diferencias significativas entre los efectos que tienen los factores y su interacción, en la cantidad de bacterias ácido lácticas existentes en las muestras finales.

De acuerdo al análisis estadístico se afirma que las variaciones de temperatura y concentración estudiadas para la fermentación del lactosuero con *Lactobacillus casei*, no presentan diferencias significativas en los resultados finales en el conteo la cantidad total de bacterias ácido lácticas de las muestras fermentadas, sin embargo, se consideró el tratamiento 1 como el proceso más eficiente para la obtención de una bebida probiótica. Además, se observó que con los 4 tratamientos analizados se obtienen las cantidades requeridas de bacterias lácticas para que se pueda considerar una bebida como probiótica ( $>10^6$  UFC/g).

#### 4.1.6. Comparación de formulaciones

Una vez obtenidos los resultados de la fermentación del lactosuero con *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus casei*, se compararon los datos obtenidos para determinar el tratamiento óptimo de fermentación.

**Tabla 42-4:** Resultados de la fermentación del lactosuero con *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus casei*

Fermentación de lactosuero con <i>Streptococcus thermophilus</i>			Fermentación de lactosuero con <i>Lactobacillus casei</i>		
Tratamiento	Tiempo de fermentación	Cantidad de BAL UFC/g	Tratamiento	Tiempo de fermentación	Cantidad de BAL UFC/g
1	6 horas	$7,77 \times 10^8$	1	16 horas	$1,78 \times 10^8$
2	5 horas	$2,81 \times 10^9$	2	16 horas	$1,07 \times 10^8$
3	6 horas	$8,4 \times 10^8$	3	15 horas	$9,8 \times 10^7$
4	7 horas	$6,73 \times 10^8$	4	15 horas	$6,23 \times 10^7$

Realizado por: Danya Brito, Jean Vásquez, 2019

Comparando los resultados de la fermentación del lactosuero con *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus casei*, se observó que con todos los tratamientos se obtiene la cantidad que se requiere de bacterias ácido lácticas para considerar la bebida como probiótica (cantidad de bacterias ácido lácticas > 10<sup>6</sup> UFC/g), por lo que se podría utilizar cualquiera de los tratamientos analizados, sin embargo, se observó que la fermentación del lactosuero con *Streptococcus thermophilus* da como resultado una cantidad considerablemente mayor de bacterias en las muestras fermentadas.

Observando estos resultados se puede afirmar que el tratamiento óptimo para la obtención de una bebida probiótica es a partir de la fermentación del lactosuero con *Streptococcus thermophilus*, mediante el segundo tratamiento analizado, es decir, a una temperatura de fermentación de 42°C y con una concentración de inóculo de 0,09 g/L.

#### 4.1.7. Formulación de la bebida probiótica

La bebida probiótica se prepara a partir de los parámetros óptimos establecidos para la fermentación del lactosuero con la adición de los componentes necesarios para que la bebida sea sensorialmente aceptable para los consumidores. Los aditivos utilizados son los que se encuentran permitidos y en las cantidades que se especifican en la norma NTE INEN 2074.

Se enlistan las diferentes materias primas, aditivos e insumos que se requieren para la elaboración de la bebida probiótica con sus respectivas cantidades, los valores son asignados para una cantidad de materia prima de lactosuero de 160 litros, para obtener los valores para otras cantidades de materia prima se deberá realizar la proporcionalidad respectiva.

**Tabla 43-4:** Materia prima, aditivos e insumos requeridos para la obtención de una bebida probiótica

Aspecto	Componente	Cantidad
Materia prima	Lactosuero	160 L
Aditivos	Azúcar	12,80 kg
	Cultivo de bacteria ácido láctico ( <i>Streptococcus thermophilus</i> )	11,20 g
	Sorbato de potasio	8,64 g
	Gelatina	0,48 g
	Colorante artificial	64 mL
	Saborizante artificial	10 mL
Materiales	Envases de plástico	160
	Etiquetas	160

**Realizado por:** Danya Brito, Jean Vásquez, 2019

**Fuente:** (Londoño et al. 2008)

#### 4.1.8. Caracterización de la bebida probiótica

##### 4.1.8.1. Caracterización física de la bebida probiótica

Mediante la observación y análisis directo de la bebida probiótica se determinaron las características físicas con respecto a los parámetros de olor, color, sabor y aspecto.

**Tabla 44-4:** Resultados de la caracterización física de la bebida probiótica

Parámetro	Descripción
Color	Agradable
Sabor	Dulce
Olor	Característico: fruta
Aspecto	Normal, libre de material extraño

Realizado por: Danya Brito, Jean Vásquez, 2019

En el análisis físico realizado se pudo observar que la bebida probiótica formulada tiene parámetros físicos agradables a los sentidos, con el color, sabor y olor característicos de una bebida de mora. Además, su aspecto es normal y está libre de material extraño.

##### 4.1.8.2. Caracterización bromatológica de la bebida probiótica

Se analizaron los parámetros bromatológicos de la bebida probiótica para compararlos con los requisitos establecidos en la norma NTE INEN 2609:2012 para bebidas de suero.

**Tabla 45-4:** Resultados de la caracterización bromatológica de la bebida probiótica

Parámetro	Unidad	Método de análisis	Valor	Requisitos de la norma para bebidas de suero NTE INEN 2609:2012	
				Min.	Max.
Azúcares totales	%	INEN 398	0,70	-	-
Proteína	%	INEN 016	3,89	0,4	-
Grasa	%	INEN 012	0,40	-	-
Acidez titulable	%	INEN 013	0,32	-	-
pH		-	4,42	-	-
Ceniza	%	INEN 544	0,45	-	-

Realizado por: Danya Brito, Jean Vásquez, 2019

Mediante la caracterización bromatológica la bebida probiótica se determinó que esta cumple con los requisitos de la norma NTE INEN 2609:2012 para bebidas de suero. Además, se observa que hubo cambios entre la muestra de suero sin fermentar y la bebida fermentada, la cantidad de azúcares totales disminuyó y la cantidad de proteína y grasa incrementó con el proceso de fermentación. Finalmente, la acidez titulable incrementó, mientras que el pH disminuyó.

#### 4.1.8.3. Caracterización microbiológica del lactosuero

Se analizó la bebida probiótica obtenida de acuerdo a los parámetros microbiológicos establecidos en la norma NTE INEN 2609:2012.

**Tabla 46-4:** Resultados de la caracterización microbiológica del lactosuero

Parámetro	Unidad	Método	Resultado	Requisitos de la norma para bebidas de suero NTE INEN 2609:2012	
				Mínimo	Máximo
Recuento de microorganismos aerobios mesófilos	UFC/mL	Siembra en masa	30000	30000	100000
Recuento de <i>Escherichia coli</i>	UFC/mL	Siembra en masa	Ausencia	<10	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	UFC/mL	Siembra en masa	20	-	100
<i>Salmonella</i>	UFC/25mL	Reveal 2.0	Negativo	Ausencia	
Detección de <i>Listeria monocytogenes</i>	UFC/mL	Siembra en masa	Negativo	Ausencia	
Recuento de bacterias ácido lácticas	UFC/mL	Siembra en masa	5,2x10 <sup>8</sup>	10 <sup>6</sup> (Probióticos)	

Realizado por: Danya Brito, Jean Vásconez, 2019

Se observa que, en cuanto a la caracterización microbiológica, todos los parámetros analizados se encuentran cumpliendo los requisitos de la norma NTE INEN 2609:2012 para bebidas de suero, lo que implica que el proceso se llevó a cabo en las condiciones adecuadas de esterilidad y que el proceso de pasteurización fue adecuado. Además, se determinó que la bebida cumple con el requisito para bebidas probióticas con una cantidad de bacterias ácido lácticas superior a 10<sup>6</sup> UFC/g.

#### 4.1.9. Análisis sensorial de la bebida probiótica

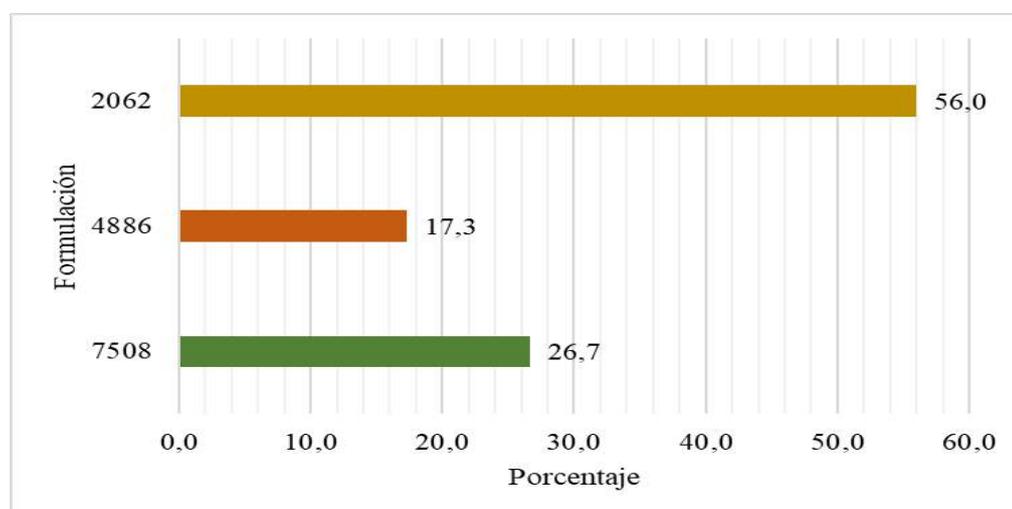
Las encuestas se aplicaron a 150 personas los días 14 y 28 de marzo del 2019 de 14H00 a 18H00, en la Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo debido a que los estudiantes son posibles consumidores del producto.

**Tabla 47-4:** Frecuencia y porcentaje de preferencia de las formulaciones de la bebida probiótica encuestados.

Códigos	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje acumulado
7508	40	26,7	26,7
4886	26	17,3	44,0
2062	84	56,0	100,0
<b>TOTAL</b>	150	100	

Realizado por: Danya Brito, Jean Vásquez, 2019

Se analizaron los porcentajes de acuerdo a los resultados de preferencia de las personas encuestadas entre las formulaciones analizadas para la bebida probiótica.



**Gráfico 12-4:** Porcentajes de preferencia de acuerdo a la preferencia de las personas encuestadas  
Realizado por: Danya Brito, Jean Vásquez, 2019

Se obtuvieron valores de porcentajes de preferencia del 56% para la formulación 2062, 26,7% para la formulación 7508 y de un 17,3% para la formulación 4886. Se obtuvo una mayor preferencia por la formulación 2062, sin embargo, se evaluó también los atributos sensoriales de color, consistencia, sabor y olor, para obtener mejores resultados sobre las preferencias de los consumidores.

#### 4.1.9.1. Color

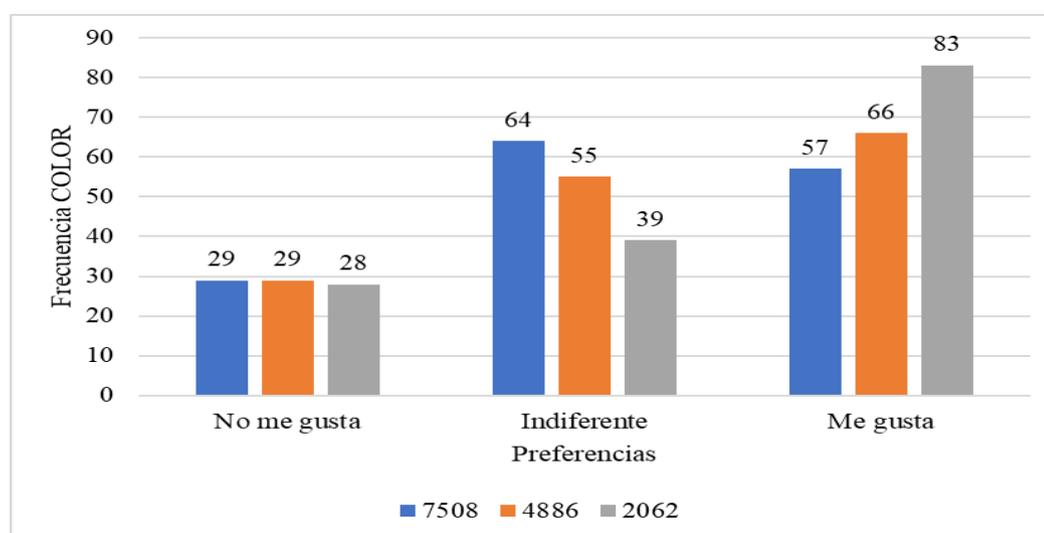
El análisis de preferencia de los posibles consumidores de la bebida probiótica con respecto al atributo color permite distinguir entre los gustos de las personas hacia las formulaciones propuestas y determinar si la bebida probiótica es aceptada con respecto a este parámetro.

**Tabla 48-4:** Preferencia de los consumidores con respecto al atributo color para las formulaciones propuestas

Código	No me gusta (1)	Indiferente (2)	Me gusta (3)	Total
7508	29	64	57	150
4886	29	55	66	150
2062	28	39	83	150

Realizado por: Danya Brito, Jean Vásquez, 2019

A partir de los datos recogidos sobre la aceptación de las personas encuestadas sobre el atributo color de la bebida probiótica se pueden comparar los resultados para elegir la formulación que tuvo mayor aceptación entre los posibles consumidores.



**Gráfico 13-4:** Preferencia de los consumidores con respecto al atributo color para las formulaciones propuestas

Realizado por: Danya Brito, Jean Vásquez, 2019

Mediante análisis estadísticos se determinaron diferencias entre los datos escogidos por los consumidores.

**Tabla 49-4:** Estadísticos descriptivos para el análisis del atributo color

Atributo	Formulación	N	Media	Desviación estándar	Mediana
Color	7598	150	2,19	0,74	2
Color	4886	150	2,25	0,76	2
Color	2062	150	2,37	0,78	3

Realizado por: Danya Brito, Jean Vásquez, 2019

De acuerdo a la evaluación del atributo color, se observó que la formulación 2062 obtiene valores mayores de medias de acuerdo a la preferencia seguido por la formulación 4886 y la formulación 7508. Mediante la prueba de Kruskal-Wallis se determinó que el atributo color no es

estadísticamente significativo en los resultados ( $\text{Sign} > 0,05$ ), es decir la preferencia de las personas no depende del color de la bebida.

