UNIVERSIDAD TÉCNICA FEDERICO SANTA MARIA
SEDE VIÑA DEL MAR – JOSÉ MIGUEL CARRERA

DETERMINACIÓN DE LA VIDA ÚTIL DE UN ALIMENTO PROCESADO, YOGHURT SIN LACTOSA

Trabajo de Titulación para optar al Título de Técnico Universitario en CONTROL DE ALIMENTOS

Alumno
Francisca Soledad Lavillauroy Estay
Débora Lucia Morales Obregón

Profesor Guía
Miguel Zazopulos Garay

Profesor Correferente
Cecilia Leon

2017

RESUMEN

KEYWORDS: YOGHURT, VIDA UTIL, LACTOBACILLUS BULGARICUS.

Los alimentos sin lactosa mejoran la salud de aquellas personas las cuales tienen intolerancia a esta azúcar que es propiamente tal de los productos lácteos, y es descompuesta en los azúcares simples galactosa y glucosa, este proceso se realiza por una enzima llamada lactasa, y que tiene origen en la mucosa intestinal. Algunas personas carecen de esta enzima o se encuentra en cantidades tan bajas que no pueden digerir la leche y sus derivados.

Uno de los primeros productos lácteos sin lactosa en salir al mercado fue el yoghurt, una solución para aquellas personas con esta intolerancia, por lo cual no necesitan renunciar al sabor, propiedades nutritivas de la leche y sus derivados.

El presente trabajo está orientado a la determinación de la vida útil real del yoghurt sin lactosa mediante análisis microbiológico en el cual se realiza un seguimiento del aumento de la población de los microorganismos propios de los productos lácteos (Lactobacilus *bulgaricus*) a través de la metodología de dilución y plaqueo que entrega un resultado cualitativo por diversas causas que afectaron la muestra (UFC/g > 250); análisis físico/químicos para la medición de la actividad de agua a través de Higrómetro electrónico en el cual se mantuvo una Aw relativamente constante a lo largo del tiempo; análisis organolépticos donde según nuestro criterio como analistas determinamos la condición del producto en cuanto sabor, olor y apariencia; y análisis químicos para determinar el aumento de acidez del producto utilizando el método de titulación acido-base, que aproximadamente se incrementa un 0,2 % desde la 4 hasta la 7 semana, cumpliendo con lo establecido por el CODEX. El análisis finalizó el día 30 de noviembre, a esta fecha se le resta un día y es la que corresponde a su vida útil total coincidiendo con la fecha señalada en el envase (29 de noviembre 2016).

ÍNDICE

RESUMEN

SIGLAS Y SIMBOLOGÍA

INTRODUCCION

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

OBJETIVOS ESPECIFICOS

CAPITULO 1: ANTECEDENTES GENERALES

1.1. CONCEPTO VIDA UTIL

1.2. YOGHURT

1.2.1. Descripción del proceso

1.2.2. Control de calidad

1.3. MICROORGANISMOS FERMENTADORES

1.3.1. Lactobacillus bulgaricus:

1.3.2. Streptococcus thermophilus

1.4. ASPECTOS ANALITICOS

1.4.1. Aspectos físico-químicos

1.4.2. Aspectos sensoriales

1.4.3. Aspectos microbiológicos

CAPITULO 2: PARTE EXPERIMENTAL

2.1. EQUIPOS, REACTIVOS Y MATERIALES

2.1.1. NaOH 0,1N estandarizado

2.1.2. 100ml biftalato de potasio 0,1N

2.1.3. Fenolftaleína al 1%

2.1.4. Medio MRS

2.1.5. Agua peptonada 0,1%

2.1.6. Solución Tampón fosfato pH 7

2.2. DISEÑO EXPERIMENTAL

2.2.1. Tratamiento de la muestra

2.2.2. Análisis físico-químicos:

2.2.3. Análisis microbiológicos

2.2.4. Análisis organoléptico

2.3. EXPRESIÓN DE RESULTADOS

2.3.1. Análisis físico-químicos

2.3.2. Análisis microbiológicos
2.3.3. Análisis organoléptico
2.3.4. Análisis estadístico

CAPITULO 3: RESULTADOS
3.1. VARIACIÓN DE ACIDEZ EN EL TIEMPO
3.2. VARIACIÓN DE LA ACTIVIDAD (AW) DE AGUA EN EL TIEMPO
3.3. RECUENTO DE BACTERIAS ACIDO LÁCTICAS.
3.4. ANÁLISIS ORGANOLÉPTICO

DISCUSIÓN
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES
BIBLIOGRAFIA
ANEXOS
ANEXO A: DESARROLLO DE CÁLCULOS
ANEXO B: ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO
ANEXO C: COMPOSICIÓN ESENCIAL Y FACTORES DE CALIDAD CODEX ALIMENTARIUS, FAO
ANEXO D: REALIDAD DEL YOGURT "SIN LACTOSA"

ÍNDICE DE DIAGRAMAS

Diagrama 1-1. Diagrama de flujo de la elaboración del yoghurt según la FAO

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1-1. Molécula de ácido láctico, poliácido láctico
Figura 2-1. Muestras analíticas
Figura 3-1. Hongos muestra en condiciones de abuso día 19
Figura 3-2. Hongos muestra en condiciones de abuso día 24
Figura 3-3. M5, formación de gas al interior de la muestra
Figura 3-4. M4, apariciones de levadura en la muestra
Figura 3-5. M3 1° cultivo
Figura 3-6. M3 3° cultivo

Figura 3-7. M3 5° cultivo
Figura 3-8. M3 9° cultivo

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1-1. Curva de crecimiento bacteriano teórica
Gráfico 3-1. Acidez vs tiempo
Gráfico 3-2. Variación de acidez de la muestra en condiciones de abuso a lo largo del tiempo
Grafico 3-3. Aw de agua vs tiempo de análisis para la muestra número 1

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 3-1. Resumen porcentaje de acidez en el tiempo para cada muestra
Tabla 3-2. Actividad de agua para cada muestra a lo largo del tiempo
Tabla 3-3. Resumen recuento de colonias de Lactobacillus Dilución ½
Tabla 3-4. Resumen recuento de colonias de Lactobacillus Dilución 10^{-1}
Tabla 3-5. Análisis organoléptico Día 1 (24-Oct-2016)
Tabla 3-6. Análisis organoléptico Día 5 (28-Oct-2016)
Tabla 3-7. Análisis organoléptico Día 10 (02-Nov-2016)
Tabla 3-8. Análisis organoléptico Día 15 (07-Nov-2016)
Tabla 3-9. Análisis organoléptico Día 19 (11-Nov-2016)
Tabla 3-10. Análisis organoléptico Día 24 (16-Nov-2016)
Tabla 3-11. Análisis organoléptico Día 29 (21-Nov-2016)
Tabla 3-12. Análisis organoléptico Día 33 (25-Nov-2016)
Tabla 3-13. Análisis organoléptico Día 38 (30-Nov-2016)

SIGLAS Y SIMBOLOGÍA

%	:	porciento
°C	:	grados Celsius
Aw	:	actividad de agua
BAL	:	Bacterias ácido Lácticas
Etc	:	Etcétera
Ff	:	fenolftaleína
g	:	gramos
H	:	hidrogeno
Hr	:	hora/s
Kg	:	kilogramos
M	:	muestra
mg	:	miligramos
Min	:	minuto/s
N	:	Normal
Na+	:	Sodio
NaOH	:	hidróxido de sodio
O	:	oxigeno
OH-	:	hidróxido
pH	:	Coeficiente que indica el grado de acidez o basicidad de una solución acuosa.
RSA	:	Reglamento sanitario de los alimentos
UFC	:	unidad formadora de colonias
UFC	:	unidades formadoras de colonias
µm	:	micrómetro

INTRODUCCIÓN

La vida útil de un alimento hace alusión al periodo de tiempo que transcurre entre la producción o el envasado del producto alimenticio y el punto en el cual el alimento pierde sus características organolépticas y/o físico-químicas. Cada empresa alimentaria es la encargada de determinar la vida útil de su producto. Esta información debe ser ubicada en el envase en un lugar fácil de localizar y con una leyenda destacada, tanto para la fecha de elaboración con su lote establecido y para la fecha de caducación.

La determinación de la vida útil de un alimento se basa en una serie de análisis diferentes (químicos, físicos, organolépticos, etc.) para cada producto durante un tiempo determinado, cumpliendo con los límites y parámetros establecidos, garantizando un producto inocuo y de óptima calidad para el consumidor.

Desde el ámbito nutricional, los lácteos son parte fundamental en la alimentación tanto para infantes como adultos, por su elevado aporte nutritivo de vitaminas y minerales. El ministerio de salud de nuestro país recomienda el consumo diario de 3 porciones de lácteos, y la falta de estos podría producir varios problemas de salud como la falta de calcio, vitamina D, riboflavina y proteínas, por lo cual es relevante introducir los lácteos en la ingesta diaria.

El yoghurt sin lactosa, es un lácteo cuya azúcar se ha hidrolizado previamente, pensando en aquellas personas intolerantes a la lactosa para que no pierdan las propiedades nutritivas que entrega este producto.

La lactosa es un disacárido presente en las leches de los mamíferos y puede encontrarse en alimentos preparados. Es el llamado azúcar de la leche (C_{12}, H_{22}, O_{11}), disacárido natural compuesto de glucosa y galactosa. Para un alto porcentaje de la población esta azúcar es dañina debido a que en los mamíferos adultos se encuentra ausente la enzima encargada de descomponer la lactosa, la lactasa (enzima producida por el intestino delgado), y que juega un papel vital en nuestro organismo causando molestias estomacales.

La intolerancia a la lactosa es determinada principalmente por la genética, la cual es hereditaria y permanece toda la vida en algunas personas, produciéndose o activándose desde aproximadamente los 6 años de edad. Su aparición aumenta en la vida adulta y su prevalencia varía entre distintas etnias. Tiene origen en un gen que rechaza la lactosa y se identifica especialmente en la población en que los productos lácteos no existían (América Precolombina y ciertas regiones de Asia), a diferencia de Europa donde los productos lácteos tienen su origen.

Hoy en Chile esta condición afecta aproximadamente al 60% de la población hispana y un 80% de la población de ascendencia mapuche. [A]

Respecto a los antecedentes presentados, el objetivo es determinar la vida útil real del yoghurt sin lactosa comparando dos tipos de condiciones de almacenamiento (temperatura ambiente y refrigeración), por un periodo de tiempo aproximado a la vida útil entregada por la empresa alimentaria, como objetivos específicos se anhela evaluar las condiciones organolépticas y aumento de acidez del yoghurt sin lactosa por un periodo de tiempo determinado, realizar un seguimiento en el aumento de la población de bacterias lácticas Lactobacillus *bulgaricus*.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Identificar y determinar la vida útil verdadera de un alimento procesado (yoghurt sin lactosa).

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1) Evaluar las condiciones organolépticas y aumento de acidez del yoghurt sin lactosa por un periodo de tiempo determinado.
2) Seguimiento en el aumento de población de Lactobacillus *bulgaricus* para la determinación de vida útil en el yoghurt sin lactosa.

CAPITULO 1: ANTECEDENTES GENERALES

1. ANTECEDENTES GENERALES:

Existen pruebas de la elaboración de productos lácteos en culturas que existieron hace más de 4500 años. Los primeros yoghurts fueron probablemente de fermentación espontánea, quizá por la acción de alguna bacteria del interior de las bolsas de piel de cabra usadas como recipientes de transporte.

Las bacterias Lactobacillus *bulgaricus* y Streptococcus *thermophilus*, responsables de la fermentación de la leche, ya eran conocidas en los años 6000 o 7000 a. C., por los tracios que vivían en la actual Bulgaria. Fueron ellos quienes las utilizaron para inducir la fermentación de la leche de oveja y de esa forma obtener yoghurt, queso, etc. Dichos productos son los primeros alimentos probióticos en el mundo. Existen estudios científicos que acreditan que hace 4000 años, en territorio de la actual Bulgaria, los Tracios ya estaban familiarizados con los probióticos.

El reconocido científico ruso, fundador de la ciencia de la inmunología y premio Nobel, Iliá Méchnikov, describe el yoghurt como un excelente agente antienvejecimiento. La bacteria láctica que contiene éste, ataca, bloquea y neutraliza las toxinas, depurando el organismo.