**Tabla 50-4:** Prueba de Kruskal-Wallis para el análisis sensorial del atributo color

	Valor
<b>H de Kruskal-Wallis</b>	5,63
<b>Grados de libertad</b>	2
<b>Significancia</b>	0,06

Realizado por: Danya Brito, Jean Vásquez, 2019

#### 4.1.9.2. Consistencia

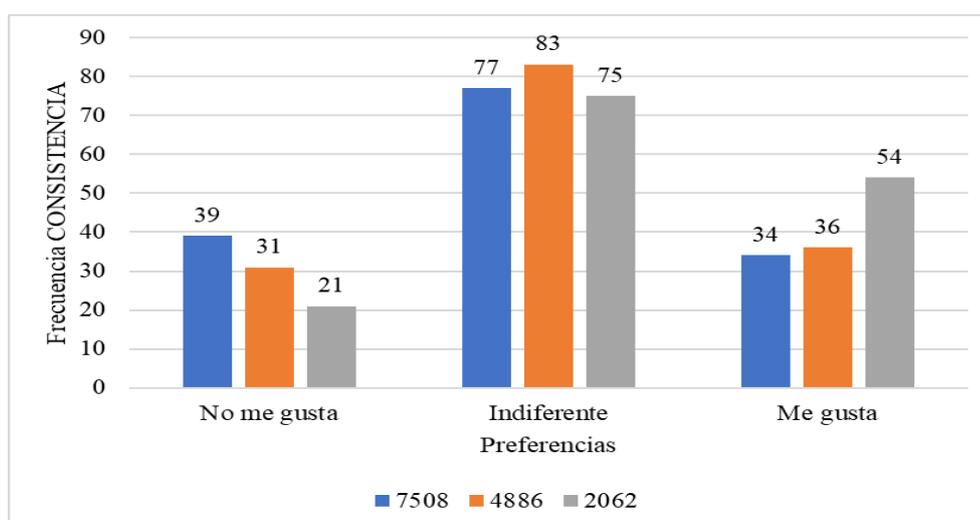
El análisis de preferencia de los posibles consumidores de la bebida probiótica con respecto al atributo consistencia permite distinguir entre los gustos de las personas hacia las formulaciones propuestas y determinar si la bebida probiótica es aceptada con respecto a este parámetro.

**Tabla 51-4:** Preferencia de los consumidores con respecto al atributo consistencia para las formulaciones propuestas

Código	No me gusta	Indiferente	Me gusta	Total
7508	39	77	34	150
4886	31	83	36	150
2062	21	75	54	150

Realizado por: Danya Brito, Jean Vásquez, 2019

A partir de los datos recogidos sobre la aceptación de las personas encuestadas sobre la consistencia de la bebida probiótica se pueden comparar los resultados para elegir la formulación que tuvo mayor aceptación entre los posibles consumidores.



**Gráfico 14-4:** Preferencia de los consumidores con respecto al atributo consistencia para las formulaciones propuestas

Realizado por: Danya Brito, Jean Vásquez, 2019

Mediante análisis estadísticos se determinaron diferencias entre los datos escogidos por los consumidores.

**Tabla 52-4:** Estadísticos descriptivos para el análisis del atributo consistencia

Atributo	Formulación	N	Media	Desviación estándar	Mediana
Consistencia	7598	150	1,97	0,70	2
Consistencia	4886	150	2,03	0,67	2
Consistencia	2062	150	2,22	0,67	2

Realizado por: Danya Brito, Jean Vásquez, 2019

Para el atributo consistencia se observa que la formulación 2062 obtuvo el valor mayor entre las medias de las formulaciones seguido de la formulación 4886 y de la formulación 7508. A través de una prueba de Kruskal-Wallis se observa que para el atributo consistencia se reportaron diferencias significativas entre las medias ( $Sign < 0,05$ ), es decir, el atributo de consistencia sí influye en la preferencia de la bebida.

**Tabla 53-4:** Prueba de Kruskal-Wallis para el análisis sensorial del atributo color

	Valor
H de Kruskal-Wallis	10,94
Grados de libertad	2
Significancia	0,004

Realizado por: Danya Brito, Jean Vásquez, 2019

#### 4.1.9.3. Sabor

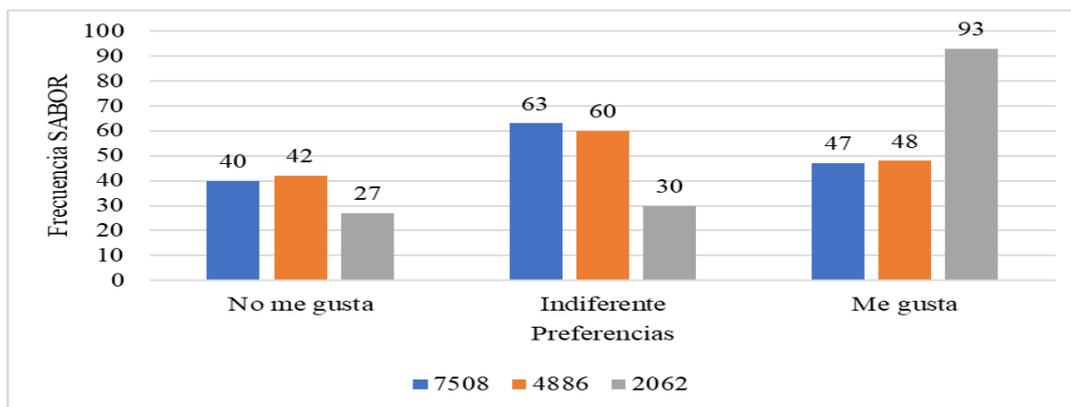
El análisis de preferencia de los posibles consumidores de la bebida probiótica con respecto al sabor permite distinguir entre los gustos de las personas hacia las formulaciones propuestas y determinar si la bebida probiótica es aceptada con respecto a este parámetro.

**Tabla 54-4:** Preferencia de los consumidores con respecto al sabor para las formulaciones

Código	No me gusta (1)	Indiferente (2)	Me gusta (3)	Total
7508	40	63	47	150
4886	42	60	48	150
2062	27	30	93	150

Realizado por: Danya Brito, Jean Vásquez, 2019

A partir de los datos recogidos sobre la aceptación de las personas encuestadas sobre el atributo sabor de la bebida probiótica se pueden comparar los resultados para elegir la formulación que tuvo mayor aceptación entre los posibles consumidores.



**Gráfico 15-4:** Preferencia de los consumidores con respecto al atributo color para las formulaciones propuestas

Realizado por: Danya Brito, Jean Vásconez, 2019

Mediante análisis estadísticos se determinaron diferencias entre los datos escogidos por los consumidores.

**Tabla 55-4:** Estadísticos descriptivos para el análisis del atributo color

Atributo	Formulación	N	Media	Desviación estándar	Mediana
Sabor	7508	150	2,05	0,76	2
Sabor	4886	150	2,04	0,78	2
Sabor	2062	150	2,44	0,78	3

Realizado por: Danya Brito, Jean Vásconez, 2019

De acuerdo a la evaluación del atributo sabor, se observó que la formulación 2062 obtiene valores mayores de medias de acuerdo a la preferencia seguido por la formulación 7508 y la formulación 4886. Mediante la prueba de Kruskal-Wallis se determinó que el atributo sabor es altamente estadísticamente significativo en los resultados ( $Sign < 0,01$ ), es decir la preferencia de las personas depende altamente del sabor de la bebida.

**Tabla 56-4:** Prueba de Kruskal-Wallis para el análisis sensorial del atributo color

	Valor
<b>H de Kruskal-Wallis</b>	27,68
<b>Grados de libertad</b>	2
<b>Significancia</b>	0,000

Realizado por: Danya Brito, Jean Vásconez, 2019

#### 4.1.9.4. Olor

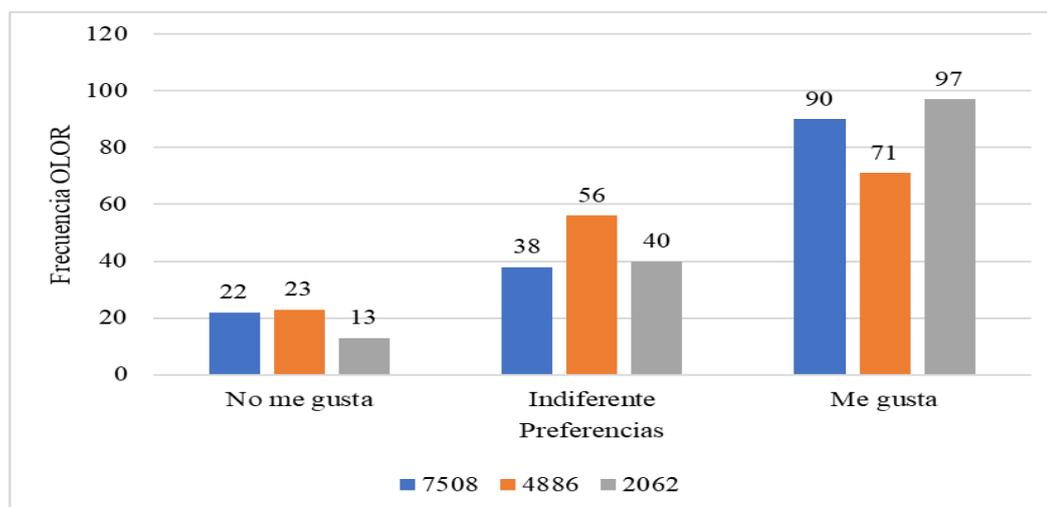
El análisis de preferencia de los posibles consumidores de la bebida probiótica con respecto al olor permite distinguir entre los gustos de las personas hacia las formulaciones propuestas y determinar si la bebida probiótica es aceptada con respecto a este parámetro.

**Tabla 57-4:** Preferencia de los consumidores con respecto al olor para las formulaciones

Código	No me gusta	Indiferente	Me gusta	Total
7508	22	38	90	150
4886	23	56	71	150
2062	13	40	97	150

Realizado por: Danya Brito, Jean Vásconez, 2019

A partir de los datos recogidos sobre la aceptación de las personas encuestadas sobre el atributo olor de la bebida probiótica se pueden comparar los resultados para elegir la formulación que tuvo mayor aceptación entre los posibles consumidores.



**Gráfico 16-4:** Preferencia de los consumidores con respecto al atributo color para las formulaciones propuestas

Realizado por: Danya Brito, Jean Vásconez, 2019

Mediante análisis estadísticos se determinaron diferencias entre los datos escogidos por los consumidores.

**Tabla 58-4:** Estadísticos descriptivos para el análisis del atributo olor

Atributo	Formulación	N	Media	Desviación estándar	Mediana
Olor	7508	150	2,45	0,74	3
Olor	4886	150	2,30	0,75	2
Olor	2062	150	2,56	0,65	3

Realizado por: Danya Brito, Jean Vásconez, 2019

De acuerdo a la evaluación del atributo olor, se observó que la formulación 2062 obtiene valores mayores de medias de acuerdo a la preferencia seguido por la formulación 7508 y la formulación 4886. Mediante la prueba de Kruskal-Wallis se determinó que el atributo olor es altamente estadísticamente significativo en los resultados (Sign<0,01), es decir la preferencia de las personas depende altamente del olor de la bebida.

**Tabla 59-4:** Prueba de Kruskal-Wallis para el análisis sensorial del atributo color

	<b>Valor</b>
<b>H de Kruskal-Wallis</b>	10,28
<b>Grados de libertad</b>	2
<b>Significancia</b>	0,006

Realizado por: Danya Brito, Jean Vásquez, 2019

#### *4.1.10. Tiempo de vida de anaquel*

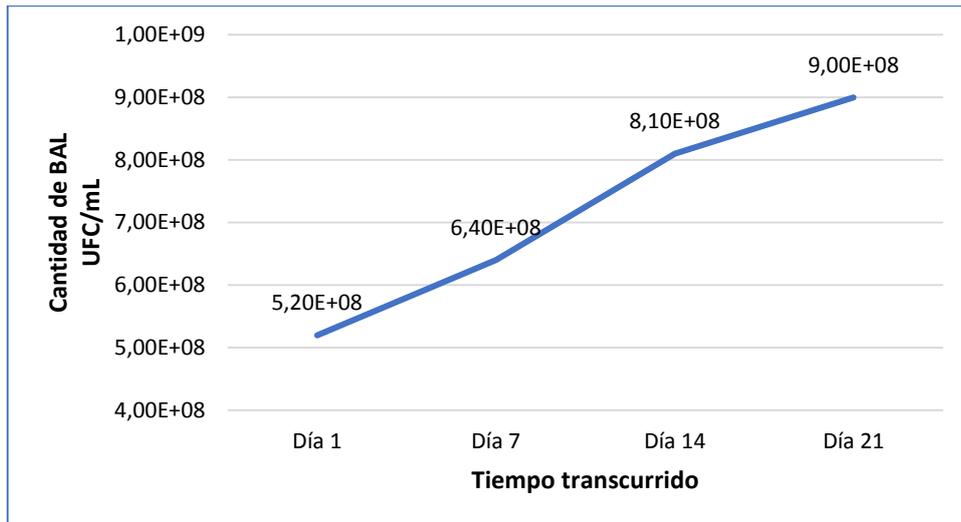
Se determinaron las características de la bebida probiótica durante los 21 días siguientes a su elaboración para analizar su tiempo de vida de anaquel.

**Tabla 60-4:** Parámetros de la bebida probiótica durante los 21 días desde su elaboración.

<b>ANÁLISIS DE LA MUESTRA</b>			
<b>Días</b>	<b>pH</b>	<b>Bacterias ácido lácticas UFC/g</b>	<b>Observaciones</b>
Día 1	4,44	$5,2 \times 10^8$	Aspecto normal, sabor y olor agradables
Día 7	4,27	$6,4 \times 10^8$	Aspecto normal, sabor y olor agradables
Día 14	4,11	$8,1 \times 10^8$	Aspecto normal, sabor y olor agradables
Día 21	4,02	$9,0 \times 10^8$	Características levemente ácidas

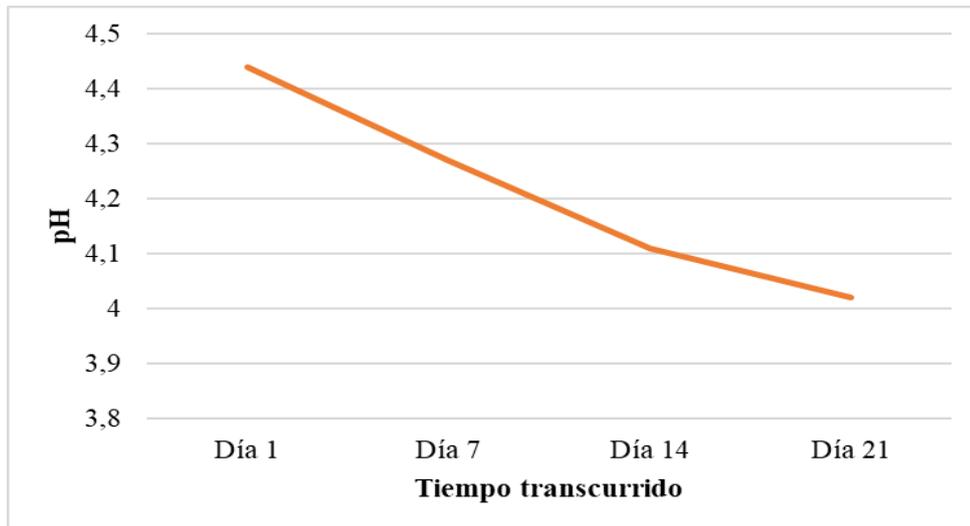
Realizado por: Danya Brito, Jean Vásquez, 2019

Se observa que durante los 21 días el pH fue disminuyendo hasta alcanzar un valor de 4,02, este valor indica que la bebida se acidificó con el transcurrir del tiempo sin embargo el pH deseado para el consumo se encuentra entre 3,5 a 4, por lo que este valor se encuentra entre los valores adecuados para su consumo. Además, se observó que la cantidad de bacterias ácido lácticas se incrementó por lo que la bebida se sigue considerando como probiótica. Por otro lado, entre las observaciones se tiene que durante las 3 primeras semanas su aspecto se mantiene normal y su sabor y olor son agradable, sin embargo, al día 21 las características de la bebida reportan un sabor y olor levemente ácido.