La bacteria causante de la fermentación láctica fue descubierta en 1903 por el doctor búlgaro Stamen Grigoroff, quien publicó y presentó su trabajo científico dedicado al yoghurt ante el Instituto Pasteur de París en Francia. En su honor, la nueva bacteria descubierta fue llamada inicialmente *Bacterium bulgaricum Grigoroff*, aunque después pasó a denominarse Lactobacillus *bulgaricus*. La bacteria, como afirmaba el científico, bloquea la proliferación de otras bacterias patógenas, con lo que retrasa el proceso de envejecimiento del organismo humano. Lo más sorprendente es que el Lactobacillus *bulgaricus* desarrolla dichas cualidades y características solo en el territorio de Bulgaria. Trasladada a otras latitudes, la bacteria se transforma y, aunque el yoghurt obtenido con esa misma bacteria tiene un sabor similar al búlgaro original, sus propiedades no son las mismas, perdiendo incluso su capacidad para retrasar el proceso de envejecimiento. Por consiguiente, se hace necesaria la adquisición del agente fermentador búlgaro original.

El yoghurt permaneció durante muchos años como comida propia de India, Asia Central, Sudeste Asiático, Europa Central, Europa del Este y Turquía hasta los años 1900, cuando un biólogo ruso llamado Elías Méchnikov expuso su teoría, la cual consistía en que el gran consumo de yoghurt era el responsable de la alta esperanza de vida de los campesinos búlgaros. Considerando que los lactobacilos eran esenciales para una buena salud, Mechnikov trabajó para popularizar el yoghurt por toda Europa. Otros

investigadores también realizaron estudios que contribuyeron a la extensión de su consumo.

Cuando los asentamientos humanos se hicieron estables, surgió la necesidad de guardar parte de las cosechas y provisiones, para prevenir la escasez en caso de que haga falta. Se conocen técnicas muy rudimentarias desarrolladas en ocasiones por fruto de la casualidad que tenían como principios el aire, el sol, la sal, el fuego y el hielo, que conseguían conservar por espacios más prolongados la vida de los alimentos. Las primeras técnicas fueron las de salazón, ahumado recubrimiento de frutas y verduras con cera y miel, las cuales conservaban mejor y más frescos los productos durante semanas.

Durante la Edad Media se presentaron intoxicaciones masivas por consumo de pan de centeno contaminado con Claviceps *purpúrea*, un hongo contaminante del cereal.

En 1658, A. Kirchner, al examinar alimentos en descomposición fue quizás el primero que advirtió cual era el papel de los microorganismos en la alteración de los alimentos. Consideró que la variación obedecía a la presencia de gusanos, vermículos o animáculos invisibles a la vista. Pero la gran revolución en la conservación de los alimentos se produce a principios del siglo XVIII en Francia, de la mano de un cocinero, confitero e inventor llamado Nicolas Appert, quien inventó un procedimiento térmico para conservar los alimentos al resguardo del oxígeno, mediante envases de vidrio o enlatados.

En 1880, Pasteur explica científicamente el fundamento de este método de conservación, dando a conocer la existencia de los microorganismos causantes de la alteración de los alimentos. Este método también se conoce como pasteurización.

En la segunda mitad del siglo XX se desarrolla una nueva industria, donde se fabrican nuevas sustancias que, añadidas a los métodos tradicionales, pueden conservar los alimentos durante décadas: los conservantes. El códice alimentario registra en la actualidad más de 5.000 sustancias, que conservan o alteran las características organolépticas de los alimentos.

En general la vida útil de los alimentos es muy limitada, en cuanto no se le aplique un sistema de conservación. Actualmente, los procesos tecnológicos aplicados a los alimentos tienen como preferencia aumentar la vida útil de dichos productos, pueden ser envases inteligentes, envasado al vacío, calentamiento, etc. Y así evitar problemas a la salud del consumidor debido al deterioro de los alimentos.

1.1. CONCEPTO VIDA ÚTIL

La vida útil de un alimento es el periodo en el que puede mantenerse en condiciones de almacenamiento especificadas sin que pierda su seguridad y calidad óptimas. La vida útil de un alimento empieza desde el momento en que se elabora y depende de muchos factores como el proceso de fabricación, el tipo de envasado, las condiciones de almacenamiento y los ingredientes.

Normalmente se indica en una etiqueta del alimento con información sobre la fecha de consumo máximo preferente o la fecha de caducidad.

1) Una fecha de consumo máximo preferente refleja el periodo durante el cual cabe esperar, de forma razonable, que un alimento conserve su mejor calidad, como, por ejemplo, el sabor. Entre los alimentos que tienen una fecha de consumo máximo preferente se incluyen los alimentos enlatados, los deshidratados y los congelados.

2) Una fecha de caducidad es el periodo durante el cual cabe esperar, de forma razonable, que un alimento resulte seguro para su consumo si se guarda respetando las condiciones de almacenamiento especificadas. Por lo tanto, estos alimentos pueden presentar un riesgo de intoxicación si se consumen después de la fecha de caducidad. Entre los alimentos que tienen fechas de caducidad se incluyen los productos lácteos refrigerados, las carnes cocinadas y las ensaladas preparadas.

Los fabricantes de productos alimenticios tienen la responsabilidad de determinar la vida útil y etiquetar sus productos consecuentemente. Esto incluye las condiciones de almacenamiento necesarias para cumplir con ese tiempo de vida útil, por ejemplo, especificando que se debe “guardar en la nevera una vez abierto”.

Por lo general, la vida útil se define durante la elaboración de un alimento. Inicialmente, el fabricante determina las características (intrínsecas y extrínsecas) del alimento que afectan a su seguridad y/o calidad. Estas características incluyen los ingredientes utilizados, el proceso de elaboración, el tipo de envasado —como el envasado al vacío o el envasado en una atmósfera modificada, utilizados a veces para prolongar el tiempo de vida útil de un producto— y las condiciones de almacenamiento en las que se venderá el producto. Si es necesario, el fabricante también puede llevar a cabo otros estudios como tomas de muestras y análisis microbiológicos.

La determinación de la vida útil es una parte integral de los sistemas de control de seguridad de los alimentos que lleva a cabo el fabricante. Como parte de los exámenes periódicos de estos sistemas, el fabricante valida la vida útil. Esto es especialmente importante cuando se modifican los productos, las plantas de producción o los equipos de producción.

1.2. YOGHURT

El yoghurt es un producto lácteo fermentado que resulta del desarrollo de dos bacterias termófilas: Streptococcus *thermofilus* y Lactobacillus *bulgaricus.* La primera es una bacteria láctica y proporciona la acidez característica del yogurt. La segunda es otra bacteria láctica que se encarga de dar el aroma característico del yoghurt. Según la textura final del yogurt puede ser aflanado (aspecto gelatinoso) o liquido (bebible).

La definición que establece la legislación es la siguiente:

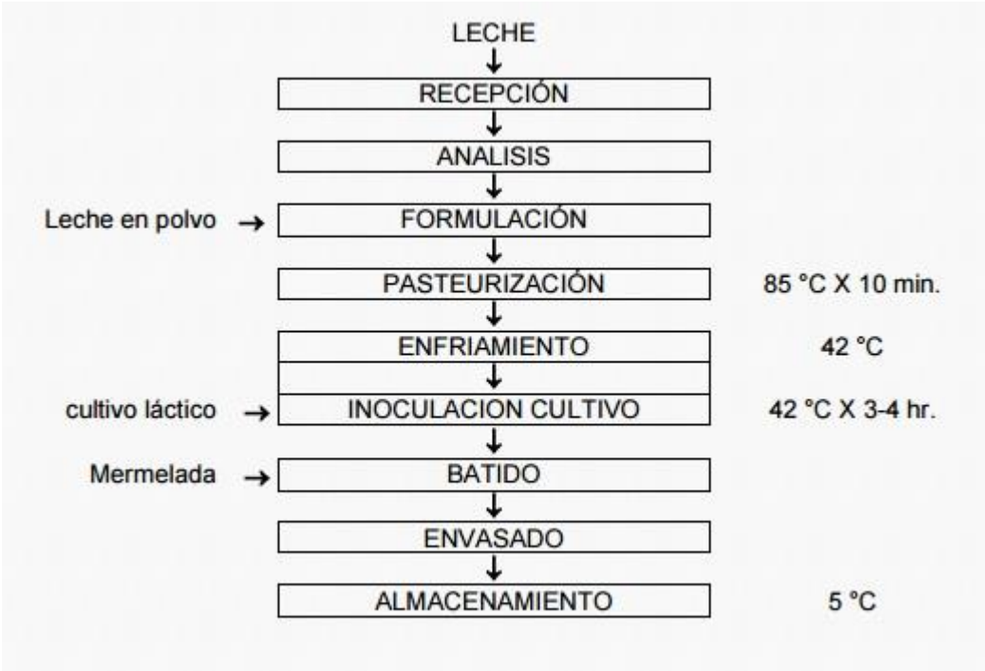
"Yogurt es el producto lácteo coagulado obtenido por fermentación láctica mediante la acción de Lactobacillus *bulgaricus* y Streptococcus *thermophilus*, a partir de leches pasteurizadas enteras, parcialmente descremadas o descremadas, leches en polvo enteras, parcialmente descremadas o descremadas o una mezcla de estos productos.

En su elaboración se podrá adicionar: a) ingredientes aromatizantes naturales : frutas (fresca, en conserva, congelada, en polvo, puré, pulpa, jugo), cereales, miel, chocolate, cacao, nueces, café, especias y otros aromatizantes autorizados; b) azúcares y/o edulcorantes autorizados de acuerdo a lo señalado en el artículo 146 del presente reglamento de los alimentos en Chile; c) aditivos alimentarios autorizados: aromatizantes, colorantes, estabilizantes y como preservante ácido sórbico y sus sales de sodio y potasio, cuya dosis máxima será de 500 mg/kg expresada como ácido sórbico. d) Cultivos de bacterias adecuadas productoras de ácido láctico." [A.B]

Por otra parte, la legislación indica además que "Los microorganismos lácticos presentes en el producto final deberán ser viables y en cantidad superior a 10^6 UFC/g." [A.B]

1.3. ELABORACIÓN DEL YOGHURT

El proceso consiste en ajustar el contenido de sólidos, pasteurizar la mezcla, enfriar hasta 42°C, luego agregar la mezcla del cultivo láctico e incubar por tres horas hasta alcanzar una acidez de 0.7%, para que en el cuarto frío llegue a 0.85 - 0.90 %. Antes de llenar en los envases se puede agregar frutas en forma de mermelada.



Fuente: Imágenes procesado de lácteos. FAO.

Diagrama 1-1. Diagrama de flujo de la elaboración del yoghurt según la FAO [P]

1.2.1. Descripción del proceso

a) Recepción:

La leche que es de buena calidad se pesa, para conocer cuánto entrará al proceso. La leche se filtra a través de una tela fina para eliminar cuerpos extraños.

b) Análisis:

La leche debe ser sometida a un análisis para ver si es buena para el proceso. Deben hacerse pruebas de acidez, porcentaje de grasa, antibiótico y sensorial.

c) Formulación:

La leche se estandariza al 2% de grasa y se agrega 3% de leche en polvo descremada para aumentar el contenido de sólidos totales que contribuyen con la consistencia final del yoghurt.

d) Pasteurización:

La mezcla se pasteuriza a 85°C durante 10 minutos. Luego se enfría a 42°C, haciendo circular agua fría.

e) Enfriamiento:

Se deja enfriar al ambiente, para evitar el desuerado.

f) Inoculación del cultivo láctico:

Se agrega un 2% de cultivo. También se puede agregar entre 2 a 3 % de un yoghurt natural si no se cuenta con cultivo madre. Cuando se agrega el cultivo debe

agitarse lentamente. El cultivo láctico puede adquirirse comercialmente y una vez iniciado el proceso pueden mantenerse cultivos propios, o comprarlos cada vez que sea necesario.

g) Incubación:

Se hace a baño maría con una temperatura de 42 °C, por un tiempo de 3 a 4 horas, o hasta que la acidez haya alcanzado 0.70%. En este tiempo la leche se coagula como un flan, evitando el desprendimiento de suero.

h) Batido:

Se hace agitándolo lentamente para homogenizarlo, aquí se le puede agregar 10 a 15% de mermelada de frutas en proporción 50:50 fruta: azúcar. También se le puede agregar color y sabor artificial.

i) Envasado:

Se vierte en frascos de vidrio o plástico, luego debe ser refrigerado por un tiempo que no exceda los 7 días. Los envases deben ser esterilizados previamente en agua caliente por un tiempo de 15 minutos.