**Gráfico 17-4:** Cantidad de bacterias ácido lácticas durante los 21 días siguientes a la obtención de la bebida probiótica.

Realizado por: Danya Brito, Jean Vásquez, 2019



**Gráfico 18-4:** pH durante os 21 días siguientes a la obtención de la bebida probiótica.

Realizado por: Danya Brito, Jean Vásquez, 2019

Se pudo verificar que pasado los 21 días luego de haberse elaborado el producto, este se encuentra en condiciones adecuadas para su consumo manteniendo su característica como probiótica y con características organolépticas agradables. Hay que mencionar que para el análisis del tiempo de vida de anaquel no se utilizaron conservantes.

## 4.2. Pruebas de hipótesis

### 4.2.1. Hipótesis General

- A partir de la fermentación del lactosuero con *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus casei* se obtendrá una bebida probiótica que cumpla con los parámetros establecidos en la norma NTE INEN 2609.

Tras haberse evaluado la fermentación del lactosuero con los cultivos de *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus casei* y determinado los parámetros óptimos del proceso para la obtención de una bebida probiótica se realizó una comparación entre las características físico-químicas y microbiológicas del lactosuero tomado como materia prima y de la bebida probiótica obtenida.

**Tabla 61-4:** Comparación de los parámetros bromatológicos de la muestra de lactosuero y la bebida probiótica obtenida.

Parámetro	Unidad	Lactosuero	Bebida probiótica
Azúcares totales	%	4,12	0,70
Proteína	%	2,64	3,89
Grasa	%	0,10	0,40
Acidez titulable	%	0,11	0,32
pH	-	6,44	4,42
Cenizas	%	0,29	0,45

Realizado por: Danya Brito, Jean Vásquez, 2019

En cuanto a las características bromatológicas se observó que varios parámetros variaron con el proceso de fermentación y que cumplen con los parámetros establecidos en la norma NTE INEN 2609:2012 para bebidas de suero de acuerdo a la tabla 44-4.

**Tabla 62-4:** Comparación de los parámetros microbiológicos de la muestra de lactosuero y la bebida probiótica obtenida.

Parámetro	Unidad	Lactosuero	Bebida probiótica
Microorganismos aerobios mesófilos	UFC/mL	270000	30
<i>Escherichia coli</i>	UFC/mL	10	Ausencia
<i>Staphylococcus aureus</i>	UFC/mL	600	20
<i>Salmonella</i>	UFC/25mL	Negativo	Negativo
Detección de <i>Listeria monocytogenes</i>	UFC/mL	Negativo	Negativo

Realizado por: Danya Brito, Jean Vásquez, 2019

En lo referente a las características microbiológicas de la bebida probiótica se determinó que estos parámetros cumplen con los requisitos establecidos en la norma NTE INEN 2609:2012 para bebidas de suero de acuerdo a la tabla 45-4.

De acuerdo con las características bromatológicas y microbiológicas la bebida probiótica obtenida a partir de la fermentación del lactosuero es apta para el consumo. Además, se realizaron encuestas hacia posibles consumidores para determinar el grado de aceptación del producto.

**Tabla 63-4:** Resultados sobre la formulación de preferencia en el análisis sensorial de la bebida probiótica.

Parámetro	Formulación escogida	Significancia
Color	2062	No significativo
Consistencia	2062	Significativo
Sabor	2062	Significativo
Olor	2062	Significativo

Realizado por: Danya Brito, Jean Vásquez, 2019

Según los resultados del análisis sensorial la bebida probiótica de preferencia es la formulación 2062, y de acuerdo a la prueba estadística Kruskal-Wallis, los atributos que son significativos para los consumidores fueron consistencia, sabor y olor, mientras que el color no fue significativo en la elección.

#### 4.2.2. Hipótesis Específicas

##### 4.2.2.1. Hipótesis 1

- El lactosuero de la planta láctea JB cumplirá con los parámetros bromatológicos y microbiológicos de la norma NTE INEN 2594.

El lactosuero que se utilizó como materia prima para la obtención de una bebida probiótica a través de un proceso de fermentación fue analizado considerando sus características organolépticas, además de su análisis bromatológico y microbiológico. De acuerdo con el análisis directo de la materia prima se observó que su aspecto fue normal y libre de material extraño, además que su color, olor y sabor fueron característicos para un derivado de la leche según la tabla 1-4.

De acuerdo con la tabla 2-4, se observa que al realizarse el análisis de los parámetros bromatológicos y microbiológicos obtenidos del lactosuero de la Planta Láctea JB en

comparación a los que establece la norma NTE INEN 2594 se determina que los parámetros de proteína, grasa, azúcares totales, acidez titulable y pH se encuentran dentro del rango establecido para suero dulce.

En cuanto a la caracterización microbiológica del lactosuero, de acuerdo a la tabla 3-4, se determinó que la materia prima utilizada, es decir el lactosuero que sale como residuo de la producción de queso fresco de la planta láctea JB, presentó ausencia de *Salmonella* y *Listeria monocytogenes*, sin embargo, en cuanto a la cantidad de microorganismos aerobios mesófilos, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* se observó que estos valores sobrepasan los límites permitidos de acuerdo a la norma NTE INEN 2594 para suero de leche líquido, por lo que previo al proceso de fermentación para la obtención de una bebida probiótica se requirió de un proceso de pasteurización que garantizó condiciones adecuadas para su consumo.

#### 4.2.2.2. Hipótesis 2

- La bebida obtenida con *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus casei* cumplirá con las características para ser considerada como una bebida probiótica según la norma NTE INEN 2395.

Se analizó el proceso de fermentación con cada una de las bacterias por separado realizando 3 ensayos por cada tratamiento para probar su efectividad en la obtención de una bebida probiótica y se determinó que en cada tratamiento evaluado se obtuvieron valores superiores a  $10^6$  UFC/g en la cantidad total final de bacterias lácticas de las diferentes muestras que de acuerdo a la norma establecida para leches fermentadas NTE INEN 2395 (Ver ANEXO C) cumple con el requisito para considerar una bebida como probiótica, por lo tanto, se determinó que tanto la bacteria probiótica *Streptococcus thermophilus* como la bacteria probiótica *Lactobacillus casei* funcionan como inóculo para la obtención de una bebida probiótica a partir de lactosuero como se indica en la tabla.

**Tabla 64-4:** Resultados de la fermentación del lactosuero con *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus casei*

Fermentación de lactosuero con <i>Streptococcus thermophilus</i>			Fermentación de lactosuero con <i>Lactobacillus casei</i>		
Tratamiento	Parámetros de fermentación	Cantidad de BAL UFC/g	Tratamiento	Parámetros de fermentación	Cantidad de BAL UFC/g
1	Temperatura de fermentación=42°C Inóculo=0,07 g/L	5,5x10 <sup>8</sup>	1	Temperatura de fermentación=37°C, Inóculo=0,07 g/L	2,5x10 <sup>8</sup>
		1,0x10 <sup>9</sup>			4,3x10 <sup>7</sup>
		7,8 x10 <sup>8</sup>			2,4x10 <sup>8</sup>
2	Temperatura de fermentación=42°C, Inóculo=0,09 g/L	3,3x10 <sup>8</sup>	2	Temperatura de fermentación=37°C, Inóculo=0,09 g/L	2x10 <sup>8</sup>
		2,1 x10 <sup>9</sup>			5,2x10 <sup>7</sup>
		6,0 x10 <sup>9</sup>			6,9x10 <sup>7</sup>
3	Temperatura de fermentación=45°C, Inóculo=0,07 g/L	1,1 x10 <sup>9</sup>	3	Temperatura de fermentación=39°C, Inóculo=0,07 g/L	1,5x10 <sup>8</sup>
		7,6 x10 <sup>8</sup>			3,4x10 <sup>7</sup>
		6,6 x10 <sup>8</sup>			1,1x10 <sup>8</sup>
4	Temperatura de fermentación=45°C, Inóculo=0,09 g/L	8,9 x10 <sup>8</sup>	4	Temperatura de fermentación=39°C, 0,09 g/L	8,0x10 <sup>7</sup>
		7 x10 <sup>8</sup>			7,0x10 <sup>6</sup>
		4,3 x10 <sup>8</sup>			1,0x10 <sup>8</sup>

Realizado por: Danya Brito, Jean Vásconez, 2019

#### 4.2.2.3. Hipótesis 3

- La evaluación de los distintos tratamientos para la fermentación del lactosuero con *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus casei* permitirá determinar las condiciones óptimas para la obtención de una bebida probiótica.

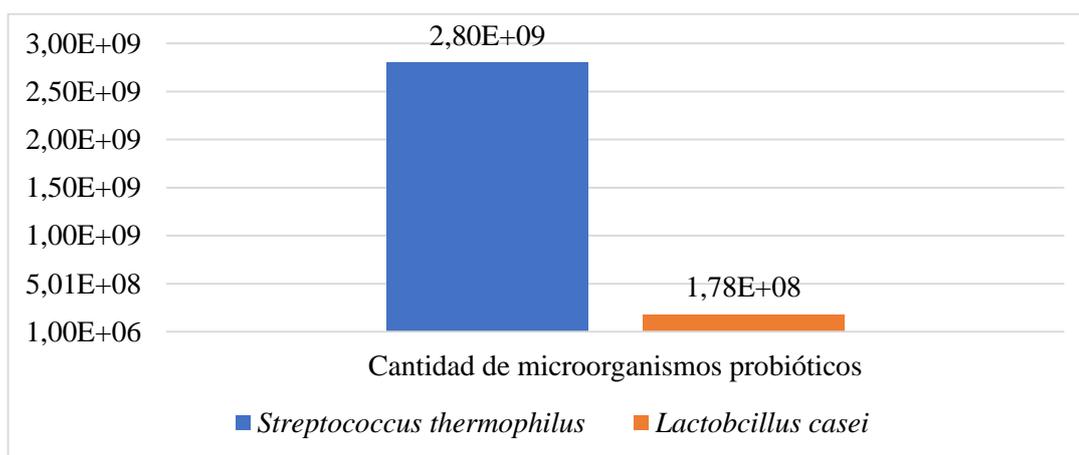
Al analizar los tratamientos de la fermentación del lactosuero con las bacterias ácido lácticas (*Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus casei*), considerando los factores de fermentación de temperatura y concentración de inóculo, se determinaron las condiciones óptimas del proceso para la obtención de una bebida probiótica.

En el caso de la fermentación del lactosuero utilizando *Streptococcus thermophilus*, de acuerdo al gráfico 5-4, se observa que el tratamiento 2 arroja una cantidad de microorganismos probióticos mucho mayor que los otros tratamientos con un tiempo de fermentación promedio de 6 horas. Sin embargo, al realizar un análisis de varianza según la tabla 23-4, se determinó que los parámetros de operación de temperatura y concentración no afectan significativamente al resultado final.

Por otro lado, en el caso de la fermentación del lactosuero utilizando *Lactobacillus casei*, de acuerdo al gráfico 10-4, se observa que el tratamiento 1 arroja una cantidad de microorganismos

probióticos más significativa que los otros tratamientos con un tiempo de fermentación promedio de 16 horas. Sin embargo, al realizar un análisis de varianza de los datos, de acuerdo con la tabla 23-4 se determinó que los parámetros de operación de temperatura y concentración no afectan significativamente al resultado final.

Por lo tanto, el tratamiento óptimo se determinó mediante una comparación entre el mejor tratamiento para la fermentación del lactosuero con *Streptococcus thermophilus* y el mejor tratamiento para la fermentación del lactosuero con *Lactobacillus casei*.



**Gráfico 19-4:** Comparación de la cantidad de bacterias ácido lácticas obtenidas mediante el mejor tratamiento de *Lactobacillus casei* y *Streptococcus thermophilus*.

Realizado por: Danya Brito, Jean Vásconez, 2019

Se determinó que el mejor tratamiento para la obtención de la bebida probiótica es la que se obtiene usando la bacteria ácido láctica *Streptococcus thermophilus* con el tratamiento 2 debido a la mayor cantidad de microorganismos producidos además del menor tiempo requerido una vez realizada la fermentación láctica del lactosuero.

**Tabla 65-4:** Parámetros de operación óptimos para la elaboración de la bebida probiótica

Parámetros de operación óptimos para la elaboración de la bebida probiótica	
Fermento iniciador	<i>Streptococcus thermophilus</i>
Temperatura de fermentación	45 °C
Cantidad de inóculo	0,09 g/L de lactosuero
Tiempo de fermentación	6 horas

Realizado por: Danya Brito, Jean Vásconez, 2019

### 4.3. Discusión de resultados

Uno de los factores más importantes dentro del proceso de la elaboración de la bebida es verificar la calidad de la materia prima, por lo cual se realizó el análisis bromatológico del lactosuero, ya que este debe cumplir con los parámetros establecidos en la norma NTE INEN 2594. Gracias a los datos resultantes de este análisis se identificó que el suero cumple con lo establecido en la norma. Comparando con el trabajo “Características fisicoquímicas y microbiológicas de suero de leche de queso Chihuahua.” de Montoya et al. (2014), se determinó que los parámetros del análisis físico-químico son similares, además, se acota que la composición de cada lote de lactosuero varía debido al proceso del que éste proviene y de la leche utilizada como materia prima.

Se evaluó la fermentación del lactosuero con dos bacterias ácido lácticas, *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus casei*, y se determinó mediante un análisis de varianza la influencia de los factores de temperatura y concentración de inóculos en los resultados finales de las muestras de lactosuero fermentadas a partir de los datos recolectados de concentración de bacterias ácido lácticas en cada uno de los 4 tratamientos realizados por cada inóculo. Se evidenció que las variables de temperatura y concentración de los inóculos no influyen de manera significativa para el resultado final del conteo de los microorganismos, debido a que los parámetros de la variable temperatura utilizados corresponden a los rangos establecidos para el crecimiento propio de las bacterias, en el caso de *Streptococcus thermophilus* son 42 y 45 °C mientras que para el *Lactobacillus casei* son de 37 y 39 °C. En el caso de la concentración del inóculo se manejaron valores de 0,07 y 0,09 g/L para las dos bacterias, estos valores fueron proporcionados por los distribuidores de los microorganismos recomendados para la fermentación de productos lácteos por lo cual los rangos establecidos para las variables no influyen significativamente en la fermentación del lactosuero.

La importancia de un alimento probiótico es que conserve en su composición una cantidad de  $10^6$  UFC/g de bacterias vivas como mínimo, sin embargo, al existir una mayor cantidad de microorganismos los beneficios probióticos de estos alimentos se potencian al usuario que los consume debido a que existe una mayor asimilación para el huésped. De los 4 tratamientos evaluados para la fermentación del lactosuero con *Streptococcus thermophilus* y de los 4 tratamientos evaluados para la fermentación del lactosuero con *Lactobacillus casei*, cada uno de estos con realizado con 3 repeticiones variando los parámetros de temperatura y concentración de inóculo se escogió al mejor tratamiento de cada bacteria ácido láctica, es decir, el tratamiento que arrojó un recuento mayor de bacterias ácido lácticas en las muestras fermentadas y se tuvo que

para *Streptococcus thermophilus* fue el segundo tratamiento, mientras que para *Lactobacillus casei* fue el primer tratamiento.

La fermentación del lactosuero con *Streptococcus thermophilus* se desarrolló en 6 horas, obteniendo un valor en el recuento de microorganismos de  $2,81 \times 10^9$  UFC/g, mientras que la fermentación del lactosuero con *Lactobacillus casei* se desarrolló en un tiempo promedio de 16 horas obteniendo un valor en el recuento de microorganismos de  $1,78 \times 10^8$  UFC/g. De acuerdo con el trabajo de Londoño (2008) se observa que se obtiene un valor muy parecido ( $1,6 \times 10^8$  UFC/g). Cabe recalcar que a pesar de la diferencia en los resultados de la fermentación del lactosuero con *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus casei*, ambas cumplen con la cantidad requerida de bacterias ácido lácticas que especifica la norma NTE INEN 2395 para que una bebida sea considerada como probiótica.

A partir de los datos recogidos de los dos mejores tratamientos entre las dos bacterias ácido lácticas se determinó que el mejor tratamiento fue el del *Streptococcus thermophilus* a una temperatura de fermentación de 42°C y con una concentración de inóculo de 0,09g/L, debido a que tanto como en los aspectos de tiempo y conteo final de microorganismos al término de la fermentación fueron mucho más rentables por lo cual se lo tomó para la elaboración de la bebida probiótica.

A partir de las condiciones óptimas de fermentación encontradas se formuló la bebida probiótica y se realizaron los análisis bromatológicos y microbiológicos para poder determinar la calidad del producto final y que sea adecuado para la elaboración por parte de la empresa. De acuerdo a las características microbiológicas (tabla 3-4 y la tabla 45-4), se notó un descenso considerable de las colonias de microorganismos de aerobios mesófilos y *Staphylococcus aureus*, además se notó una ausencia en el recuento de *Escherichia coli*, *Salmonella* y *Listeria monocytogenes*. Con respecto al lactosuero inicial y la bebida probiótica final, se demostró que la pasteurización efectuada fue realizada de una manera adecuada y efectiva debido a que se evidenció la disminución de la carga microbiana, mostrándose así la importancia del proceso de pasteurización para la inocuidad de los productos.

En el aspecto bromatológico (tabla 2-4 y tabla 44-4) se verificó cambios entre los valores obtenidos del lactosuero como materia prima y la bebida probiótica como producto final, dentro de los cuales se tiene que los azúcares totales se reducen de un 4,12% a un 0,70%. Esto debido a que el proceso fermentativo implica la reducción de la lactosa del suero a ácido láctico por parte de los microorganismos. En el aspecto de la proteína vemos un aumento del 2,64% al 3,89% debido a la síntesis de proteínas por medio de la bacteria ácido láctica, también se evidencia una

variación en el contenido graso y de acidez de la bebida, esto es atribuible a la variación del tipo de muestra recogido para los análisis, cabe destacar que, como punto de control del proceso, cada lote de lactosuero debe ser analizado previo a su utilización como materia prima. Por otra parte, el aumento del ácido láctico en la composición de la muestra es consecuente debido a la fermentación de la lactosa en el proceso.

Para determinar la aceptación de la bebida probiótica a partir del lactosuero, se procedió a realizar las formulaciones de la bebida con 3 distintas presentaciones variando los atributos de sabor, color, olor y consistencia (durazno, guanábana y mora), éstas se sometieron a una evaluación de Encuesta a Jueces Afectivos con el fin de poder evaluar la aceptación de la bebida probiótica en posibles consumidores y la presentación de mayor aceptación. Al término de recoger los datos de la encuesta se evaluó la bebida de preferencia de los encuestados, el resultado indicó que la bebida con el código 2062 (mora) fue la escogida por los jueces afectivos. De acuerdo a la prueba estadística de Kruskal-Wallis se determinó que los factores que influyeron en la decisión de los jueces fueron el sabor, olor y consistencia debido a la significancia encontrada, mientras que, en el aspecto del color, las personas no se ven afectadas por este aspecto al tomar su decisión.

El resultado final fue la obtención de la bebida probiótica con estándares de calidad basados en la norma NTE INEN 2609 para bebidas de suero. Al final, se realizó el diseño de la propuesta de obtención del producto que especifica las operaciones, variables, parámetros y puntos de control del proceso, además de los envases y etiquetas del producto para que pueda ser implementado por la Planta Láctea JB.

## CAPÍTULO V

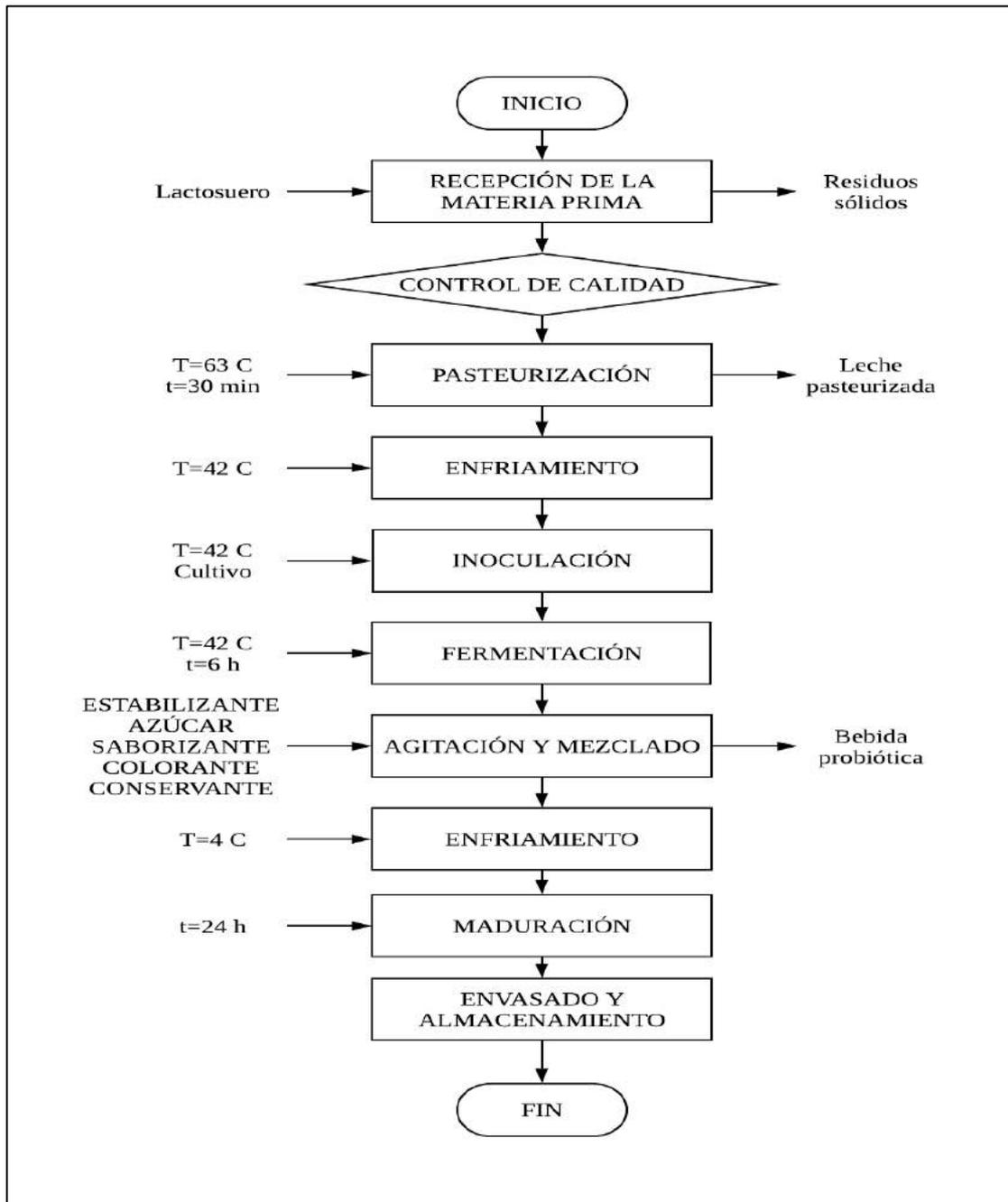
### 5. IMPLEMENTACIÓN DEL PROYECTO

#### *5.1. Propuesta para la implementación del proyecto*

La siguiente propuesta de proyecto es una guía mediante la cual la empresa podrá implementar la producción de un nuevo producto a base de lactosuero fermentado con cultivos de tipo probiótico. A continuación, se realiza la propuesta de la mecánica del proceso de obtención desde la recepción de la materia prima hasta el almacenado y empaquetado. Los análisis que se realizaron durante los ensayos en la parte investigativa y experimental han podido determinar los parámetros óptimos de operación y el manejo de variables adecuado para poder obtener una bebida de tipo probiótico que permita aprovechar adecuadamente el residuo principal de la producción principal de la planta láctea, que es el lactosuero, mismo que tiene un gran potencial nutritivo puesto que su composición integra minerales, proteínas y nutrientes para la dieta diaria de las personas a más que los cultivos probióticos potencian el desarrollo adecuado del sistema inmune de las personas y del cuidado de su tracto intestinal. De esta manera con el detalle de la propuesta del producto la Planta Láctea JB, puede hacer uso de los procedimientos e integrar un nuevo producto probiótico al cual hemos denominado “Prowey” a la línea de lácteos que maneja la planta.

#### *5.1.1. Descripción del proceso de elaboración de la bebida probiótica*

Se propone la ejecución de las siguientes etapas dentro del proceso de elaboración de la bebida:



**Gráfico 1-5:** Proceso de obtención de una bebida probiótica.

Realizado por: Danya Brito, Jean Vásquez, 2019

- **Recepción de la materia prima**

Se receipta el lactosuero proveniente del proceso de la elaboración de queso de la planta láctea en un tanque de recepción, equipada de una tela filtrante que separa la materia sólida resultante del proceso de elaboración de queso, manipulación y transporte del lactosuero.

- **Control de calidad**

Se realiza un control de las propiedades físico-químicas y microbiológicas del suero de manera que este cumpla con los parámetros de calidad, para que no se altere el producto final. Cada lote de lactosuero debe ser analizado previo a su utilización como materia prima para la obtención de una bebida probiótica debido a que los parámetros varían de acuerdo al proceso del que proviene el lactosuero y de la leche utilizada como materia prima.

- **Pasteurización**

Esta etapa consiste en aplicar un tratamiento térmico a la materia prima el cual permite eliminar la mayor cantidad de microorganismos patógenos que pudiesen causar enfermedades a los consumidores. Se aplica temperatura a la materia prima hasta los 63°C por un tiempo de 30 minutos en un fermentador equipado con termostato.

- **Enfriamiento**

Se procede a enfriar la materia prima hasta que alcance una temperatura de 45°C.

- **Inoculación**

Se adiciona el cultivo de fermentación que contiene *Streptococcus thermophilus* una vez que el lactosuero ha alcanzado la temperatura óptima de 42°C. Se deja fermentar por un tiempo aproximado de 6 horas, donde el lactosuero gracias a la producción de ácido láctico por parte del cultivo alcanza un pH deseado de 4 a 4,5.

- **Agitación y mezclado**

Una vez terminada la fermentación se adiciona el estabilizante, azúcar, saborizante, colorante y conservante. Se agita la mezcla por un tiempo aproximado de 10 minutos.

- **Enfriamiento**

Se vuelve a enfriar el producto ya terminado hasta la temperatura de 4°C donde la acción fermentativa por parte del cultivo se detiene y el producto mantiene las condiciones idóneas de conservación.

- **Maduración**

Se deja madurar el producto por 24 horas a la temperatura de 4°C, donde las características organolépticas se concentran y mejoran el producto final terminado.

- **Envasado y almacenado**

Finalmente se envasa el producto terminado en sus diferentes presentaciones y se dispone en refrigeradores donde se asegura la máxima conservación de propiedades e inocuidad del producto.

El proceso de obtención de una bebida probiótica se debe llevar a cabo por lotes, donde la fermentación es el proceso que la empresa debe tomar como cuello de botella por el tiempo que se requiere para su culminación.

### 5.1.2. *Requerimientos de los Equipos*

Los equipos que se requieren de acuerdo a la cantidad de lactosuero producido en la Planta Láctea JB (160 Litros por día), para la producción de una bebida probiótica a partir de lactosuero son:

**Tabla 1-5:** Requerimiento de equipos para la producción de una bebida probiótica,

<b>Equipo</b>	<b>Cantidad</b>
Caldera	1
Pasteurizadora	1
Tanque de almacenamiento	2
Fermentador	1
Envasadora	1
Termómetro	1
pH-metro	1
Balanza analítica	1

**Realizado por:** Danya Brito, Jean Vásquez, 2019

### 5.2. *Costos de la implementación de la propuesta*

Los costos para implementar la propuesta dentro de la Planta Láctea JB para la obtención de una bebida probiótica a partir de los 160 litros de lactosuero que se obtienen diariamente de la planta son:

**Tabla 1-5:** Costos de los equipos requeridos para la obtención de una bebida probiótica

<b>Equipo</b>	<b>Cantidad</b>	<b>Costo (\$)</b>
Tanque de almacenamiento	2	500,00
Fermentador	1	1000,00
Envasadora	1	3000,00
Termómetro	1	90,00
pH-metro	1	350,00
Balanza analítica	1	300,00
<b>TOTAL</b>		<b>5240,00</b>

**Realizado por:** Danya Brito, Jean Vásquez, 2019

La planta láctea cuenta con los equipos que también se requieren para la producción de una bebida probiótica como una caldera y una pasteurizadora.