1.2.2. Control de calidad

Cabe señalar que el producto debe responder a un control de calidad el cual posee 3 puntos de control:

a) Materia Prima:

Debe usarse leche con la acidez adecuada (no mayor de 0.18%) y sin agregar agua. La leche debe estar libre de impurezas.

b) Proceso:

Mantener muy buenos hábitos de higiene personal y de equipo. Dar los tiempos y temperaturas recomendadas durante el proceso. El cultivo madre agregado en una proporción mayor a la indicada puede generar un sabor amargo.

c) Producto Final:

El producto debe tener un color uniforme, no debe tener mal sabor u olor y debe presentar una textura homogénea. El no realizar un proceso adecuado puede provocar un yoghurt con separación de sólidos y suero.

1.3. MICROORGANISMOS FERMENTADORES

1.3.1. Lactobacillus *bulgaricus*:

a) Morfología:

Se presenta en forma de bacilos alargados con la punta redondeada, separados o formando cadenas. El tamaño medio en la leche es de 0,8-1 µm de ancho y 4-6 µm de largo.

b) Ecología:

La leche y los productos lácteos.

c) Metabolismo:

Es homofermentativa. En la leche produce 1,7% de ácido láctico D (-). Además de ácido láctico, produce pequeñas cantidades de otros productos como los ácidos grasos volátiles: acético, propiónico, butírico, isovalérico, acetoína, aldehído, acetona y 2-butanona.

Presenta una actividad proteolítica mediana, pero importante por la liberación que supone de aminoácidos libres.

d) Temperatura de crecimiento:

Es una bacteria termófila. Su temperatura optima de crecimiento es 40-43°C, la mínima de 15°C y la máxima de 52°C (algunas cepas crecen hasta 60°C). Aunque no se considera una bacteria termodúrica, algunas cepas aguantan temperaturas de 75°C durante 20-30 min.

1.3.2. Streptococcus *thermophilus*

e) Morfología:

Se presenta en forma de células esféricas u ovoides de 0,7 a 0,9 µm de diámetro unidas en parejas o largas cadenas, según la temperatura de crecimiento y el medio de cultivo.

f) Ecología:

La leche y los productos lácteos.

g) Metabolismo:

Es homofermentativa. En la leche produce 0,7-0,8% ácido láctico L (+), algunas cepas son capaces de producir hasta un 1% de ácido láctico. No produce amoniaco a partir de la arginina, ni metaboliza el citrato. Algunas cepas son capaces de producir polisacáridos que forman un mucilago, lo cual es interesante para la viscosidad del yoghurt.

En la leche, además de ácido láctico, produce los ácidos grasos volátiles: fórmico, acético, propiónico, butírico, isovalérico y caproico, además produce acetoina y pequeñas cantidades de acetaldehído.

Presenta una actividad proteolítica muy pequeña en la leche y la mayoría de aminoácidos liberados son consumidos durante la fase de crecimiento logarítmico.

h) Temperatura de crecimiento:

Es una bacteria termófila. Su temperatura óptima de crecimiento es de 42-45°C, la mínima de 10°C y la máxima de 50°C. También es una bacteria termodurica, aguanta un tratamiento de calor en la leche de 30 min a 60°C.

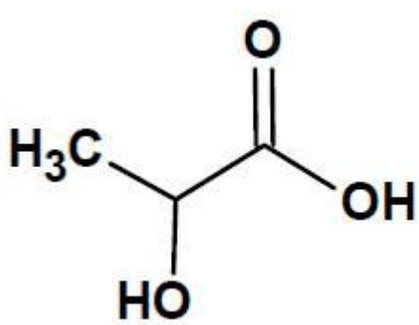
1.4. ASPECTOS ANALÍTICOS

1.4.1. Aspectos físico-químicos

A medida que pasa el tiempo, en el yoghurt tienen lugar diferentes procesos bioquímicos que pueden provocar algunos cambios indeseables sobre sus características físico-químicas, entre los que se encuentran:

a) Disminución del pH y aumento de la acidez:

La actividad de las bacterias ácido lácticas que están presentes en el yoghurt es muy baja a temperaturas de refrigeración, pero aún siguen vivas y continúan transformando la lactosa en ácido láctico, lo que provoca una disminución del pH y un aumento de la acidez (se estima que tras unas 4-7 semanas, el aumento de la acidez es del orden del 0,2%). Sin embargo, como se tratará más adelante, esto no ocurre de forma indefinida.



Fuente: Tecnología de los plásticos

Figura 1-1. Molécula de ácido láctico, poliácido láctico [W]

b) Sinéresis:

El descenso del pH que se acaba de mencionar, hace que la matriz de proteínas que constituye la estructura del yoghurt reduzca su capacidad de retener agua. Es decir, se produce una separación de parte del agua que contenía el yoghurt. Esto se considera un defecto porque, entre otras cosas, supone un deterioro de la textura del producto y además influye negativamente sobre su aspecto. Por cierto, se debe tener en cuenta que la presencia de ese suero no indica necesariamente que el yoghurt se haya elaborado mucho tiempo atrás, ya que puede deberse a diferentes causas, como, por ejemplo, una agitación durante el transporte o un número demasiado elevado de bacterias ácido-lácticas.

c) Proteólisis:

Las bacterias ácido lácticas presentes en el yoghurt producen enzimas proteolíticas que hidrolizan las proteínas para dar como resultado péptidos y aminoácidos, lo que a la larga se traduce principalmente en un deterioro de la textura.

d) Lipolisis:

Este fenómeno es menos acusado que el anterior, pero también tiene su importancia. Además de enzimas proteolíticas, las bacterias ácido lácticas también producen enzimas lipolíticas que hidrolizan los lípidos, dando como resultado un aumento de la proporción de ácidos grasos de bajo peso molecular.

e) Oxidación lipídica:

El oxígeno presente puede provocar la oxidación de los lípidos, aunque este fenómeno normalmente no es muy acusado.

En resumen, teniendo en cuenta los cambios que acabamos de mencionar, los análisis físico-químicos que se llevan a cabo a lo largo del tiempo para determinar la fecha de duración de un yoghurt son principalmente: la determinación del pH y de la acidez, la medida de la textura y la medida del grado de sinéresis.

1.4.2. Aspectos sensoriales

Los procesos bioquímicos también producen cambios sobre las características organolépticas del yoghurt a medida que pasa el tiempo

a) Apariencia y textura:

Los procesos proteolíticos y el descenso del pH acaban deteriorando la red proteica que constituye la estructura del yoghurt, dando como resultado una pérdida de consistencia, una reducción de volumen y una salida de agua. En definitiva, efectos que se traducen en una apariencia poco deseable que puede provocar el rechazo del

consumidor. Además, el color puede verse alterado, sobre todo en la superficie del producto, debido a la oxidación lipídica.

b) Olor y sabor:

A medida que pasa el tiempo se producen varios cambios en el olor y el sabor del yoghurt, debidos principalmente a los productos resultantes del metabolismo de carbohidratos, proteínas y lípidos llevados a cabo por las bacterias ácido lácticas. Así, el ácido láctico producido en la fermentación hace que, tanto el olor, como el sabor del yoghurt, sean cada vez más ácidos. Además, los aminoácidos y ácidos grasos libres producidos como resultado de los fenómenos de proteólisis y lipólisis, respectivamente, junto con los fenómenos de lipooxidación, pueden acabar otorgando olores y sabores anómalos.

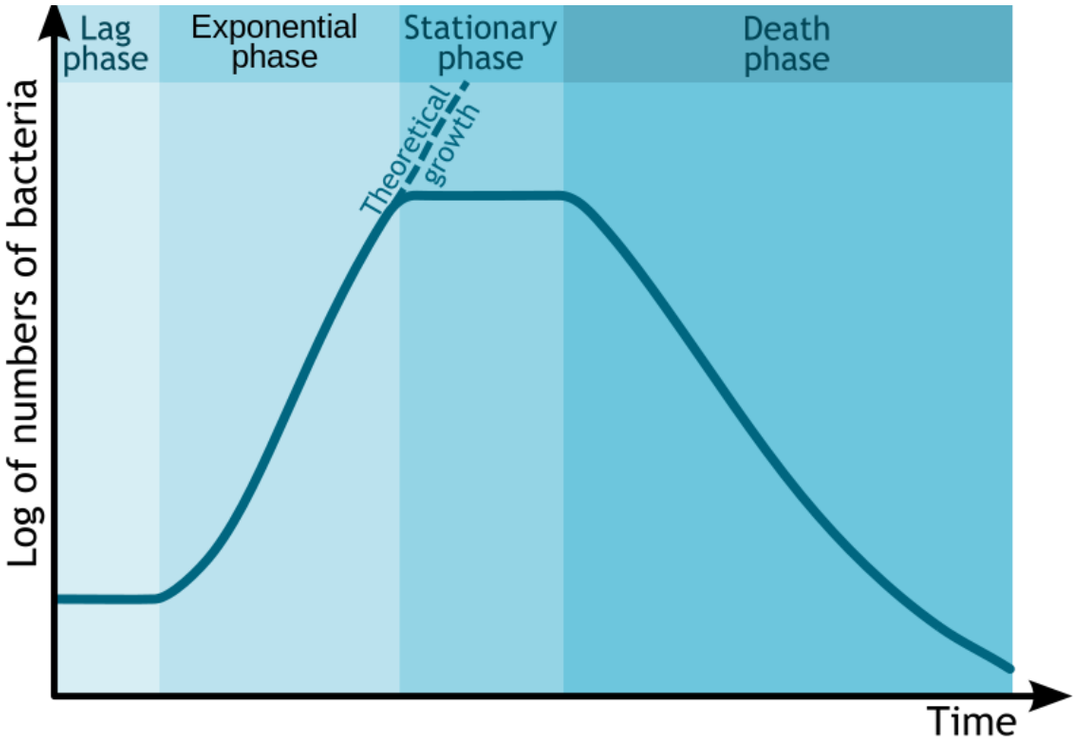
1.4.3. Aspectos microbiológicos

Como se menciona anteriormente, los aspectos microbiológicos son los que generalmente determinan la decisión a la hora de otorgar a un alimento una fecha de caducidad o una fecha de consumo preferente, ya que en ese sentido suelen ser los que pueden suponer un riesgo para la salud del consumidor. Ahora se sabe que para la elaboración del yoghurt se utiliza leche pasteurizada, así que los riesgos microbiológicos de los que podríamos hablar en un principio son básicamente:

1) Presencia de formas esporuladas que hayan resistido el tratamiento térmico (por ejemplo, bacterias de los géneros *Bacillus* o *Clostridium*).

2) Presencia de mohos, levaduras y bacterias patógenas, en el caso de que se produzca una contaminación accidental de la leche tras el tratamiento térmico. La contaminación por bacterias patógenas (Escherichia *coli*, Staphyllococcus *aureus*, etc.) se puede prevenir de forma relativamente sencilla con medidas higiénicas (en equipos, instalaciones, operarios, envases, etc.). Sin embargo, la contaminación por levaduras y mohos es más difícil de evitar (aunque no imposible), ya que estos se propagan por esporas que pueden estar presentes en el ambiente (no confundir con las formas esporuladas de las que acaban de nombrar). En definitiva, si bien es importante mantener medidas de higiene durante todo el proceso, esto es algo fundamental desde que la leche se pasteuriza hasta que se introduce en los envases y estos se cierran. (En cualquier caso, existen métodos de autocontrol para conocer si se ha podido producir esta contaminación).