**Tabla 2-5:** Costos de aditivos y materiales requeridos para la obtención de una bebida probiótica

	<b>Componente</b>	<b>Cantidad</b>	<b>Costo (\$)</b>
<b>Materia prima</b>	Lactosuero	160 L	0,00
<b>Aditivos</b>	Azúcar	9,6 kg	9,60
	Cultivo de bacteria ácido láctico ( <i>Streptococcus thermophilus</i> )	11,2 g	2,80
	Sorbato de potasio	8,64 g	0,11
	Gelatina	0,48 g	0,04
	Colorante artificial	64 mL	0,30
	Saborizante artificial	10 mL	0,50
	<b>Materiales</b>	Envases de plástico	160
Etiquetas		160	12,80
<b>Control de calidad</b>	Análisis del lactosuero	1	200,00
<b>TOTAL</b>			<b>266,15</b>

Realizado por: Danya Brito, Jean Vásconez, 2019

## CONCLUSIONES

- Se evaluó la fermentación del lactosuero de la Planta Láctea JB para la obtención de una bebida probiótica utilizando *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus casei*, teniéndose como resultado un producto que cumple con los parámetros de calidad organolépticos, bromatológicos y microbiológicos de acuerdo a la norma NTE INEN 2609 para bebidas de suero.
- Los datos obtenidos del análisis físico-químico del lactosuero se encontraron dentro del rango de valores de referencia de acuerdo a la norma NTE INEN 2395, mientras que los datos obtenidos del análisis microbiológico del lactosuero no se encontraron en el rango de los valores de referencia establecidos en la norma por lo que se requirió de un proceso de pasteurización previo al procesamiento del lactosuero.
- Para la obtención de la bebida probiótica se fermentó el lactosuero utilizando *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus casei* llevando a cabo cuatro tratamientos considerando como variables de estudio la temperatura de fermentación y la concentración de inóculo para cada bacteria ácido láctica probiótica.
- El lactosuero fermentado con *Streptococcus thermophilus* alcanzó un pH entre (3,5 y 4,5) en un tiempo de 5-7 horas, y una cantidad de bacterias ácido lácticas de  $2,8 \times 10^9$  UFC/mL, cumpliendo con el valor establecido por la norma NTE INEN 2395 para bebidas probióticas, los mejores resultados se obtuvieron con la fermentación a una temperatura de 42°C y con una concentración de 0,09 g/L de inóculo.
- El lactosuero fermentado con *Lactobacillus casei* alcanzó el pH deseado entre 3,5 y 4,5 en un tiempo de 15-16 horas, y una cantidad de bacterias ácido lácticas de  $1,78 \times 10^8$  UFC/mL, cumpliendo con el valor establecido por la norma NTE INEN 2395 para bebidas probióticas, los mejores resultados se obtuvieron con la fermentación a una temperatura de 37°C y con una concentración de 0,07 g/L de inóculo.
- En la fermentación del lactosuero con *Streptococcus thermophilus* se obtuvo la mayor cantidad de bacterias ácido lácticas y en menor tiempo que la muestra de lactosuero fermentado *Lactobacillus casei*.
- El proceso óptimo para la obtención de una bebida probiótica es la fermentación del lactosuero con *Streptococcus thermophilus* a una temperatura de 42°C, con una concentración de inóculo de 0,09 g/L.

## **RECOMENDACIONES**

- Se debe analizar las características físico-químicas, microbiológicas y organolépticas del lactosuero por cada lote.
- Se recomienda tomar en cuenta los distintos beneficios que tiene cada bacteria probiótica para la elección del inóculo para el proceso de producción de una bebida probiótica.
- Verificar la obtención de una bebida probiótica utilizando pulpas naturales y endulzantes no calóricos.
- Evaluar la fermentación del lactosuero con otras bacterias probióticas existentes en el mercado para determinar sus beneficios.

## BIBLIOGRAFÍA

**ARENAS-SUESCÚN, C., ZAPATA-FERNANDEZ, R. Y GUTIÉRREZ-CORTÉS C.** "Evaluación de la fermentación láctica de la leche con adición de quinua (*Chenopodium quinoa*)."  
*Vitae* [en línea]. 2012. S.l.: [Consulta: 10 noviembre 2018]. Disponible en:  
<http://www.redalyc.org/pdf/1698/169823914084.pdf>.

**BLANCO, P.** Caracterización de bacterias de *Streptococcus thermophilus* aisladas de leche cruda bovina, ovina y caprina. [en línea]. 2015. S.l.: Universidad de la República de Uruguay. [Consulta: 13 noviembre 2018]. Disponible en:  
<https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/bitstream/123456789/8221/1/uy24-17716.pdf>.

**CHÁVEZ, L., et al.** "Proteínas del lactosuero usos, relación con la salud y bioactividades."  
*Interciencia: Revista de ciencia y tecnología de América*, [en línea]. 2017. Vol. 42, N°. 11, págs. 712-718., vol. 42, no. 11, pp. 712-718. [Consulta: 13 noviembre 2018]. ISSN 0378-1844. Disponible en:  
<https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=6182640>.

**CUENCA, M. Y QUICAZÁN, M.** "Comparación de la Fermentación de Bebida de Soya y Leche de Vaca utilizando un Cultivo Láctico Comercial". *Revista Ingeniería. Universidad del Valle* Vol 2 [en línea]. 2011. pp. 16-22. Disponible en:  
[http://revistaingenieria.univalle.edu.co/index.php/ingenieria\\_y\\_competitividad/article/view/229](http://revistaingenieria.univalle.edu.co/index.php/ingenieria_y_competitividad/article/view/229)

**FAO/OMS.** CODEX ALIMENTARIUS: Requisitos Generales. 2da Edición. Roma: s.n. FAO, 2001. CODEX Standard for sugars 1 CODEX STAN 212-1999. Practice,

**GIRALDO, G.** Métodos de estudio de vida de anaquel de los productos. [en línea]. 2000. S.l.: Universidad Nacional de Colombia. Disponible en:  
<http://www.bdigital.unal.edu.co/51276/1/metodosdeestudiodevidadeanaqueldelosalimentos.pdf>.

**GUÉRIN-DANAN, C., et. al.** "Food supplementation with milk fermented by *Lactobacillus casei*". *US National Library of Medicine*. 2001. pp. 131 (1): 111-117.

**HERNÁNDEZ-ROJAS, M. Y VÉLEZ-RUIZ, J.F.** "Suero de leche y su aplicación en la elaboración de alimentos funcionales". *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos* 8. [en línea], 2014. pp. 13-22. [Consulta: 13 noviembre 2018]. Disponible en:  
<http://web.udlap.mx/tsia/files/2015/05/TSIA-82-Hernandez-Rojas-et-al-2014.pdf>.

**NTE INEN 1529.1:** Control microbiológico de los alimentos. Preparación de medios de cultivo y reactivos. 1999. Ecuador: s.n.

**NTE INEN 1529-5:** Control microbiológico de los alimentos. determinación de la cantidad de microorganismos aerobios mesófilos. rep. 2006. Ecuador: s.n.

**LONDOÑO, M., et.al.** "Bebida fermentada de suero de queso fresco inoculada con *Lactobacillus casei*". *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín* [en línea]. 2008. S.l.: s.n. [Consulta: 13 noviembre 2018]. Disponible en:  
<https://revistas.unal.edu.co/index.php/refame/article/view/24741>.

**MANI-LÓPEZ, E., PALOU, E. Y LÓPEZ-MALO, A.** "Probiotic viability and storage stability of yogurts and fermented milks prepared with several mixtures of lactic acid bacteria". *Journal of Dairy Science*. 2014. ISSN 00220302. DOI 10.3168/jds.2013-7551.

**MANZANO A, C., ESTUPIÑÁN G, D. Y POVEDA E, E.** "Efectos clínicos de los probióticos: Qué dice la evidencia". *Revista chilena de nutrición*. [en línea]. 2012. vol. 39, no. 1, pp. 98-110. [Consulta: 13 noviembre 2018]. ISSN 0717-7518. Disponible en:  
[http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S071775182012000100010&lng=en&nrm=iso&tlng=en](http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S071775182012000100010&lng=en&nrm=iso&tlng=en).

**MINELLI, E., et al.** "Assessment of novel probiotic *Lactobacillus casei* strains for the production of functional dairy foods". *International Dairy Journal*, 2004. ISSN 09586946. DOI 10.1016/j.idairyj.2004.01.007.

**MONTES, M. Y GARCÍA, J.** "Género Streptococcus: una revisión práctica para el laboratorio de microbiología". *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 2009. ISSN 0213005X. DOI 10.1157/13111833.

**MOULAY, M., et al.** "Cultivable Lactic Acid Bacteria Isolated from Algerian Raw Goat 's Milk and Their Proteolytic Activity". *World Journal of Dairy & Food Sciences*, 2006.

**MULTON, J.-L.** *Aditivos y auxiliares de fabricación en las industrias agroalimentarias*. 2da Edició. Madrid: s.n. 1999. ISBN 8420006173.

**MUSET, G. Y CASTELLS, M.** *Valorización del lactosuero*. 1ra edición. San Martín: s.n. 2017.

**NARANJO, J.**, Design and analysis of the polyhydroxybutyrate ( PHB ) production from agroindustrial wastes in Colombia. S.l.: Universidad Nacional de Colombia. 2014.

**PAREDES, P., ET AL.**, "Características fisicoquímicas y microbiológicas de suero de leche de queso Chihuahua". *Red de Revistas Científicas de America Latina, el Caribe, España y Portugal*. 2014.

**PARÍS, X.**, Obtención de exopolisacáridos de interés industrial a partir del lactosuero y permeatos [en línea]. 2009. S.l.: Universidad de Granada. Disponible en:  
<http://digibug.ugr.es/bitstream/handle/10481/2376/18101604.pdf;jsessionid=0A24675051FD94EE3FEABA68A0AB894A?sequence=1>.

**PARRA, R.** "Lactosuero: Importancia en la industria de alimentos". *Rev. Fac. Nac. Agron. Medellín*, vol. 62. 2009.

**PILATTI, M.A., ET AL.** "Permeado de suero como abono: respuesta de maíz para silo y efectos en un argiudol de la Pampa Llana santafesina". *FAVE Sección Ciencias Agrarias*. 2014. ISSN 1666-7719. DOI 10.14409/fa.v10i1/2.4140.

**POVEDA, E.**, "Suero Lácteo. Generalidades y potencial uso como fuente de calcio de alta disponibilidad". *Revista chilena de nutrición*. 2013. DOI 40(4).397-403.

**RAMÍREZ, J.**, Aprovechamiento Industrial de Lactosuero Mediante Procesos Fermentativos. Universidad del Valle, 2011.

**RAMÍREZ, J., et al.** "Bacterias lácticas: Importancia en alimentos y sus efectos en la salud." *Revista Fuente*. [en línea], 2011. pp. 7. [Consulta: 9 noviembre 2018]. Disponible en:  
[https://www.academia.edu/8209996/Bacterias lácticas Importancia en alimentos y sus efectos en la salud](https://www.academia.edu/8209996/Bacterias_lácticas_Importancia_en_alimentos_y_sus_efectos_en_la_salud).

**RODRÍGUEZ, E.**, Estudio respirométrico de *Lactobacillus casei* ATCC 393 en presencia de iones Cu (II) Y Zn (II). 2000. [en línea]. S.l.: Universidad Autónoma de Nuevo León. Disponible en: <http://eprints.uanl.mx/6331/1/1080095012.PDF>.

**ROJAS, A.M., MONTAÑO, L.P. Y BASTIDAS, M.J.** "Producción de ácido láctico a partir del lactosuero utilizando *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*". *Revista Colombiana de Química*, 2016. ISSN 0120-2804. DOI

10.15446/rev.colomb.quim.v44n3.55604.

**RUGGIERO, P.**, "Use of probiotics in the fight against *Helicobacter pylori*". *World Journal of Gastrointestinal Pathophysiology*, 2014. ISSN 2150-5330. DOI 10.4291/wjgp.v5.i4.384.

**RUL, F., et al.** "Impact of the metabolic activity of *Streptococcus thermophilus* on the colon epithelium of gnotobiotic rats". *Journal of Biological Chemistry*, 2011. ISSN 00219258. DOI 10.1074/jbc.M110.168666.

**SERNA-COCK, L. Y STOUVENEL, A.R.**, *Producción biotecnológica de ácido láctico: Estado del arte. Ciencia y Tecnología Alimentaria*, 2009. ISSN 1135-8122. DOI 10.1080/11358120509487672.

**SEVILLA, D.**, Ecología Microbiana de Yogur: Determinación de la Dinámica Poblacional de *Lactobacillus Delbrueckii ssp. Bulgaricus* y *Streptococcus Thermophilus* por Medio de Técnicas Tradicionales y Moleculares. [en línea]. S.l.: Tecnológico de Monterrey. 2009. [Consulta: 13 noviembre 2018]. Disponible en:

[https://repositorio.itesm.mx/bitstream/handle/11285/569400/DocsTec\\_10143.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://repositorio.itesm.mx/bitstream/handle/11285/569400/DocsTec_10143.pdf?sequence=1&isAllowed=y).

**SPIEGEL, M.R. Y STEPHENS, L.J.** *Estadística*. S.l.: s.n. 2009. ISBN 9789701068878.

**TIRADO, D.F., ACEVEDO, D. Y MONTERO, P.M.** "Extracción de proteínas del lactosuero de la leche de cabra mediante la aplicación de campos eléctricos pulsantes de alta intensidad" (CEPAI). *Información Tecnológica*. 2015. ISSN 07180764. DOI 10.4067/S0718-07642015000500010.

**TRUJILLO, M., SUAREZ, F. Y GALLEGU, D.** Fermentación láctica en continuo a partir de suero dulce de leche desproteínizado [en línea]. S.l.: Universidad Nacional de Colombia. 1998. [Consulta: 9 noviembre 2018]. Disponible en:

<https://revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/29984>.

**URIOT, O., ET AL.** "*Streptococcus thermophilus*: From yogurt starter to a new promising probiotic candidate?" *Journal of Functional Foods* [en línea], vol. 37, pp. 74-89. 2017. [Consulta: 13 noviembre 2018]. ISSN 1756-4646. DOI 10.1016/J.JFF.2017.07.038. Disponible en:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1756464617304267>.

**VERGARA, A.**, Estudio de la Viabilidad de *Lactobacillus casei.pdf* [en línea]. S.l.: Universidad Austral de Chile. 2007. [Consulta: 13 noviembre 2018]. Disponible en: [https://drive.google.com/file/d/liGY4Xf6nMb3UCBweRIBqc6lv\\_v-BcIym/view](https://drive.google.com/file/d/liGY4Xf6nMb3UCBweRIBqc6lv_v-BcIym/view).

## ANEXOS

### ANEXO A: Requisitos para suero de leche de acuerdo a la norma NTE INEN 2594:2011

#### 6. REQUISITOS

##### 6.1 Requisitos físicos y químicos

6.1.1 El suero de leche líquido, ensayado de acuerdo con las normas correspondientes, debe cumplir con lo establecido en la tabla 1.

**TABLA 1. Requisitos físico-químicos del suero de leche líquido**

Requisitos	Suero de leche dulce		Suero de leche ácido		Método de ensayo
	Min.	Max.	Min.	Máx.	
Lactosa, % (m/m)	--	5,0	--	4,3	AOAC 984.15
Proteína láctea, % (m/m) <sup>(1)</sup>	0,8	--	0,8	--	NTE INEN 16
Grasa láctea, % (m/m)	--	0,3	--	0,3	NTE INEN 12
Ceniza, % (m/m)	--	0,7	--	0,7	NTE INEN 14
Acidez titulable, % (calculada como ácido láctico)	--	0,16	0,35	--	NTE INEN 13
pH	6,8	6,4	5,5	4,8	AOAC 973.41

<sup>(1)</sup> el contenido de proteína láctea es igual a 6,38 por el % nitrógeno total determinado

6.1.2 *Requisitos microbiológicos.* El suero de leche líquido ensayado de acuerdo con las normas correspondientes, debe cumplir con lo establecido en la tabla 2.

**TABLA 2. Requisitos microbiológicos para el suero de leche líquido.**

Requisito	n	m	M	c	Método de ensayo
Recuento de microorganismos aerobios mesófilos ufc/g.	5	30 000	100 000	1	NTE INEN 1529-5
Recuento de Escherichia coli ufc/g.	5	< 10	-	0	NTE INEN 1529-8
Staphylococcus aureus ufc/g.	5	< 100	100	1	NTE INEN 1529-14
Salmonella /25g.	5	ausencia	-	0	NTE INEN 1529-15
Detección de <i>Listeria monocytogenes</i> /25 g	5	ausencia	-	0	ISO 11290-1

Donde:

n = Número de muestras a examinar.

m = índice máximo permisible para identificar nivel de buena calidad.

M = índice máximo permisible para identificar nivel aceptable de calidad.

c = Número de muestras permisibles con resultados entre m y M.

6.1.3 *Aditivos.* Se permite el uso de los aditivos enlistados en la NTE INEN 2074.

6.1.4 *Contaminates.* El límite máximo no debe superar lo establecido en el Codex Alimentarius CODEX STAN 193-1995, en su última edición.

6.2 **Requisitos complementarios.** El suero de leche líquido debe mantener la cadena de frío en el almacenamiento, y distribución a una temperatura de 4 °C ± 2 °C y su transporte debe ser realizado en condiciones idóneas que garanticen el mantenimiento del producto.

#### 4. DISPOSICIONES GENERALES

4.1 El suero de leche dulce líquido o en polvo, destinado a la elaboración de la bebida de suero debe cumplir con la NTE INEN 2586 y/o NTE INEN 2594, y su procesamiento se realiza de acuerdo a los principios del Reglamento de Buenas Prácticas de Manufactura del Ministerio de Salud Pública.

4.2 Las bebidas de suero deben tener: textura, color, olor y sabor, característico de acuerdo a los ingredientes y/o aditivos adicionados.

4.3 Se permite la utilización de proteínas lácteas, sus péptidos y/o sus sales : ingredientes no lácteos solos o combinados; azúcares y/o endulzantes, maltodextrina, dextrosa, pulpa de fruta, jugos a base de frutas, miel, cereales vegetales, grasas vegetales , chocolate, café, especies, almidones o almidones modificados, gelatina entre otros. No se permite utilizar leche o leche reconstituida

4.4 El suero debe representar por lo menos 50 % (m/m), del total de ingredientes del producto.

4.5 Los límites máximos de plaguicidas no deben superar los establecidos en el Codex Alimentarius CAC/ MRL 1, en su última edición.

4.6 Los límites máximos de residuos de medicamentos veterinarios no deben superar los establecidos en el Codex Alimentario CAC/MRL 2, en su última edición.

#### 5. REQUISITOS

##### 5.1 Requisitos Específicos

5.1.1 Las bebidas de suero, ensayadas de acuerdo con las NTE INEN correspondientes, deben cumplir con las especificaciones que se indican en la tabla 1.

**TABLA 1. Requisitos físico-químicos para la bebida de suero**

REQUISITOS	TIPO I		METODO DE ENSAYO
	Min.	Máx.	
Proteína láctea %	0,4	-	NTE INEN 16
Lactosa en el producto parcialmente deslactosado, %	--	1,4	AOAC 994.15 15 Edc. Vol 2.
Lactosa en el producto bajo en lactosa, %	--	0,85	AOAC 994.15 15 Edc. Vol 2.

5.1.2 *Requisitos microbiológicos.* Las bebidas de suero ensayadas de acuerdo con las NTE INEN correspondientes, deben cumplir con las especificaciones establecidas en la Tabla 2 para las bebidas de suero pasteurizadas y con el numeral 5.1.2.1 para las bebidas de suero, larga vida.

**TABLA 2. Requisitos microbiológicos para la bebida de suero, pasteurizada.**

Requisito	n	m	M	c	Método de ensayo
Recuento de microorganismos aerobios mesófilos ufc/g.	5	30 000	100 000	1	NTE INEN 1529-5
Recuento de <i>Escherichia coli</i> ufc/g.	5	< 10	-	0	NTE INEN 1529-8
<i>Staphylococcus aureus</i> ufc/g.	5	< 100	100	1	NTE INEN 1529-14
<i>Salmonella</i> /25g.	5	ausencia	-	0	NTE INEN 1529-15
Detección de <i>Listeria monocytogenes</i> /25 g	5	ausencia	-	0	ISO 11290-1

## Continuación-ANEXO B

**5.1.2.1** Las bebidas de suero ultra pasteurizadas y esterilizadas deben evidenciar ausencia de microorganismos patógenos. Y cumplir con la prueba de esterilidad comercial de acuerdo a la NTE INEN 2335

**5.1.3** *Aditivos.* Se pueden utilizar los aditivos permitidos y en las cantidades especificadas en la NTE INEN 2 074

**5.1.7** *Contaminantes.* El límite máximo permitido será el que establece el Codex alimentarius de contaminantes CODEX STAN 193- 1995

### **5.2 Requisitos complementarios**

**5.2.1** La bebida de suero, pasteurizada debe mantenerse en planta y en los lugares de expendio a una temperatura no mayor de  $4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ .

**5.2.2** Las bebidas de suero, larga vida pueden mantenerse en planta y en los lugares de expendio a temperatura ambiente.

**5.2.3** El almacenamiento, distribución y expendio de la bebida de suero debe realizarse en el envase original.

**5.2.4** La bebida de suero debe ser transportada en condiciones idóneas que garanticen el mantenimiento del producto; la bebida de suero, pasteurizada se transportará a una temperatura máxima de  $7^{\circ}\text{C}$ .

## **6. INSPECCIÓN**

### **6.1 Muestreo**

**6.1.1** El muestreo debe realizarse de acuerdo con lo establecido en la NTE INEN 004

### **6.2 Aceptación o rechazo**

**6.2.1** Se acepta el producto si cumple con los requisitos establecidos en esta norma; caso contrario se rechaza.

## **7. ENVASADO Y EMBALADO**

**7.1** Las bebidas de suero deben expendirse en envases de material grado alimentario, herméticamente cerrados, que aseguren la adecuada conservación y calidad del producto; sea resistente a su acción y no altere las características organolépticas sensoriales del mismo.

**7.2** La bebida de suero envasada y colocada en el mercado, no debe ser reprocesada y debe ser vendida en su envase original.

## **8. ROTULADO**

**8.1** El rotulado de este producto debe cumplir con el RTE INEN 022.

**8.2** En las bebidas de suero en la cara principal de exhibición del rótulo, junto al nombre del alimento en el mismo tamaño de letra, en forma legible, se debe incluir el porcentaje (m/m) de contenido de suero de leche que se utiliza como ingrediente.

**ANEXO C:** Requisitos de la norma NTE INEN 2395:2011 para leches fermentadas. Cantidad de bacterias probióticas.

**6.1.5** Las leches fermentadas deben cumplir con los requisitos del contenido mínimo del cultivo del microorganismo específico (*Lactobacillus delbruekii* subsp. *bulgaricus* y *Streptococcus salivaris* subsp. *thermophilus*; *Lactobacillus acidophilus*, según sea el caso), y de bacterias probióticas, hasta la fecha de vencimiento, de acuerdo con lo indicado en la tabla 2.

**TABLA 2. Cantidad de microorganismos específicos en leche fermentada sin tratamiento térmico posterior a la fermentación**

PRODUCTO	Yogur, kumis, kéfir, leche cultivada, leches fermentadas con ingredientes y leche fermentada concentrada Mínimo	kéfir y kumis Mínimo
Suma de microorganismos que comprenden el cultivo definido para cada producto	10 <sup>7</sup> UFC/g	
Bacterias probióticas	10 <sup>6</sup> UFC/g	
Levaduras		10 <sup>4</sup> UFC/g

**6.1.6 Requisitos microbiológicos**

**6.1.6.1** Al análisis microbiológico correspondiente las leches fermentadas deben dar ausencia de microorganismos patógenos, de sus metabolitos y toxinas.

**6.1.6.2** Las leches fermentadas, ensayadas de acuerdo con las normas ecuatorianas correspondientes deben cumplir con los requisitos microbiológicos establecidos en la tabla 3.

**TABLA 3. Requisitos microbiológicos en leche fermentada sin tratamiento térmico posterior a la fermentación**

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

En donde:

n = Número de muestras a examinar.

m = Índice máximo permisible para identificar nivel de buena calidad.

M = Índice máximo permisible para identificar nivel aceptable de calidad.

c = Número de muestras permisibles con resultados entre m y M.

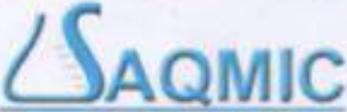
**6.1.6.3** Cuando se analicen muestras individuales se tomaran como valores máximos los expresados en la columna m.

**6.1.6.4** Las leches fermentadas tratadas térmicamente y envasadas asépticamente deben demostrar esterilidad comercial de acuerdo a NTE INEN 2335

**6.1.7 Aditivos.** Se permite el uso de los aditivos establecidos en la NTE INEN 2074 para estos productos

**6.1.8 Contaminantes.** El límite máximo de contaminantes no deben superar los límites establecidos por el Codex Stan 193-1995

## ANEXO D: Caracterización bromatológica del lactosuero



**SAQMIC**  
Servicios Analíticos Químicos y Microbiológicos  
en Aguas y Alimentos

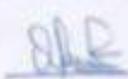
### EXAMEN BROMATOLÓGICO DE ALIMENTOS

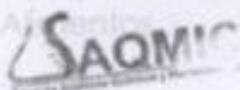
**CÓDIGO: 019-19**

**CLIENTE:** Seta, Danyá Brito/ Sr. Jean Vasconez.  
**TIPO DE MUESTRA:** Suero Lácteo.  
**FECHA DE RECEPCIÓN:** 10 de enero del 2019  
**FECHA DE MUESTREO:** 10 de enero del 2019

**EXAMEN FÍSICO**  
**COLOR:** Característico  
**OLOR:** Característico  
**ASPECTO:** Normal, libre de material extraño

DETERMINACIONES	UNIDADES	MÉTODO DE ANÁLISIS	RESULTADO
Proteína	%	ENEN 016	2.64
Grasa	%	ENEN 012	0.10
Azúcar	%	ENEN 013	8.11
Sólidos totales	%	ENEN 014	6.83
pH	Unid.	-	6.44
Almidón total	%	ENEN 398	4.12
Cenizas	%	ENEN 544	0.29

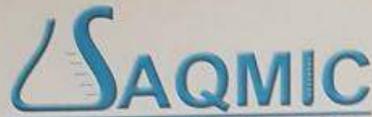
**RESPONSABLE:**   
**Dra. Gina Álvarez R.**



El informe sólo afecta a la muestra solicitada a ensayo; el informe no deberá reproducirse sino en su totalidad previo autorización de los responsables.  
\*La muestra es receptada en laboratorio.

Dirección: Av. 11 de Noviembre y Milton Reyes  
Cochabamba: 098260374 - 032 942 322  
Bibamba - Ecuador

**ANEXO E: Caracterización microbiológica del lactosuero**



Servicios Analíticos Químicos y Microbiológicos  
en Aguas y Alimentos

**EXAMEN MICROBIOLÓGICO DE ALIMENTOS**

**CÓDIGO: 068-19**

**CLIENTE:** Srta. Danya Brito/ Sr. Jean Vasconez

**TIPO DE MUESTRA:** Suero Lácteo

**FECHA DE RECEPCIÓN:** 11 de marzo del 2019

**FECHA DE MUESTREO:** 11 de marzo del 2019

**EXAMEN FISICO**

**COLOR:** Característico

**OLOR:** Característico

**ASPECTO:** Normal, libre de material extraño

DETERMINACION	UNIDADES	METODO	RESULTADO
Listeria	UFC/ml	Siembra en masa	Negativo
Escherichia Coli	UFC/ml	Siembra en masa	10
Acrobios mesófilos	UFC/ml	Siembra en masa	27*10 <sup>4</sup>
Salmonella	UFC/ 25ml	Reveal 2.0	Negativo
Estafilococos Áureos	UFC/ml	Siembra en masa	600

**RESPONSABLE:**

**Dra. Gina Álvarez R.**



El informe sólo afecta a la muestra solicitada a ensayo; el informe no deberá reproducirse sino en su totalidad previo autorización de los responsables.