1.4.3.1 Crecimiento de las bacterias acido lácticas (BAL)



Fuente: Wikipedia bacterial growth

Gráfico 1-1. Curva de crecimiento bacteriano teórica [A.J]

a) Fase de adaptación:

En un primer momento, las BAL deben adaptarse al medio y aún no son maduras, por lo que no tienen la capacidad de reproducirse. Este periodo es muy breve, ya que se utilizan cultivos seleccionados (capaces de desarrollarse con facilidad) y las condiciones son ideales para su crecimiento. En caso de que hubiera contaminación por otras bacterias, estas tampoco serían capaces de reproducirse, debido a que también deberían adaptarse a las nuevas condiciones del medio y, sobre todo, debido a que la competencia con las BAL, en número infinitamente superior, se lo impediría.

b) Fase de crecimiento exponencial:

Esta fase tiene lugar durante las primeras horas de incubación a unos 43ºC. Las BAL comienzan a reproducirse, aumentando en número de forma exponencial. La competencia bacteriana y el descenso de pH provocado por la fermentación de ácido láctico impiden el crecimiento de posibles bacterias contaminantes que pudieran estar presentes (por ejemplo, *Escherichia coli* sobreviviría menos de 24 horas).

c) Fase estacionaria:

Una vez formado el yoghurt, se reduce la temperatura hasta unos 5ºC. En torno a esos valores, que se mantienen durante todo el periodo de almacenamiento, la actividad de las bacterias es escasa. Apenas se reproducen, por lo que su número permanece estable, pero aún siguen con vida y desarrollando otras funciones metabólicas. La competencia bacteriana, los bajos valores de pH y las bajas temperaturas impiden el desarrollo de otras bacterias que pudieran estar presentes. Ahora bien, estas condiciones no impiden el crecimiento de levaduras y/o mohos (en el caso de estar presentes), que podrían acabar desarrollándose a medida que pasa el tiempo.

d) Fase de muerte:

Tras las primeras semanas de almacenamiento el número de BAL comienza a descender debido a que las condiciones del medio les impide seguir desarrollándose: la lactosa que les permite obtener energía es cada vez más escasa, ya que la han ido transformando en ácido láctico. Además, la acumulación de este ácido provoca una disminución del pH que puede limitar su crecimiento (algo a lo que también contribuye la acumulación de otros desechos metabólicos). Así, se estima que tras 4-7 semanas, la viabilidad de las bacterias lácticas se reduce un ciclo logarítmico (esto significa que su número pasaría, por ejemplo, de $1x10^9$ colonias por gramo a $1x10^8$ colonias por gramo). (Recordar que para que podamos hablar de "yoghurt", las BAL deben estar presentes en una cantidad de al menos $1x10^7$ colonias por gramo).

En definitiva, si se mantiene la cadena de frío en todo momento, el principal riesgo microbiológico que debemos considerar en un yoghurt es la presencia de levaduras y mohos (siempre en caso de que la leche se hubiera contaminado con estos microorganismos después de la pasteurización). Si la cadena de frío se rompiera, es decir, si en algún momento se almacenaran los yoghurts a temperaturas elevadas durante un tiempo considerable; el pH seguiría siendo bajo, lo que impediría el desarrollo de las formas esporuladas de bacterias que podrían resultar patógenas en humanos (las formas vegetativas ya no estarían presentes). El principal riesgo radicaría de nuevo en el crecimiento de mohos y levaduras, que se aceleraría a esas temperaturas. Los problemas que pueden suponer estos la presencia de estos microorganismos (mohos y levaduras) en el yoghurt son:

- Alterar las características organolépticas del yoghurt, produciendo sabores y olores anómalos y un aspecto desagradable (eso no quiere decir que su presencia sea siempre fácilmente detectable por medio de nuestros sentidos).
- Producir gas, abombando la tapa del yoghurt, o incluso provocando su desprendimiento.

- Suponer un riesgo para la salud. Aunque no todas las especies de hongos son patógenas (aun así, podrían provocar reacciones adversas en personas alérgicas), sí existen especies de mohos y levaduras que pueden provocar enfermedades, tanto agudas, como crónicas. Su patogenicidad radica principalmente en la producción de toxinas que en muchos casos pueden ser carcinógenas.

La cuestión que se debe plantear ahora es: ¿hasta qué punto es posible, con los sistemas de producción y distribución actuales, que se produzca una contaminación por mohos y levaduras y que éstos lleguen a desarrollarse en los yoghurts hasta el punto de suponer un riesgo para la salud? En definitiva, esta cuestión es principalmente la que va a determinar la decisión a la hora de fijar una fecha de duración para el producto.

CAPÍTULO 2: PARTE EXPERIMENTAL

2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1. EQUIPOS, REACTIVOS Y MATERIALES

a) Equipos:

- Rotronic, HygroPalm, Cientec instrumentos científicos S.A
- Estufa Memmert loading modell 100-800
- Balanza sartorius ED224S 220g d=0,1mg
- Balanza semi-analítica
- Autoclave
- Mechero bunsen

b) Reactivos:

- 1L NaOH 0,1N estandarizado
- 100ml Biftalato de potasio 0,1N
- Fenolftaleina al 1%
- 1L Agar MRS
- Agua peptonada al 0,1%
- Solución tampón fosfato pH 7.

c) Materiales:

- Bureta 50ml
- Soporte universal
- Pinzas para bureta
- Matraz Erlenmeyer 100ml
- Matraz Erlenmeyer 1000ml
- Espátula
- Baso precipitado 600ml
- Frascos Aw
- Pizeta
- Placas Petri (estériles)
- Probeta 50ml
- Probeta 500ml
- Pipeta graduada 1ml (estéril)

- Pipeta graduada 10ml (estéril)
- Tubos de ensayo tapa rosca (estériles)
- Varilla
- Rejilla para tubos de ensayo

2.1.1. NaOH 0,1N estandarizado

El hidróxido de sodio se utiliza para determinar la acidez de la muestra en una reacción acido-base.

Forma de actuación: En agua, el hidróxido de sodio se disocia totalmente para dar iones sodio e hidróxidos, es decir, proporciona OH^- a la disolución haciendo variar el pH del medio y así determinar el punto de equivalencia para luego obtener la acidez del analito.

Composición: El hidróxido de sodio está compuesto por iones Na+ y OH-. Su composición elemental es Na 57,48%, O 40,00% e H 2,52%

Preparación: Para preparar 1L de NaOH 0.1N se deben disolver 4gr en 1L de agua destilada y homogeneizar.

Estandarización: Una vez lista la solución de NaOH, se debe estandarizar con un patrón primario, en este caso biftalato de potasio al 0,1N. Valorar hasta obtener el punto de equivalencia para luego determinar la concentración exacta del NaOH.

2.1.2. 100ml biftalato de potasio 0,1N

El biftalato de potasio se utiliza como patrón primario para determinar la concentración de una base fuerte. Es una especie de elevada pureza, químicamente estable, no higroscópica, de peso equivalente alto, y que tras ser disuelto, da lugar a especies en disolución químicamente estables.

Forma de actuación: Al poseer una concentración exacta conocida, se puede determinar la concentración exacta del NaOH por medio de una valoración en donde el biftalato reacciona con el NaOH para formar biftalato de sodio y potación más agua, utilizando como indicador fenolftaleína.

Composición: Su composición elemental es C 47,05%, H 2,47%, O 31,34% y K 19,14%.

Preparación: disolver 2,0422gr de biftalato de potasio previamente seco a 110°C por 1-2 horas y aforando a 100ml con agua destilada. No requiere estandarización ya que es un patrón primario.

2.1.3. Fenolftaleína al 1%

Es un indicador de pH que en soluciones ácidas permanece incoloro, pero en presencia de bases se torna rosa o violeta. Su rango de viraje es de 8,3 a 10,0.

Forma de actuación: La molécula de FF es incolora, en cambio el anión derivado de ff es de color rosa, Cuando se agrega una base la ff pierde un H+ formando el anión y haciendo que tome la coloración rosa.

Composición: Su composición elemental es C 75,46%, H 4,43%, O 20,11%.

Preparación: Pesar 1gr de FF y diluir a 100ml de solución (60ml etanol + 40ml de agua).

2.1.4. Medio MRS

Este medio se utiliza para el recuento de bacterias lácticas (específico Lactobacillus). Al contrario que otros medios de cultivos, crecen todas las bacterias lácticas.

Forma de actuación: los medios de cultivo MRS contienen polisorbato, acetato de magnesio y manganeso, sustancias conocidas como factores especiales de crecimiento para Lactobacilos así como una base nutritiva abundante y rica. Dado que solo posee poca selectividad, pueden crecer especies de Pediococos y Leuconostoc, y otros gérmenes acompañantes.

Composición: Peptona Universal, Extracto de Carne, Extracto de levadura (+), Glucosa, Hidrogenofosfato dipotasico, Hidrogencitrato diamonico, Acetato Sodico, Sulfato de magnesio, Sulfato de manganeso y Agar Agar.

Preparación: Disolver 62 g/litro para el agar MRS y esterilizar en autoclave por 15 minutos a 118 grados. pH: 5,5

Incubación: Hasta 3 días a 37 grados o hasta 5 días a 30 grados.

La superficie de las placas no debe dejarse secar porque de lo contrario aumenta la concentración de acetato en la superficie y en consecuencia resulta la inhibición del crecimiento de lactobacilos.

2.1.5. Agua peptonada 0,1%

Es una mezcla de aminoácidos y péptidos que forman un medio que se utiliza como diluyente de muestras, para enriquecimiento no selectivo bacteriano y como base para la fermentación de carbohidratos.

Forma de actuación: La peptona proporciona nutrientes necesarios para el desarrollo microbiano y el cloruro de sodio mantiene el balance osmótico. Las peptonas junto con los extractos de carne y de levadura se utilizan preferentemente como fuente de nitrógeno, fósforo y azufre orgánicos. Algunos de sus componentes se pueden utilizar como factores orgánicos de crecimiento o como fuente de carbono y energía.

Composición: Peptona de carne 10g/L y Cloruro de sodio 5g/L. pH final: 7,2 +/- 2

Preparación: Disolver 0,1gr de peptona en 100ml de agua destilada.

2.1.6. Solución Tampón fosfato pH 7

Un Tampón o buffer es una solución que impide o amortigua las variaciones de pH y lo mantienen constante. Están formadas por la mezcla de ácidos o bases débiles combinadas con su sal conjugada.

El tampón fosfato es un tampón fisiológico inorgánico, se utiliza para mantener el pH de ácidos orgánicos producidos por las reacciones metabólicas.

Forma de actuación: Existe un equilibrio entre un ácido débil, el dihidrogeno fosfato, y su base, el monohidrogeno fosfato. El dihidrogeno fosfato libera un protón y se transforma en monohidrogeno fosfato, de manera inversa el monohidrogeno fosfato puede captar un protón para originar una molécula de dihidrogeno fosfato.

$$H_2PO_4^- \rightleftarrows HPO_4^{-2} + H^+$$

Composición: KH_2PO_4, K_2HPO_4, Na_2HPO_4 x $7H_2O$ y NH_4Cl

Preparación: Disolver 8,5 g KH_2PO_4; 21,75 g K_2HPO_4; 33,4 g $Na_2HPO_4x7H_2O$ y 1,7 g NH_4Cl en app. 500 mL de agua y diluir a 1 L

2.2. DISEÑO EXPERIMENTAL

Para evaluar la estabilidad, calidad y estado del producto final se hacen evaluaciones de los parámetros fisicoquímicos, microbiológicos y sensoriales que serán comparados con las especificaciones según el RSA para yoghurt y así determinar en qué punto este deja de cumplir las características esperadas llegando al fin de su vida útil.

Se espera que la acidez del yogurt aumente a medida que pasan los días de incubación del alimento, aspecto que es normal dentro de los productos lácticos, por lo mismo va a variar el pH entre 4 - 5, y el crecimiento exponencial de las bacterias lácticas analizadas.

Los análisis de las características organolépticas serán determinantes y se basan en la experiencia del catador que debe captar el olor, el sabor y apariencia no propia del producto. Es importante evaluar e indicar el sabor: si es ácido, ligeramente ácido, amargo, etc.

2.2.1. Tratamiento de la muestra

Los yoghurt se obtienen a partir de una cadena de supermercados para luego ser trasladados al laboratorio de la Universidad Técnica Federico Santa María en donde se tomaron 30 unidades analíticas, del mismo sabor y lote, las cuales se reagruparon para formar 6 muestras tamaño 5. De estas muestras 5 corresponden a los análisis en condiciones de refrigeración y 1 en condiciones de abuso (temperatura ambiente).

Fuente: Elaboración propia, fotografía tomada en laboratorio

Figura 2-1. Muestras analíticas

2.2.2. Análisis físico-químicos:

Dentro del análisis físico-químico haremos seguimiento a los parámetros de la evolución de acidez referente al ácido láctico fermentado por las bacterias del yoghurt y actividad de agua (Aw).

2.2.2.1. Determinación de acidez

Fundamento teórico:

La acidez del yoghurt en general se debe a la presencia de ácido láctico el cual se produce gracias a la acción de BAL presentes en el alimento. Esta acidez aumenta de manera proporcional al aumento de BAL en el medio por lo que su determinación constituye un índice de calidad y estado de conservación del yoghurt.

El método se basa en la determinación de la acidez por medio de una valoración acido-base o de neutralización utilizando como indicador fenolftaleína. Es un método analítico cuantitativo que permite conocer la concentración desconocida de una disolución llamada analito, neutralizándolo con un ácido o base de concentración conocida llamado valorante.

En este caso el analito corresponde al ácido láctico (ácido débil) presente en el yoghurt y el valorante a utilizar es el hidróxido de sodio (base fuerte).

$$C_3H_6O_3 + NAOH = NAC_3H_5O_3 + H_2O$$

Procedimiento:

- Pesar en un matraz Erlenmeyer 20gr de yoghurt utilizando una espátula, agregar 30ml de agua destilada y homogeneizar.
- Agregar 3 gotas de indicador FF al 1%. Homogeneizar.
- Valorar desde bureta con NaOH agitando continuamente la solución hasta el viaje del indicador.
- Anotar gasto
- Realizar el análisis en duplicado.
- Informar la acidez en g/L de ácido láctico.

2.2.2.2. Determinación de la Actividad de agua

Fundamento teórico:

La gran influencia que la actividad de agua (Aw) tiene sobre el crecimiento y actividad metabólica de los microorganismos, así como sobre la velocidad de determinadas reacciones químicas y enzimáticas hace que este sea un factor muy importante a determinar ya que influye en la calidad del alimento afectando su vida útil.

El método a utilizar fue por Higrómetro electrónico el cual posee un sensor basado en un electrolito depositado entre dos electrodos, el que mide el cambio en la impedancia eléctrica producida por el cambio de humedad relativa de una cámara en la que se encuentra la muestra.

Procedimiento:

- Llenar el frasco con la muestra, encender el equipo y esperar unos segundos para que se estabilice. Apagar el equipo.
- Encender el equipo luego de 45 min y dejar estabilizar 15min.
- Anotar la actividad de agua registrada.

2.2.3. Análisis microbiológicos

2.2.3.1. Recuento de Bacterias acido lácticas

Fundamento teórico:

Las bacterias acido lácticas producen ácido láctico y otros metabolitos descendiendo el pH. Estas bacterias compuestas por cultivos mixtos o puros están consideras como prebióticos en la fermentación y obtención de productos lácteos.

La metodología a seguir se basó en la señalada por el ISPCH (anexo) con algunas modificaciones debido a disponibilidad de materiales y equipos. Cabe señalar que el recuento realizado solo es cualitativo, no cuantitativo, debido a problemas presentados en los estudios previos a los análisis los cuales se darán a conocer en anexos.

El método consiste en sembrar diluciones de una muestra representativa y homogénea del alimento a analizar en placas Petri, utilizando medios de cultivo selectivo y en condiciones de tiempo, temperatura y exigencias de oxigeno apropiados el desarrollo de los microorganismos.

Después del periodo de incubación se cuentan las colonias características. El número de microorganismos característicos por gramo de muestra es calculado a partir del número de colonias obtenidas en placas cuyos niveles de dilución muestren un resultado significativo.

El reglamento sanitario vigente en el artículo 220 estipula que los microorganismos lácteos presentes en el producto final deberán ser viables y en cantidades superior a 10^6 ufc/g.

Procedimiento:

El procedimiento a seguir es el correspondiente para yoghurt no afrutado propuesto por el ISPCH, con algunas pequeñas modificaciones.

- Pesar 10gr de muestra en un tubo con tapa osca con 10ml de buffer fosfato pH7. Se tiene la dilución ½
- Preparar diluciones decimales utilizando agua peptonada 0,1% y pipetas de 1ml.

- Tomar 2 ml de la dilución ½ y colocar en tubo con 8ml de agua peptonada 0,1%. Se tiene la dilución 10^{-1}.
- Marcar las placas Petri en duplicados de ambas diluciones.
- Sembrar en duplicado en placas Petri 1ml de cada dilución.
- Verter 15ml de medio Agar MRS previamente fundido y temperado a 47°C +/- 2°C en las placas marcadas.
- Mezclar cuidadosamente el inóculo con el medio por rotación y dejar solidificar sobre una superficie plana y fría.
- Incubar las placas invertidas a 37°C por 72 hr. (este proceso debiese realizarse en anaerobiosis y atmósfera de 10-20% de CO_2)
- Colocar no más de 6 placas por pila.
- Finalizado el periodo de incubación retirar las placas.
- Las colonias de Lactobacillus *bulgaricus* son blanquecinas de 2-3 mm de diámetro, de bordes lisos o rugosos, redondas o lenticulares o en formas de estrella, convexas, suaves y opacas sin pigmento.
- Seleccionas las placas que posean entre 25-250 ufc. Y contar las colonias características.

2.2.4. Análisis organoléptico

Fundamento teórico:

El análisis y la evaluación organolépticos de los productos alimentarios miden e interpretan las respuestas de las personas según la vista, el olfato, gusto, etc. Proporciona conocimientos tanto sobre el comportamiento de los consumidores y la garantía de calidad.

El método consiste en los atributos de los alimentos que se detectan por medio de los sentidos dentro de los cuales se encuentran la vista (color), gusto (acidez), tacto y olfato.

El olor: si es aromático, frutal, sin aroma, aroma desagradable.

La Consistencia: Viscosa, espeso, grumoso, arenoso, separación de suero, pegajoso, grietas.

Color: se debe analizar dependiendo del colorante utilizado.

Procedimiento:

- Homogeneizar la muestra y tomar una pequeña porción
- Esta muestra debe ser olfateada y calificar según: 1 (normal), 2 (ligeramente anormal) y 3 (anormal).

- De esta porción una pequeña cantidad tomada con una espátula, limpia y seca, se prueba y se califica su nivel de acidez, donde 1 es normal, 2 ligeramente anormal y 3 anormal.
- Determinar la apariencia de la porción tomada en relación a color y textura, donde 1 es normal, 2 ligeramente anormal y 3 anormal.
- Registrar los datos obtenidos en una tabla organoléptica.

2.3. EXPRESIÓN DE RESULTADOS

2.3.1. Análisis físico-químicos

2.3.1.1. Acidez

Para la determinación de acidez en gramos por litros se utiliza el siguiente cálculo:

$$\%Acidez = \frac{V\ x\ N\ x\ PE}{M}\ x\ 100$$

Donde:
V = Volumen de NaOH gastados (L).
N = Normalidad del NaOH.
PE = Peso equivalente del ácido láctico.
M = gr de muestra.

2.3.1.2. Actividad de agua

La actividad de agua se expresa como Aw, la cual es entregada directamente por el equipo a utilizar.

2.3.2. Análisis microbiológicos

2.3.2.1. Recuento de Bacterias acido lácticas

Para calcular el recuento del número de microorganismos característicos en la muestra de ensayo se usa la siguiente ecuación siempre y cuando se obtengan dos

diluciones consecutivas dentro de placas normales.Los resultados para cada microorganismo presente en la muestra se expresan en unidades formadoras de colonias por gramo o por ml (ufc/g o ufc/ml):

$$N = \frac{\Sigma\ C}{[(1\ x\ n1) + (0.1\ x\ n2)]x\ d}$$

Donde:

N = número de colonias por ml o gr de producto

∑C = Suma de todas las colonias contadas en todas las placas

N1 = número de placas contadas de la menor dilución

N2 = número de placas contadas de la dilución consecutiva

D = dilución de la cual fue obtenido el primer recuento

- Cuando no se pueda aplicar la fórmula y se obtenga promedio, el número de unidades formadoras de colonias, obtenido en las placas correspondientes a la dilución seleccionada, se multiplica por el factor de dilución correspondiente, se promedian los resultados y el valor final se expresa en ufc por gramo o por ml según corresponda.
- Si hay sólo recuentos menores a 10, reportar el número de microorganismos por gramo como: Menor que 10 x 1/d (siendo d el valor correspondiente a la dilución más baja)
- Si hay sólo recuentos que exceden los 250 ufc, hacer un recuento estimado de las placas que tengan un recuento más cercano a 250 ufc y multiplicar por el recíproco del valor correspondiente a la dilución más alta. Registrar como recuento estimado.

El número total de microorganismos característicos, N, por gramo de muestra es igual a:

$$N = NL + Ns$$

Donde:

N = número total de microorganismos característicos.

NL = es el valor numérico del Lactobacillus *bulgaricus* por gramo.

NS = es el valor numérico de Streptococcus *thermophilus* por gramo.

2.3.3. Análisis organoléptico

Para los resultados obtenidos en el análisis organoléptico se utiliza una tabla con valoraciones de 1 a 3 para cada característica a analizar, las cuales corresponden a: Olor, apariencia y sabor donde:

1 = Normal

2 = Medianamente anormal

3 = Anormal

2.3.4. Análisis estadístico

La determinación de acidez es realizada en duplicado por lo que los resultados son expresados a partir del promedio de los gastos obtenidos. Esto también fue aplicado para los valores totales, calculando un promedio entre todas las muestras para cada día y así obtener una gráfica general.

2.3.4.1. Media aritmética

La media aritmética, también llamada promedio o media, es un valor representativo de un conjunto de datos numéricos y aporta un valor medio. Se simboliza como x y se encuentra solo para variables cuantitativas. Se obtiene al sumar todos los datos y dividirlos por el número total de datos de acuerdo a la siguiente formula:

$$\overline{X} = \frac{x_1 + x_2 + x_3 + x_4 + \ldots + x_n}{n}$$

CAPÍTULO 3: RESULTADOS

3. RESULTADOS

3.1. VARIACIÓN DE ACIDEZ EN EL TIEMPO

En la tabla 3-1 se muestra el porcentaje de acidez obtenido para cada muestra a lo largo del tiempo respecto a los gastos obtenidos en cada valoración realizada por duplicado.

Se aprecia claramente como el porcentaje de acidez se mantiene y aumenta levemente a lo largo del tiempo. Estos valores se ven afectados levemente por la temperatura y la cantidad de muestra masada.

El día 24, la muestra en condiciones de abuso fue eliminada debido a la aparición de hongos en la superficie de la muestra lo cual indica visiblemente el fin de su vida útil. Esta muestra presento indicios de contaminación al día 19*, pero al no estar en contacto con la muestra, sino que en la boca del envase, no se consideró alterada.

Fuente: Elaboración propia, fotografía tomada en laboratorio

Figura 3-1. Hongos muestra en condiciones de abuso día 19

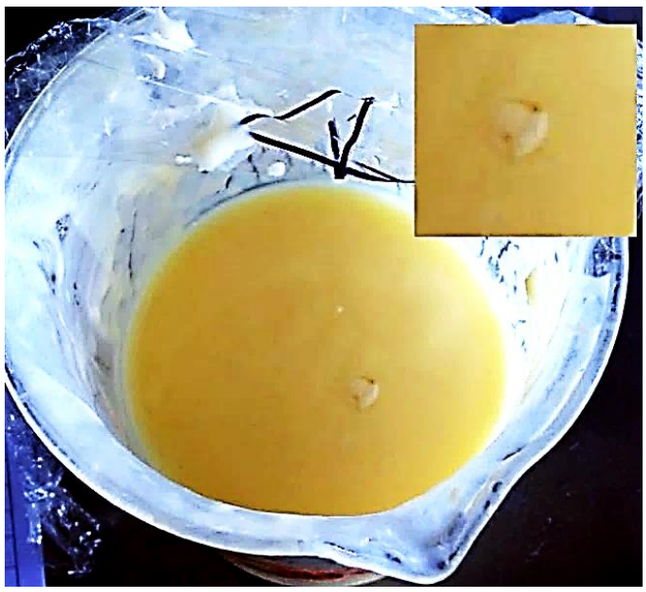
Fuente: Elaboración propia, fotografía tomada en laboratorio

Figura 3-2. Hongos muestra en condiciones de abuso día 24

En el día número 29 de análisis, dos de las muestras (4 y 5) presentaban contaminación a partir de una especie de levadura, y el papel film (que se encuentra recubriendo el recipiente) estaba inflado por efecto de la fermentación realizado por la levadura. Sin embargo, no afecta al análisis y a sus resultados, por lo cual se continúa con el procedimiento normal. Luego de esta fecha las demás muestras presentaron la misma característica.