\*La muestra es receptada en laboratorio

## ANEXO F: Caracterización de la bebida probiótica



### EXAMEN BROMATOLÓGICO Y MICROBIOLÓGICO DE ALIMENTOS CÓDIGO: 88-19

**CLIENTE:** Danya Brito y Jean Carlos Vasconez

**TIPO DE MUESTRA:** Bebida probiótica

**FECHA DE RECEPCIÓN:** 01 de abril del 2019

**FECHA DE MUESTREO:** 01 de abril del 2019

#### EXAMEN FÍSICO

**COLOR:** Característico

**OLOR:** Característico

**ASPECTO:** Homogéneo libre de material extraño

#### EXAMEN QUÍMICO

DETERMINACION	UNIDADES	METODO	RESULTADO
<i>Proteína</i>	%	INEN 543	3.89
<i>Grasa</i>	%	INEN 523	0.40
<i>Azúcares Totales</i>	%	-	0.70
<i>Ceniza</i>	%	INEN 544	0.45
<i>pH</i>	<i>Unid.</i>	-	4.42
<i>Acidez expresado como ácido láctico</i>	%	-	0.32
<i>Aerobios mesófilos</i>	<i>UFC/g</i>	Siembra en masa	30
<i>Stafilococcus aureus</i>	<i>UFC/g</i>	Siembra en masa	20
<i>Escherichia coli</i>	<i>UFC/g</i>	Siembra en masa	Ausencia

**RESPONSABLE:**



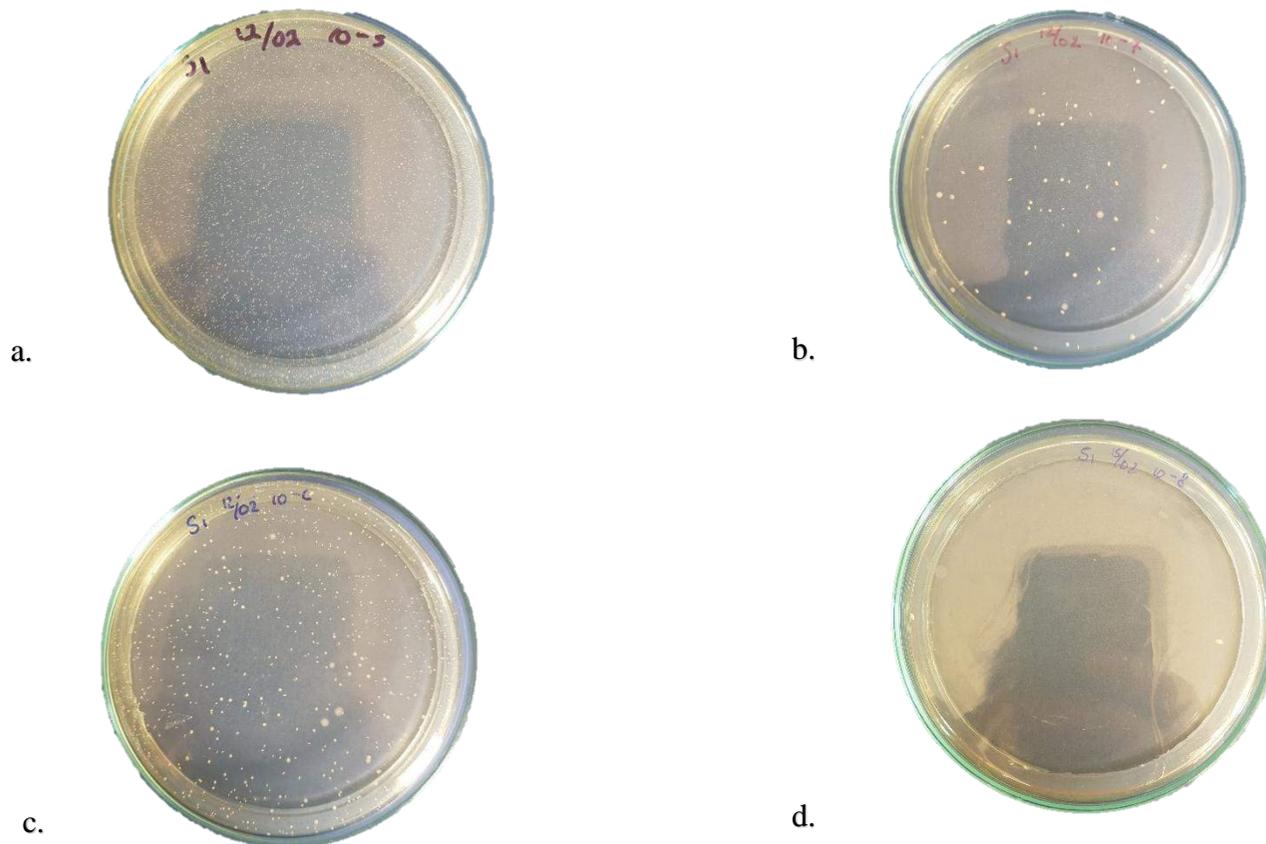
**Dra. Gina Álvarez R.**

El informe sólo afecta a la muestra solicitada a ensayo; el informe no deberá reproducirse sino en su totalidad previo autorización de los responsables.

Contáctanos: 0998580374-032924322  
Av. 11 de Noviembre y Milton Reyes  
Riobamba – Ecuador

ANEXO G: Recuento en placa de bacterias ácido lácticas del lactosuero fermentado con *Streptococcus thermophilus*

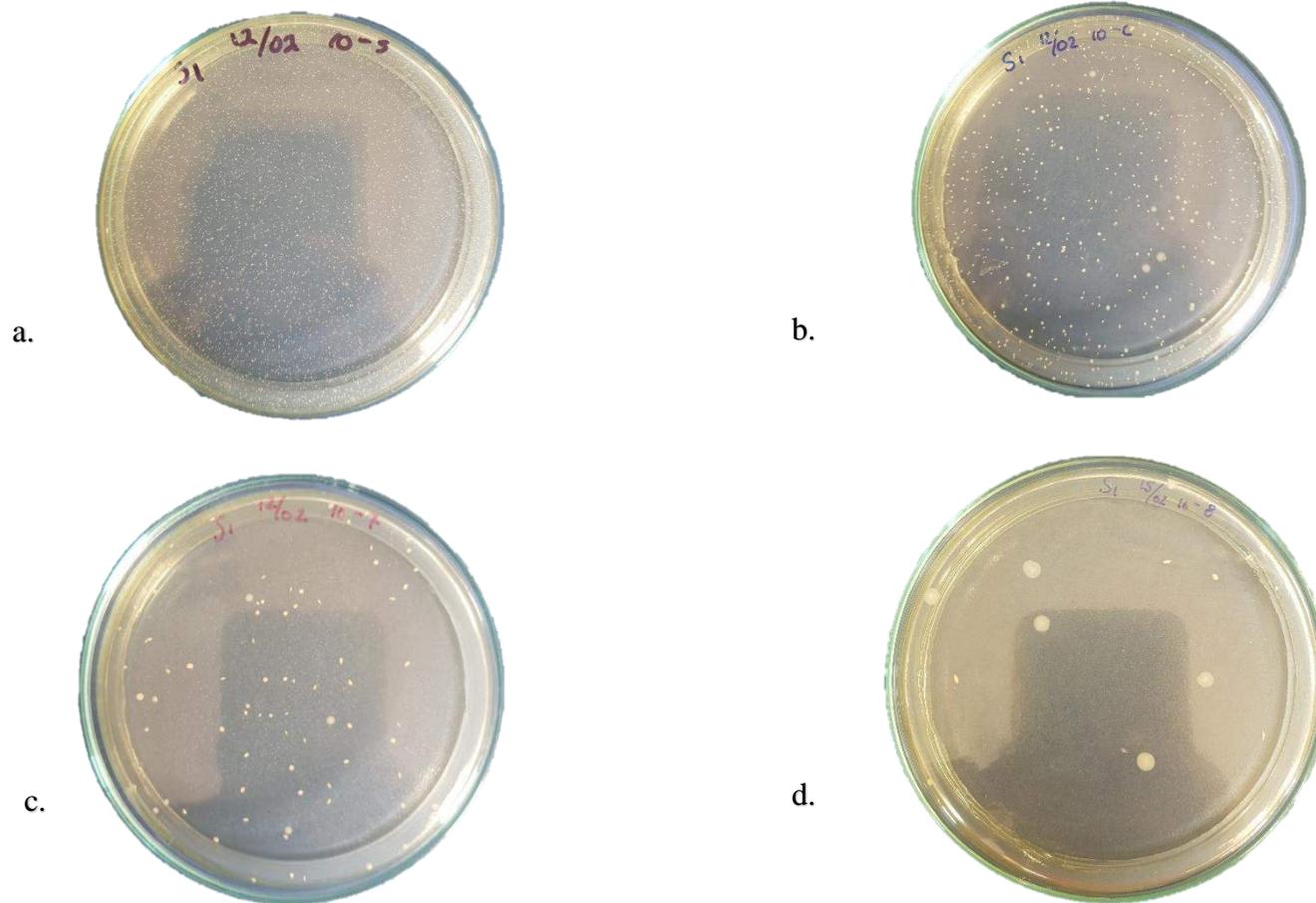
FERMENTACIÓN DEL LACTOSUERO CON *Streptococcus thermophilus* -TRATAMIENTO 1



- a. Recuento en placa de *Streptococcus thermophilus* factor de dilución  $10^{-5}$  (42 C, 7mg/L)
- b. Recuento en placa de *Streptococcus thermophilus* factor de dilución  $10^{-6}$  (42 C, 7mg/L)
- c. Recuento en placa de *Streptococcus thermophilus* factor de dilución  $10^{-7}$  (42 C, 7mg/L)
- d. Recuento en placa de *Streptococcus thermophilus* factor de dilución  $10^{-8}$  (42 C, 7mg/L)

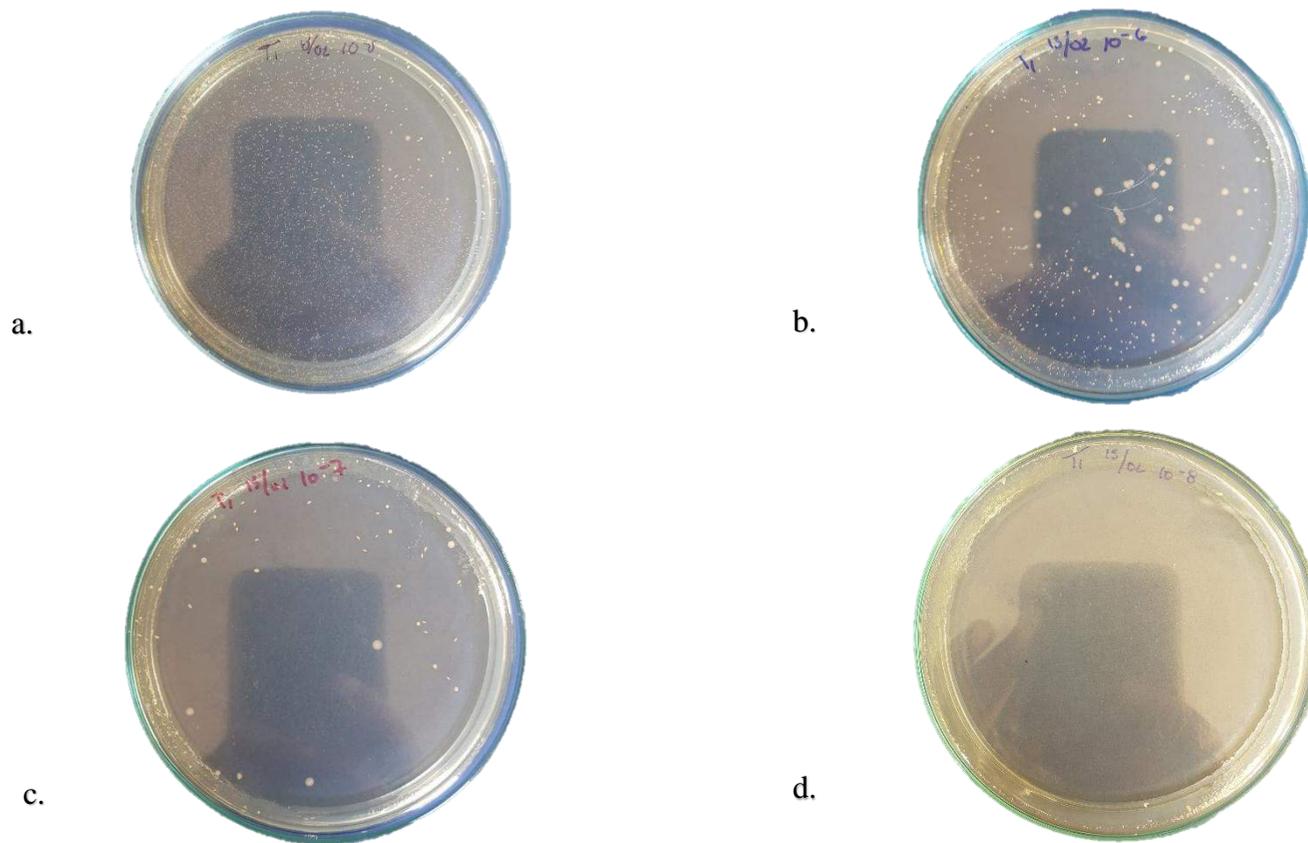
Continuar pág. Siguiete

FERMENTACIÓN DEL LACTOSUERO CON *Streptococcus thermophilus* -TRATAMIENTO 2



- a. Recuento en placa de *Streptococcus thermophilus* factor de dilución  $10^{-5}$  (42 C, 7mg/L)
- b. Recuento en placa de *Streptococcus thermophilus* factor de dilución  $10^{-6}$  (42 C, 7mg/L)
- c. Recuento en placa de *Streptococcus thermophilus* factor de dilución  $10^{-8}$  (42 C, 7mg/L)
- d. Recuento en placa de *Streptococcus thermophilus* factor de dilución  $10^{-7}$  (42 C, 7mg/L)

**FERMENTACIÓN DEL LACTOSUERO CON *Streptococcus thermophilus* -TRATAMIENTO 3**



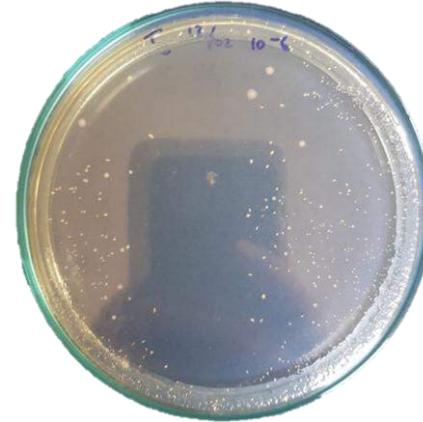
- a. Recuento en placa de *Streptococcus thermophilus* factor de dilución  $10^{-5}$  (45 C, 7mg/L)
- b. Recuento en placa de *Streptococcus thermophilus* factor de dilución  $10^{-6}$  (45 C, 7mg/L)
- c. Recuento en placa de *Streptococcus thermophilus* factor de dilución  $10^{-7}$  (45 C, 7mg/L)
- d. Recuento en placa de *Streptococcus thermophilus* factor de dilución  $10^{-8}$  (45 C, 7mg/L)

FERMENTACIÓN DEL LACTOSUERO CON *Streptococcus thermophilus* -TRATAMIENTO 4

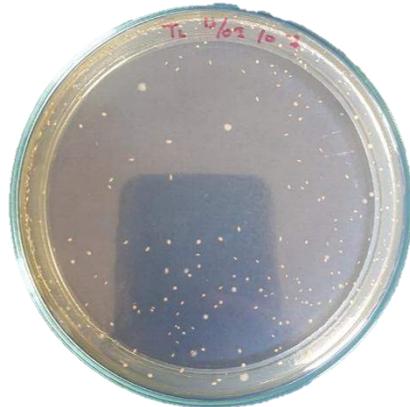
a.