Fuente: Elaboración propia, fotografía tomada en laboratorio

Figura 3-3. M5, formación de gas al interior de la muestra



Fuente: Elaboración propia, fotografía tomada en laboratorio

Figura 3-4. M4, apariciones de levadura en la muestra

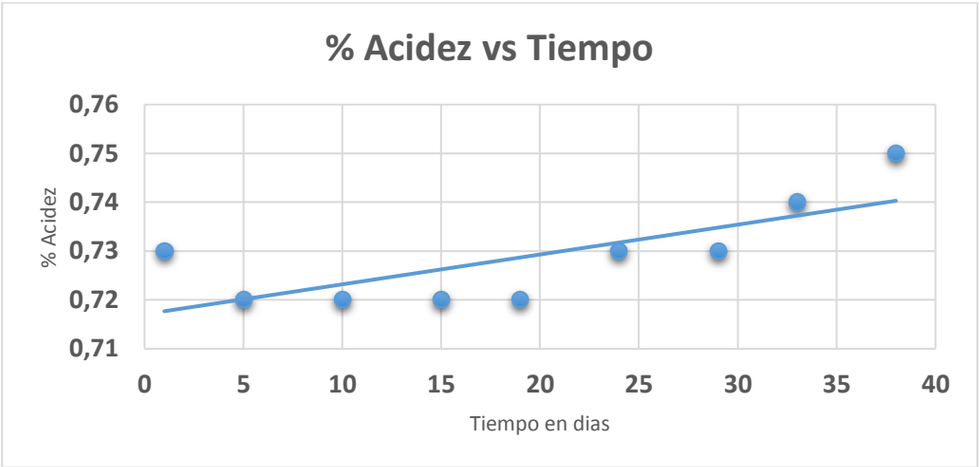
Tabla 3-1. Resumen porcentaje de acidez en el tiempo para cada muestra

Muestra	Día 1	Día 5	Día 10	Día 15	Día 19	Día 24	Día 29	Día 33	Día 38
M1	0,73%	0,72%	0,72%	0,73%	0,73%	0,73%	0,73%	0,74%	0,75%
M2	0,73%	0,72%	0,72%	0,72%	0,72%	0,73%	0,73%	0,74%	0,74%
M3	0,73%	0,72%	0,72%	0,72%	0,72%	0,74%	0,74%	0,75%	0,74%
M4	0,73%	0,72%	0,72%	0,73%	0,72%	0,74%	0,73%	0,74%	0,75%
M5	0,73%	0,72%	0,72%	0,72%	0,72%	0,73%	0,74%	0,74%	0,75%
Abuso	0,73%	0,73%	0,74%	0,75%	0,75%	-	-	-	-

Fuente: Elaboración propia, Excel.

A continuación, se observa en el gráfico 3-1 el aumento de la acidez a lo largo del tiempo, utilizando el promedio de las muestras almacenadas en condiciones óptimas para cada día.

Las muestras fueron almacenadas entre 0° y 8° según lo recomendado para el producto, temperatura en la cual la formación del ácido láctico es muy baja debido a que la actividad bacteriana disminuye al no tener las condiciones de temperatura ideales. El mayor pick se muestra al día 38 (considerando que el análisis no se inició el mismo día de elaboración del producto (14 días después)), en donde se cumple el total de su vida útil señalada en el producto correspondiente a 50 días.



Fuente: Elaboración propia, Excel.

Gráfico 3-1. Acidez vs tiempo

A continuación se muestra mediante en el gráfico 3-2 el aumento de la acidez en función del tiempo para la muestra en condiciones de abuso.

Fuente: Elaboración propia, Excel.

Gráfico 3-2. Variación de acidez de la muestra en condiciones de abuso a lo largo del tiempo

3.2. VARIACIÓN DE LA ACTIVIDAD (AW) DE AGUA EN EL TIEMPO

En la tabla 3-2 se muestra la variación en la Aw obtenido para cada muestra a lo largo del tiempo.

Tabla 3-2. Actividad de agua para cada muestra a lo largo del tiempo

Día	M1	M2	M3	M4	M5	Abuso
1	0,942	0,950	0,954	0,960	0,956	0,946
5	0,941	0,906	0,933	0,928	0,947	0,984
10	0,915	0,904	0,906	0,908	0,905	0,972
15	0,918	0,936	0,926	0,932	0,924	0,968
19	0,903	0,915	0,909	0,925	0,933	0,970
24	0,912	0,913	0,917	0,914	0,937	-
29	0,912	0,924	0,927	0,933	0,916	-
33	0,908	0,914	0,924	0,919	0,935	-
38	0,912	0,911	0,923	0,912	0,925	-
Promedio	0,918	0,919	0,924	0,926	0,931	0,974

Fuente: Elaboración propia, Excel.

En el grafico 3-3 se aprecia la variación de la actividad de agua en el tiempo tomando como ejemplo la muestra número 1 (azar), donde se demuestra que la variación de esta no es significativa ya que no varía mucho. Se observa que puede parecer que el valor de Aw va en forma descendente, pero solo es efecto de la línea de tendencia, por efecto de los primeros valores que son un poco elevados al principio.

Fuente: Elaboración propia, Excel.

Grafico 3-3. Aw de agua vs tiempo de análisis para la muestra número 1

3.3. RECUENTO DE BACTERIAS ACIDO LÁCTICAS.

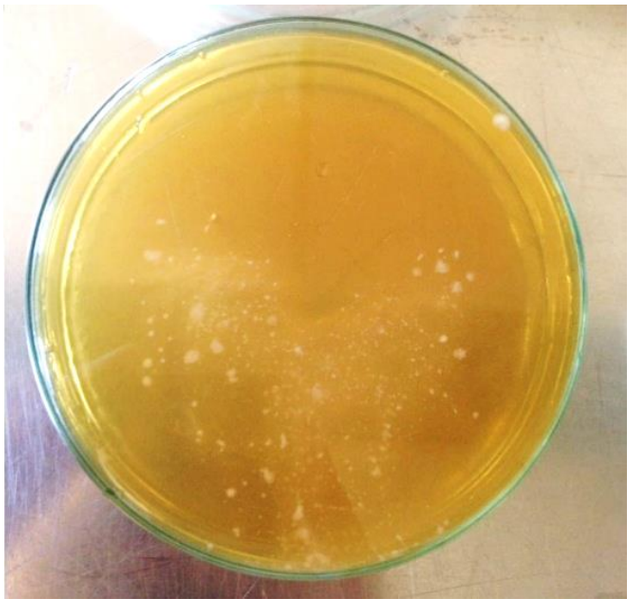
A continuación, la figura 3-5, 3-6, 3-7 y 3,8 se observan imágenes sobre el cultivo de bacterias acido-lácticas obtenidas de los análisis realizados a la muestra.

Este análisis presenta resultados cualitativos debido a ciertas causas que se especifican en anexos. Siguiendo lo recomendado por el ISPCH, los cultivos se deben realizar de las diluciones 10-4 y 10-5, pero debido a la ausencia de UFC/g se prefirió utilizar las diluciones ½ y 10-1. Las Diluciones 10-2 y 10-3 presentaban no más de 5 UFC/g o ausencia total de estas.

Se observa que en el análisis microbiológico el crecimiento de la población de las bacterias lácticas va en aumento desde el primer día de cultivo hasta el último. En las siguientes imágenes se visualiza claramente el aumento gradual a lo largo de la determinación de la vida útil.

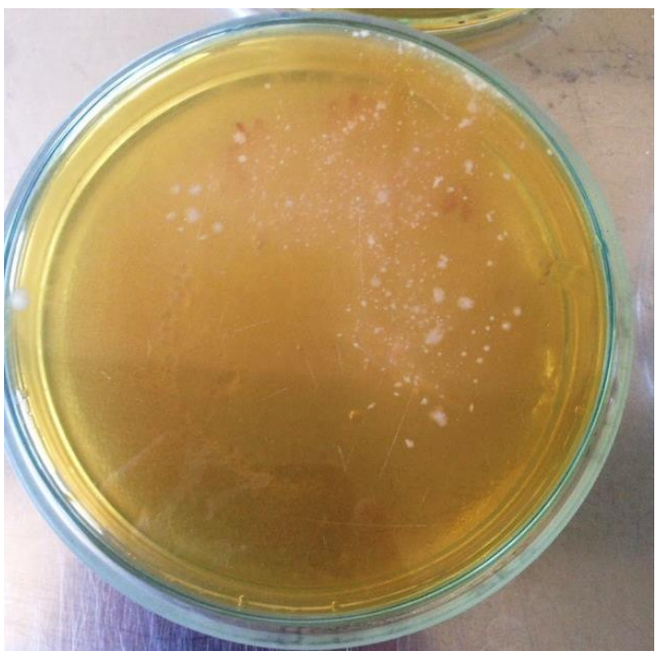
Fuente: Elaboración propia, fotografía tomada en laboratorio

Figura 3-5. M3 1er cultivo



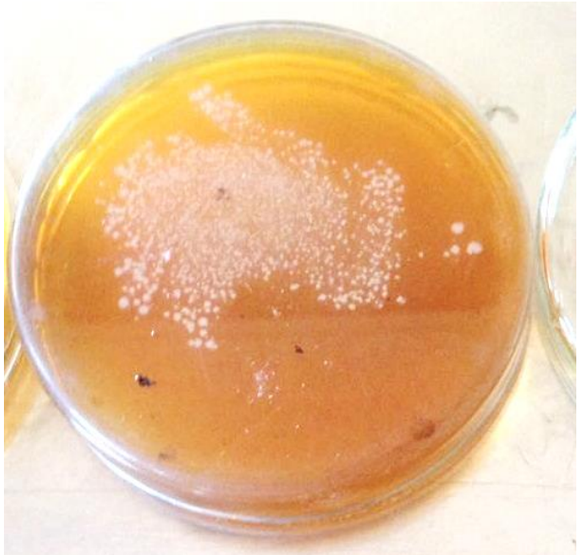
Fuente: Elaboración propia, fotografía tomada en laboratorio

Figura 3-6. M3 3er cultivo



Fuente: Elaboración propia, fotografía tomada en laboratorio

Figura 3-7. M3 5to cultivo



Fuente: Elaboración propia, fotografía tomada en laboratorio

Figura 3-8. M3 9 cultivo

Tabla 3-3. Resumen recuento de colonias de Lactobacillus Dilución ½

Día	M1	M2	M3	M4	M5	Abuso
1	>250 UFC/g	>250 UFC/g	>250 UFC/g	>250 UFC/g	>250 UFC/g	>250 UFC/g
5	>250 UFC/g	>250 UFC/g	>250 UFC/g	>250 UFC/g	>250 UFC/g	>250 UFC/g
10	>250 UFC/g	>250 UFC/g	>250 UFC/g	>250 UFC/g	>250 UFC/g	>250 UFC/g
15	>250 UFC/g	>250 UFC/g	>250 UFC/g	>250 UFC/g	>250 UFC/g	>250 UFC/g
19	>250 UFC/g	>250 UFC/g	>250 UFC/g	>250 UFC/g	>250 UFC/g	>250 UFC/g
24	>250 UFC/g	>250 UFC/g	>250 UFC/g	>250 UFC/g	>250 UFC/g	-
29	>250 UFC/g	>250 UFC/g	>250 UFC/g	>250 UFC/g	>250 UFC/g	-
33	>250 UFC/g	>250 UFC/g	>250 UFC/g	>250 UFC/g	>250 UFC/g	-
38	>250 UFC/g	>250 UFC/g	>250 UFC/g	>250 UFC/g	>250 UFC/g	-

Fuente: Elaboración propia, Excel.

Tabla 3-4. Resumen recuento de colonias de Lactobacillus Dilución 10^{-1}

Día	M1	M2	M3	M4	M5	Abuso
1	>250 UFC/g	>250 UFC/g	>250 UFC/g	>250 UFC/g	>250 UFC/g	>250 UFC/g
5	>250 UFC/g	>250 UFC/g	>250 UFC/g	>250 UFC/g	>250 UFC/g	>250 UFC/g
10	>250 UFC/g	>250 UFC/g	>250 UFC/g	>250 UFC/g	>250 UFC/g	>250 UFC/g
15	>250 UFC/g	>250 UFC/g	>250 UFC/g	>250 UFC/g	>250 UFC/g	>250 UFC/g
19	>250 UFC/g	>250 UFC/g	>250 UFC/g	>250 UFC/g	>250 UFC/g	>250 UFC/g

Tabla 3-4. Resumen recuento de colonias de Lactobacillus Dilución 10^{-1} (Continuación)

Día	M1	M2	M3	M4	M5	Abuso
24	>250 UFC/g	>250 UFC/g	>250 UFC/g	>250 UFC/g	>250 UFC/g	-
29	>250 UFC/g	>250 UFC/g	>250 UFC/g	>250 UFC/g	>250 UFC/g	-
33	>250 UFC/g	>250 UFC/g	>250 UFC/g	>250 UFC/g	>250 UFC/g	-
38	>250 UFC/g	>250 UFC/g	>250 UFC/g	>250 UFC/g	>250 UFC/g	-

Fuente: Elaboración propia, Excel.