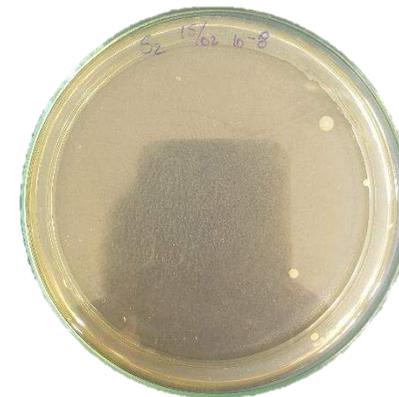
b.



c.



d.



- e. Recuento en placa de *Streptococcus thermophilus* factor de dilución  $10^{-5}$  (45 C, 9mg/L)
- f. Recuento en placa de *Streptococcus thermophilus* factor de dilución  $10^{-6}$  (45 C, 9mg/L)
- g. Recuento en placa de *Streptococcus thermophilus* factor de dilución  $10^{-7}$  (45 C, 9mg/L)
- h. Recuento en placa de *Streptococcus thermophilus* factor de dilución  $10^{-8}$  (45 C, 9mg/L)

**ANEXO H:** Recuento en placa de bacterias ácido lácticas del lactosuero fermentado con *Lactobacillus casei*

**FERMENTACIÓN DEL LACTOSUERO CON *Lactobacillus casei* -TRATAMIENTO 1**



a.



b.

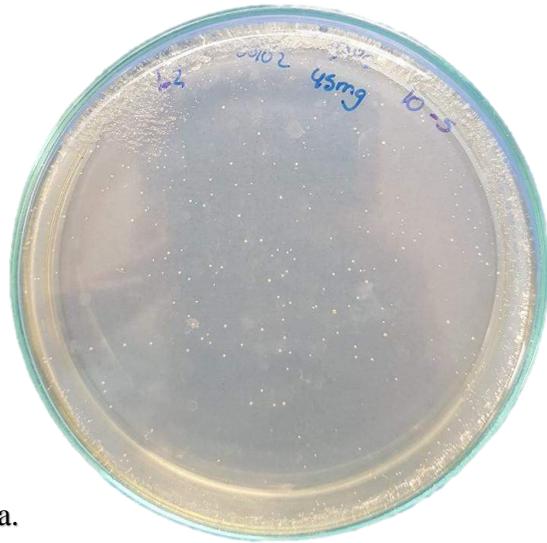


c.

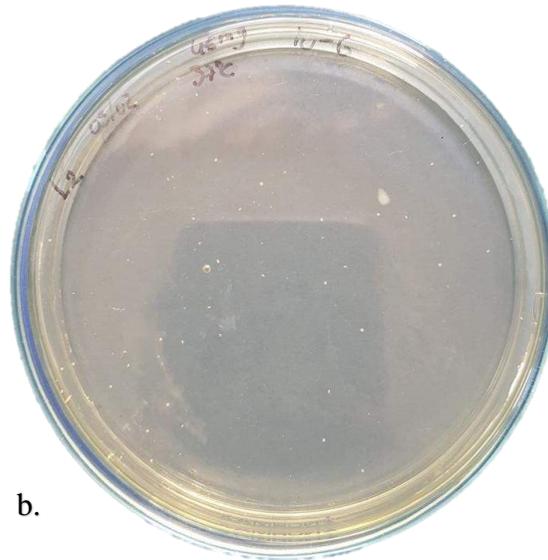
- a. Recuento en placa de *Lactobacillus casei* factor de dilución  $10^{-5}$  (37 C, 7mg/L)
- b. Recuento en placa de *Lactobacillus casei* factor de dilución  $10^{-6}$  (37 C, 7mg/L)
- c. Recuento en placa de *Lactobacillus casei* factor de dilución  $10^{-7}$  (37 C, 7mg/L)

Continuar pág. Siguiete

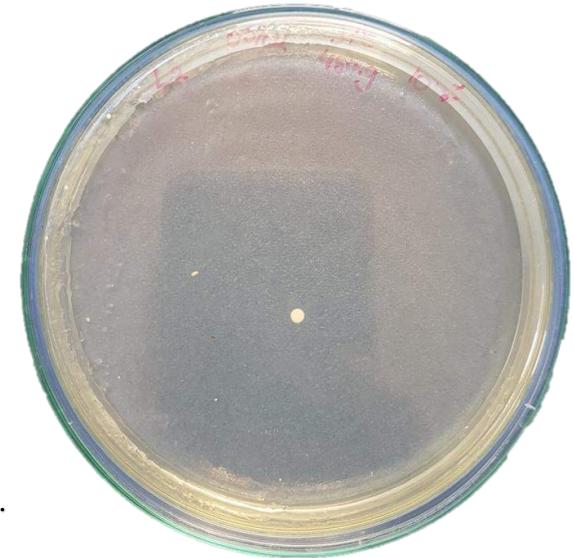
**FERMENTACIÓN DEL LACTOSUERO CON *Lactobacillus casei* -TRATAMIENTO 2**



a.



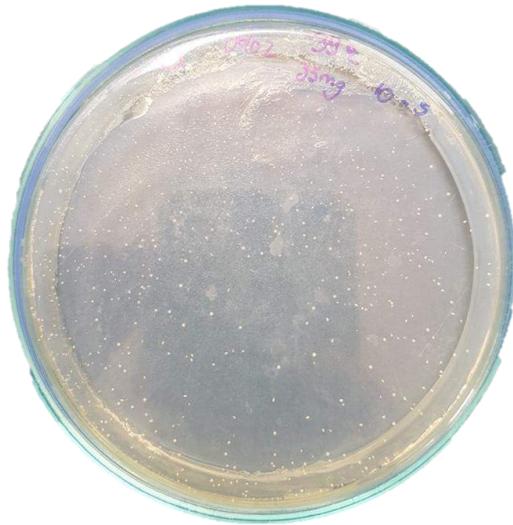
b.



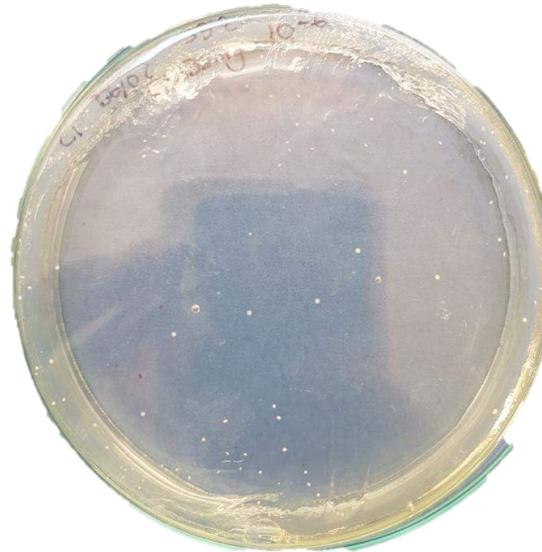
c.

- a) Recuento en placa de *Lactobacillus casei* factor de dilución  $10^{-5}$  (37 C, 9mg/L)
- b) Recuento en placa de *Lactobacillus casei* factor de dilución  $10^{-6}$  (37 C, 9mg/L)
- c) Recuento en placa de *Lactobacillus casei* factor de dilución  $10^{-7}$  (37 C, 9mg/L)

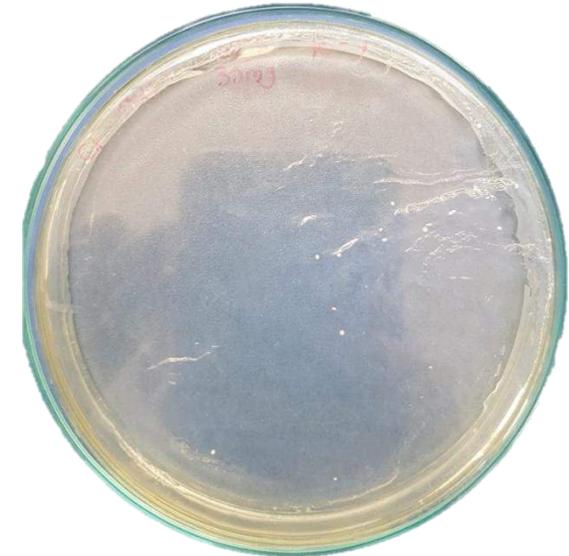
FERMENTACIÓN DEL LACTOSUERO CON *Lactobacillus casei* -TRATAMIENTO 3



a.



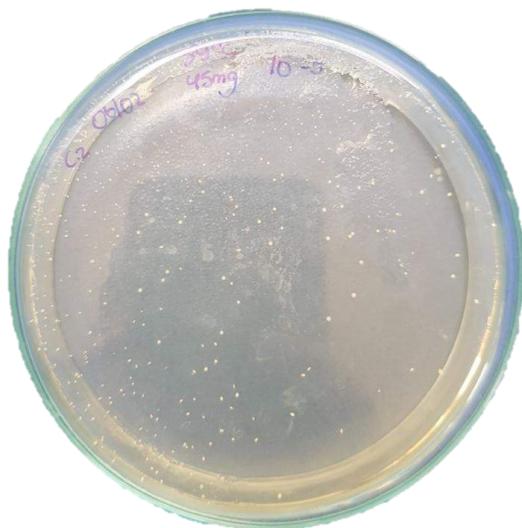
b.



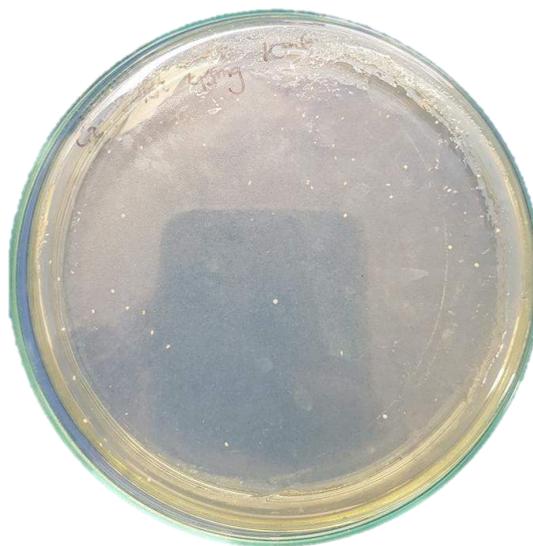
c.

- a. Recuento en placa de *Lactobacillus casei* factor de dilución  $10^{-5}$  (39 C, 7mg/L)
- b. Recuento en placa de *Lactobacillus casei* factor de dilución  $10^{-6}$  (39 C, 7mg/L)
- c. Recuento en placa de *Lactobacillus casei* factor de dilución  $10^{-7}$  (39 C, 7mg/L)

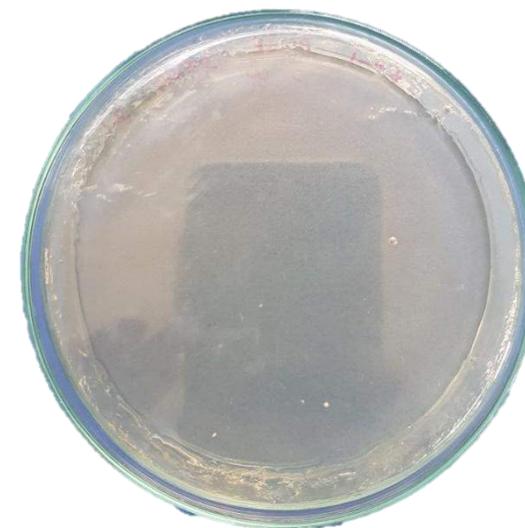
**FERMENTACIÓN DEL LACTOSUERO CON *Lactobacillus casei* -TRATAMIENTO 4**



a.



b.



c.

- a) Recuento en placa de *Lactobacillus casei* factor de dilución  $10^{-5}$  (39 C, 9mg/L)
- b) Recuento en placa de *Lactobacillus casei* factor de dilución  $10^{-6}$  (39 C, 9mg/L)
- c) Recuento en placa de *Lactobacillus casei* factor de dilución  $10^{-7}$  (39 C, 9mg/L)

**ANEXO I:** Preparación de las diluciones y sembrado en placa de las muestras



a.



b.

- a) Preparación de las diluciones
- b) Sembrado en placa

**ANEXO J:** Encuestas para determinar la aceptación del producto en el mercado



**ANEXO K:** Hoja de respuestas para la encuesta de aceptación del producto

**HOJA DE RESPUESTA**

Nombre: \_\_\_\_\_ FECHA: \_\_\_\_\_

Edad: \_\_\_\_\_

Producto: Bebida probiótica de lactosuero

**Instrucciones:**

Por favor pruebe las muestras en el orden que le indicamos: Primero la muestra 7508, segundo la muestra 4886, y finalmente, la muestra 2062.

Señale que bebida le ha gustado más: 7508 \_\_\_\_\_ 4886 \_\_\_\_\_ 2062 \_\_\_\_\_

Por favor denos su criterio respecto a la bebida de su preferencia sobre las siguientes características:

ATRIBUTO	ME GUSTA			NI ME GUSTA NI ME DISGUSTA			NO ME GUSTA		
	7508	4886	2062	7508	4886	2062	7508	4886	2062
COLOR									
CONSISTENCIA									
SABOR									
OLOR									

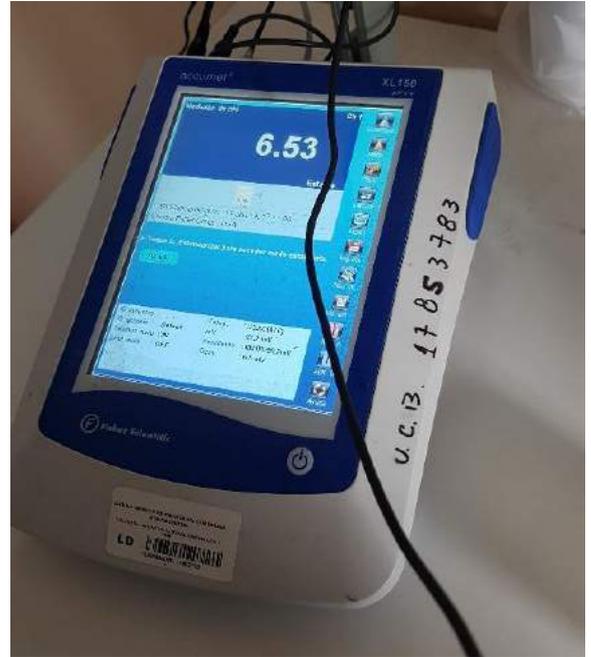
Comentarios:

---

---

¡Gracias por su participación!

**ANEXO L: Fermentación del lactosuero en el laboratorio de biotecnología de la Facultad de Ciencias de la ESPOCH-Control de pH**



**ANEXO M:** Fermentación del lactosuero en el laboratorio de biotecnología de la Facultad de Ciencias de la ESPOCH



**ANEXO N:** Toma de muestras de lactosuero en la Planta Láctea JB



ANEXO O: Propuesta de etiqueta para la bebida probiótica