3.4. ANÁLISIS ORGANOLÉPTICO

En las siguientes tabla 3-5, 3-6, 3-7, 3-8, 3-9, 3-10, 3-11, 3-12 y 3-13 se muestran los cambios organolépticos apreciados en cada muestra a lo largo del tiempo con una valoración 1-3 donde uno es normal y 3 es anormal.

Al día 24, no se realizó el análisis organoléptico debido a que la muestra ya presentaba formación de hongos en su superficie.

Desde el día 29 ya se comenzaron a presentar alteraciones indicando la proximidad de la fecha de caducidad, la primera alteración en aparecer es la del olor, seguido del sabor y finalmente la apariencia siendo esta ultima la con menor grado de alteración.

Tabla 3-5. Análisis organoléptico Día 1 (24-Oct-2016)

Muestra	Olor	Apariencia	Sabor
M1	1	1	1
M2	1	1	1
M3	1	1	1
M4	1	1	1
M5	1	1	1
Abuso	1	1	1

Fuente: Elaboración propia, Excel.

Tabla 3-6. Análisis organoléptico Día 5 (28-Oct-2016)

Muestra	Olor	Apariencia	Sabor
M1	1	1	1
M2	1	1	1
M3	1	1	1
M4	1	1	1
M5	1	1	1
Abuso	1	1	1

Fuente: Elaboración propia, Excel.

Tabla 3-7. Análisis organoléptico Día 10 (02-Nov-2016)

Muestra	Olor	Apariencia	Sabor
M1	1	1	1
M2	1	1	1
M3	1	1	1
M4	1	1	1
M5	1	1	1
Abuso	2	1	2

Fuente: Elaboración propia, Excel.

Tabla 3-8. Análisis organoléptico Día 15 (07-Nov-2016)

Muestra	Olor	Apariencia	Sabor
M1	1	1	1
M2	1	1	1
M3	1	1	1
M4	1	1	1
M5	1	1	1
Abuso	2	2	3

Fuente: Elaboración propia, Excel.

Tabla 3-9. Análisis organoléptico Día 19 (11-Nov-2016)

Muestra	Olor	Apariencia	Sabor
M1	1	1	1
M2	1	1	1
M3	1	1	1
M4	1	1	1
M5	1	1	1
Abuso	2	2	3

Fuente: Elaboración propia, Excel.

Tabla 3-10. Análisis organoléptico Día 24 (16-Nov-2016)

Muestra	Olor	Apariencia	Sabor
M1	1	1	1
M2	1	1	1
M3	1	1	1
M4	1	1	1
M5	1	1	1
Abuso	3	3	(contaminación)

Fuente: Elaboración propia, Excel.

Tabla 3-11. Análisis organoléptico Día 29 (21-Nov-2016)

Muestra	Olor	Apariencia	Sabor
M1	1	1	1
M2	2	1	1
M3	2	1	1
M4	2	2	1
M5	1	2	1

Fuente: Elaboración propia, Excel.

Tabla 3-12. Análisis organoléptico Día 33 (25-Nov-2016)

Muestra	Olor	Apariencia	Sabor
M1	1	1	1
M2	2	1	2
M3	2	2	2
M4	2	2	2
M5	2	2	1

Fuente: Elaboración propia, Excel.

Tabla 3-13. Análisis organoléptico Día 38 (30-Nov-2016)

Muestra	Olor	Apariencia	Sabor
M1	2	2	3
M2	2	2	3
M3	3	2	3
M4	3	2	3
M5	3	2	3

Fuente: Elaboración propia, Excel.

DISCUSIÓN

El yoghurt sin lactosa es un producto lácteo creado para aquellas personas intolerantes a esta azúcar, con el objetivo de que ellos no pierdan la ingesta diaria recomendada por el MINSAL de lácteos ricos en vitaminas y minerales, tanto para niños como para adultos. La determinación de la vida útil hace alusión a la inocuidad del producto y la calidad entregada al consumidor.

Se obtuvo resultados de porcentaje de acidez variaciones entre los valores 0,72 y 0,75 por ciento en todas las muestras. Se observa que en el día 1 de análisis todas las muestras tienen el mismo porcentaje de acidez (0,73 %) y luego el día 38 que es el último día de análisis, tienen un porcentaje de 0,75 promedio obteniendo el pick más alto de todos los días de análisis. De la muestra en condiciones de abuso se obtuvo que el día 1 entrega un porcentaje de acidez de 0,73, muy cercano a los valores de las muestras refrigeradas, sin embargo, el día 15 el resultado de este porcentaje fue de 0,75 que se considera el valor más alto alcanzado por la muestra. Según la normativa del Codex para las leches fermentadas (yoghurt), la acidez mínima, es de 0,6 % provocada por las BAL, y que su aumento es de 0,2% a partir de la 4-7 semanas del producto, el análisis correspondiente cumple con esta normativa, ya que tomando en cuenta las condiciones que afectan al producto, la acidez aumenta levemente a lo largo del tiempo.

Sobre los aspectos sensoriales son producidos por procesos bioquímicos que tienden a realizar ciertos cambios sobre las características organolépticas del producto a través del tiempo. En el día 1 de análisis, el yoghurt sin lactosa sabor vainilla tiene un color amarillo suave debido al colorante utilizado, tiene un olor característico del saborizante vainilla aromático, bastante dulce, la consistencia es viscosa, cremosa y homogénea, no se observa separación de suero y el sabor es típico del saborizante, agradable y de ligero a medianamente ácido. Estas características para las muestras refrigeradas se mantuvieron hasta el día 29 de análisis, en donde el olor es la única característica que cambia, comenzó a ser más fuerte. Luego el día 33, se alteraron las características normales del olor, apariencia y sabor, el yoghurt se presenta más licuado con separación de fases, al sabor se le acentuó la acidez (porcentaje de acidez de 0,74 promedio), y el olor se acentuó más desagradable. Para el día 38 todas las muestras se veían con alteraciones importantes sobre todo en el sabor, el cual se presenta muy ácido, donde, además, cabe mencionar que se obtiene un 0,75% de porcentaje de acidez que provoca que el sabor este tan alterado. A diferencia de la muestra en condiciones de abuso la cual comenzó a presentar alteraciones de manera ascendente el día 10 de análisis hasta el día 15 donde se decide eliminar.

Según el análisis microbiológico realizado, el yoghurt sin lactosa no califica con el artículo 220 del Reglamento Sanitario de los alimentos, ya que para cumplir esta normativa los microorganismos lácticos presentes en el producto final deberán ser viables y en cantidad superior a 10^6 UFC/g. Por diversas causas exteriores, explicadas en Anexo de este trabajo, no se pudo ejecutar un análisis microbiológico como corresponde por lo tanto,el seguimiento del aumento de la población de las BAL es cualitativo.

Con respecto a la actividad de agua, los valores medidos en el equipo de Aw entregan como resultado variaciones entre los valores 0,90 y 0,98 a causa de la humedad relativa en la atmosfera, ya que al ser medida en diferentes días y tomando en cuenta las diferentes temperaturas de ambiente, afecta directamente en el resultado de actividad de agua del producto. La humedad relativa de la atmosfera que rodea al alimento corresponde a una actividad de agua inferior a la del producto (yoghurt), tendería a desecar la superficie de este, por lo que, si la humedad relativa tuviese un valor más elevado que la correspondiente a la actividad de agua del alimento, está aumentaría en la superficie del alimento en cuestión. Es por esta razón que la actividad de agua puede aumentar o disminuir su valor.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Respecto los resultados obtenidos en este trabajo de investigación se puede concluir lo siguiente:

1. Al determinar la vida útil del yoghurt sin lactosa sabor vainilla, manteniendo el producto refrigerado entre 0° C y 8 ° C, se obtuvo que cumple con lo establecido por la empresa con la fecha de caducidad informada en el envase.
2. El resultado para la muestra en condiciones de abuso es el esperado, ya que al no estar refrigerada se presentan alteraciones mucho antes de la fecha de vencimiento.
3. El resultado de recuento de bacterias ácido lácticas no es el esperado, ya que se realizó un análisis cualitativo, el cual no presenta resultados reales.
4. El aumento de acidez en la muestra es certero al cumplir con lo establecido por el Codex Alimentarius.
5. La fecha de vencimiento de un producto entrega el punto en el cual este pierde sus propiedades organolépticas, sin embargo no es aquel que puede causar un riesgo significativo al consumidor

BIBLIOGRAFIA

[A] ALVAREZ Manuel, MIQUEL Juan e IBAÑEZ Patricio. Enfermedades del colon e intestino, Intolerancia a la lactosa. [En línea]. Pontificia Universidad Católica de Chile, Departamento de gastroenterología, Facultad de medicina. [consultado en (poner fecha)]. Disponible en: http://www.intestino.cl/intolerancia-lactosa.htm

[B] ANAYA Villalpanda Matilde, CABO Almaguer Hilda, DIASZ, Velázquez Manuel, MAS Diego Siannah y MESA Mariño Yarindra. Estudio del comportamiento de bacterias Acido lácticas (BAL) del cultivo Bioyogur a diferentes dosis de tratamiento magnético. [en línea] rtq Revista Tecnología Química Universidad de Oriente. [consultado en (poner fecha)] ISSN 2224-6185 Disponible en: <http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2224-61852016000300010>

[C] AQUINO M., CANCHURICRA J., CERRON F., SANCHEZ R., Vida útil del yogur bionatural usando el método del valor Q_{10} y análisis de supervivencia. [en línea]. Perú: Universidad nacional agraria La Molina. [consultado en (poner fecha)] Disponible en: <http://es.slideshare.net/martinsc26/vida-util-yogur-bionatural>

[D] BLOGIA. Todo es química, Tampón fosfato. [en línea] 06 abril 2008 [consultado en (poner fecha)] Disponible en: <https://todoesquimica.blogia.com/2008/040603-tamp-n-fosfato.php>

[E] BRITANIA LAB. Productos agua peptonada. [en línea] Argentina.[consultado en (poner fecha)] Disponible en: <http://www.britanialab.com.ar/esp/productos/b02/aguapep.htm>

[F] CARO Carlos A., ECHEVERRI Shirley, GRANDA Diana M., LEON Angela M., MONTOYA Olga I., MOTATO Karina E., RESTREPO Juan M., QUINCHIA Lida y VALENCIA Julian. Bacterias Ácido Lacticas (BAL) silvestres colombianas presentan propiedades adecuadas para la fabricación de masa acida.[en línea] VITAE, Revista de la facultad de quimica farmacéutica. Año 2006. Volumen 13. Número 2. Pag 26-35. [consultado en (poner fecha)] ISSN 0121-4004. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/vitae/v13n2/v13n2a04.pdf>

[G] CARRERES José Henrique. Tecnoalimentalia, 3 Métodos para estimar la vida útil de un producto de alimentación [s. a.]. [en línea] [consultado en (poner fecha)] Disponible en: <http://tecnoalimentalia.ainia.es/web/tecnoalimentalia/ultimas-tecnologias/-/articulos/rT64/content/3-metodos-para-estimar-la-vida-util-de-un-producto-de-alimentacion>

[H] CEJUDO Aurora Galvan, FIÑANA Isaac Tunez, REYES Emilio Fernandez. pH y amortiguadores: Tampones fisiológicos. [en línea]Departamento de Bioquimica y Biología Molecular. Universidad de Córdoba. [consultado en (poner fecha)] Disponible en: <https://www.uco.es/dptos/bioquimica-biol-mol/pdfs/06%20pH%20AMORTIGUADORES.pdf>

[I] CODEX ALIMENTARIUS. Leche y productos lácteos. [en línea] Segunda edición. Roma. Organización Mundial de la Salud y Organización de las Naciones Unidas Para la Alimentación y Agricultura. 2011. [consultado en (poner fecha)] Disponible en: <http://www.fao.org/3/a-i2085s.pdf>

[J] CODEX ALIMENTARIUS. Recommended methods of analysis and sampling. [en línea] Última edición 2016. CODEX STAN 234-1999. [consultado en (poner fecha)] Disponible en: <http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/agns/pdf/CXS_234e.pdf>

[K] CONSEJO de Universidades. Tesis doctorales. Conservación de Alimentos [en línea] GOMEZ Díaz, Rafael. 1989-1990. Pag 77-81. [consultado en (poner fecha)] Disponible en: <http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/awMetDet_1817.pdf>

[L] CRISTINA. Blosgspot. Química, elaboración del yogurt. 25 Octubre 2010. [en línea] [consultado en (poner fecha)] Disponible en: <http://qca-apg.blogspot.cl/2010/10/yogur-1-produccion-1-donde-se-produce.html>

[M] DE LA ROSA MATILDE Alejandra Magaly. Análisis sensorial de yogurt adicionado con leche de soya. Para obtener el título de: Ingeniero en ciencia y tecnología de alimentos. México. Universidad Autónoma Agraria Antonio Navarro. [en línea] Año 2009. [consultado en (poner fecha)] Disponible en: <http://repositorio.uaaan.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/392/60481s.pdf?sequence=1>

[N] Dr. BURCHARD Señoret Lucas. Análisis organoléptico. [en línea] Publicado Año 2008. [consultado en (poner fecha)] Disponible en: <https://es.slideshare.net/lucasburchard/anlisis-organolptico-de-alimentos>

[Ñ] ELECTRO WORK. Impedancia. [en línea][consultado en (poner fecha)] Disponible en: <http://www.electrowork.com.ar/ElectroTiger/Impedancia.htm>

[O] FACULTAD de ciencias. Estandarización de soluciones valorantes. Universidad Central de Venezuela. [en línea] [consultado en (poner fecha)] Disponible en: <http://www.ciens.ucv.ve:8080/generador/sites/lfqf/archivos/estandarizacion.pdf>

[P] FAO-PRODAL. Intructional manual 2014 FAO-PRODAR Spanish. Procesado de lácteos. Fichas técnicas. [en línea] [consultado en (poner fecha)] Disponible en: <http://www.fao.org/3/a-au170s.pdf >

[Q] GOOGLE BOOKS. ROSER Romero Del Castillo Shelly, JOSEP Mestres Lagarriga. Productos Lacteos Tecnologia. España: Univ. P Univ. Politèc. de Catalunya, 2004. [en línea]. [consultado en (poner fecha)] Disponible en: <https://books.google.cl/books?id=HUugK6Ep_JkC&pg=PA116&lpg=PA116&dq=streptococcus+thermophilus+definicion&source=bl&ots=FMoQdykeCt&sig=GW7nPqh1ebiblrP4a9koLO8Yfvs&hl=es&sa=X&sqi=2&ved=0ahUKEwj35J_d6MvNAhVEF5AKHX3cBZUQ6AEITjAH#v=onepage&q&f=false>

[R] HISTORIA Y BIOGRAFÍAS. 15 Octubre 2014. [en línea] [consultado en (poner fecha)] Disponible en: <http://historiaybiografias.com/conservas/>

[S] INSTITUTO SALUD PÚBLICA. Procedimiento recuento de Lactobacillus bulgaricus y Streptococcus thermophilus en yogurt. [en línea] APHA 17 Edicion. Revision 02-07-2010. PRT-712.02-047. [consultado en (poner fecha)] Disponible en: <http://www.ispch.cl/sites/default/files/documento_tecnico/2011/01/PRT-712.02-047%20V2%20Lactobac%20y%20Strept%20yogurt.pdf>

[T] JUVASA. 3 Noviembre 2010. España. [en línea] [consultado en (poner fecha)] Disponible en: <http://www.juvasa.com/es/conservas/historia-de-la-conservacion>

[U] KHAN ACADEMY. [s. a.]. [en línea][consultado en (poner fecha)] Disponible en: <https://es.khanacademy.org/science/chemistry/acids-and-bases-topic/acids-and-bases/a/bronsted-lowry-acid-base-theory>

[V] LURUEÑA Miguel A. GOMINOLAS DE PETRÓLEO. [en línea]. 10 Abril 2013.[consultado en (poner fecha)] Disponible en: <http://www.gominolasdepetroleo.com/2013/04/cuanto-dura-realmente-un-yogur.html>

[W] MARIANO. Tecnologia de los plasticos. 8 Agosto 2011. [en línea] [consultado en (poner fecha)] Disponible en: <http://tecnologiadelosplasticos.blogspot.cl/2011/08/poliacido-lactico-pla.html>

[X] MINETTI Clau. Valoración del NaOH con biftalato de potasio. [s. a.] [en línea][consultado en (poner fecha)] Disponible en: <https://es.scribd.com/doc/43871020/Valoracion-del-NaOH-con-biftalato-de-potasio>

[Y] RODRIGUEZ Pedro. J. Pura química. Valoración Acido-Base. Química General, Laboratorio de química general. [en línea]Venezuela UNESUR. 2011.[consultado en (poner fecha)] Disponible en: <https://puraquimica.files.wordpress.com/2011/07/prc3a1tica-5-titulaciones-c3a1cido-base.pdf>

[Z] ROMERO Ramon Monreal. Acidos y bases Quimica.[en línea] Mexico: Universidad Nacional Autonoma De Mexico. 10 Noviembre 2014. [consultado en (poner fecha)] Disponible en: <https://es.slideshare.net/Amon_Ra_C/acido-base-41336025>

[A.A] ROTRONIC. Hygropalm-HP23-AW-A Portable analyser [en línea][consultado en (poner fecha)] Disponible en: <https://www.rotronic.com/en/hygropalm23-aw-hp23-aw.html>

[A.B] REPUBLICA de Chile, Ministerio de salud, División Jurídica. Reglamento sanitario de los alimentos. [Documento] Título VII de las leches y productos lácteos, párrafo V, Articulo 220. DTO. N° 977/96. D.OF. 13.05.97. [Consultado el (poner fecha)]

[A.C] SOCIÉTÉ GÉNÉRALE DE SURVEILLANCE. SGS. [en línea][consultado en (poner fecha)] Disponible en: <http://www.sgs.cl/es-ES/Agriculture-Food/Food/Retail-and-Hospitality/Nutrition-and-Composition-Analysis/Food-Sensory-Analysis.aspx>

[A.D] SOPROLE. Zero lacto. Preguntas frecuentes. [en línea] [consultado en (poner fecha)] Disponible en: <http://www.zerolacto.cl/preguntas-frecuentes >

[A.E] SOSA Gustavo Gomez. Indicadores de pH. [en línea] Facultad de química UNAM. Mexico. 2010. [consultado en (poner fecha)] Disponible en: <http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/12.IndicadoresdepH_9152.pdf>

[A.F] UNIVERSIA. Docente USM fue nombrado miembro observador de importante organismo internacional. Universia/RR. Chile. Universidad Santa Maria. 11 Enero 2010. [en línea] [consultado en (poner fecha)] Disponible en: <http://noticias.universia.cl/vida-universitaria/noticia/2010/01/11/267711/docente-usm-fue-nombrado-miembro-observador-importante-organismo-internacional.html>

[A.G] UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA. Prácticas de laboratorio curso 2013-2014, Química general. España. [en línea] [consultado en (poner fecha)] Disponible en: <http://www.uco.es/~qe1marim/Practica4.pdf>

[A.H] UNIVERSIDAD DE GRANADA. Practica online de microbiología para farmacéuticos, concepto. [en línea] España: Universidad de granada.[consultado en (poner fecha)] Disponible en: <http://www.ugr.es/~pomif/pom-bac/pb-i/pb-i-2-concepto.htm>

[A.I] WEB QC. Chemical portal, calculadora de masa molar. [en línea][consultado en (poner fecha)] Disponible en: <http://es.webqc.org/mmcalc.php>

[A.J] WIKIPEDIA. File: Bacterial growth en. Svg. 19 julio 2016. [en línea][consultado en (poner fecha)] Disponible en: <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Bacterial_growth_en.svg >

ANEXOS

ANEXO A: DESARROLLO DE CÁLCULOS

Tabla 1: porcentaje de acidez Día 1 (24-Oct-2016)

Muestra	1°Gasto en ml de NaOH	2° Gasto en ml de NaOH	Promedio del gasto en ml	Gramos de muestra	Porcentaje de acidez
M1	16,0	16,0	16,0	20,02	0,73
M2	16,0	16,0	16,0	20,10	0,73
M3	16,1	16,0	16,1	20,05	0,73
M4	16,0	16,0	16,0	20,00	0,73
M5	15,9	16,0	16,0	20,05	0,73
Abuso	16,1	16,0	16,1	20,03	0,73

Tabla 2: porcentaje de acidez Día 5 (28-Oct-2016)

Muestra	1°Gasto en ml de NaOH	2° Gasto en ml de NaOH	Promedio del gasto en ml	Gramos de muestra	Porcentaje de acidez
M1	15,8	15,8	15,8	20,00	0,72
M2	15,8	15,8	15,8	20,04	0,72
M3	15,8	15,9	15,9	20,10	0,72
M4	15,8	15,8	15,8	20,15	0,72
M5	15,8	15,8	15,8	20,01	0,72
Abuso	16,2	16,1	16,2	20,10	0,73

Tabla 3: porcentaje de acidez Día 10 (02-Nov-2016)

Muestra	1°Gasto en ml de NaOH	2° Gasto en ml de NaOH	Promedio del gasto en ml	Gramos de muestra	Porcentaje de acidez
M1	15,8	15,8	15,8	20,11	0,72
M2	15,7	15,8	15,8	20,08	0,72
M3	15,8	15,8	15,8	20,06	0,72
M4	15,8	15,8	15,8	20,03	0,72
M5	15,8	15,8	15,8	20,12	0,72
Abuso	16,2	16,2	16,2	20,00	0,74

Tabla 4: porcentaje de acidez Día 15 (07-Nov-2016)

Muestra	1°Gasto en ml de NaOH	2° Gasto en ml de NaOH	Promedio del gasto en ml	Gramos de muestra	Porcentaje de acidez
M1	15,9	15,9	15,9	20,00	0,73
M2	15,8	15,8	15,8	20,03	0,72
M3	15,7	15,8	15,8	20,05	0,72
M4	15,9	15,9	15,9	20,00	0,73
M5	15,8	15,9	15,9	20,10	0,72
Abuso	16,5	16,5	16,5	20,07	0,75

Tabla 5: porcentaje de acidez Día 19* (11-Nov-2016)

Muestra	1°Gasto en ml de NaOH	2° Gasto en ml de NaOH	Promedio del gasto en ml	Gramos de muestra	Porcentaje de acidez
M1	16,1	16,1	16,1	20,05	0,73
M2	15,8	15,8	15,8	20,00	0,72
M3	15,8	15,9	15,9	20,08	0,72
M4	15,8	15,8	15,8	20,02	0,72
M5	15,8	15,8	15,8	20,09	0,72
Abuso	16,7	16,6	16,7	20,15	0,75

Tabla 6: porcentaje de acidez Día 24 (16-Nov-2016)

Muestra	1°Gasto en ml de NaOH	2° Gasto en ml de NaOH	Promedio del gasto en ml	Gramos de muestra	Porcentaje de acidez
M1	16,1	16,1	16,1	20,03	0,73
M2	16,2	16,1	16,2	20,05	0,73
M3	16,2	16,2	16,2	20,09	0,74
M4	16,1	16,1	16,1	20,01	0,74
M5	16,1	16,1	16,1	20,04	0,73
Abuso	Hongos	-	-	-	-

Tabla 7: porcentaje de acidez Día 29 (21-Nov-2016)

Muestra	1°Gasto en ml de NaOH	2° Gasto en ml de NaOH	Promedio del gasto en ml	Gramos de muestra	Porcentaje de acidez
M1	16,0	16,0	16,0	20,06	0,73
M2	16,1	16,1	16,1	20,05	0,73
M3	16,1	16,2	16,2	20,00	0,74
M4	16,0	16,0	16,0	20,10	0,73
M5	16,2	16,1	16,2	20,04	0,74

Tabla 8: porcentaje de acidez Día 33 (25-Nov-2016)

Muestra	1°Gasto en ml de NaOH	2° Gasto en ml de NaOH	Promedio del gasto en ml	Gramos de muestra	Porcentaje de acidez
M1	16,3	16,3	16,3	20,12	0,74
M2	16,3	16,4	16,4	20,09	0,74
M3	16,4	16,4	16,4	20,00	0,75
M4	16,3	16,3	16,3	20,04	0,74
M5	16,4	16,3	16,4	20,07	0,74

Tabla 9: porcentaje de acidez Día 38 (30-Nov-2016)

Muestra	1°Gasto en ml de NaOH	2° Gasto en ml de NaOH	Promedio del gasto en ml	Gramos de muestra	Porcentaje de acidez
M1	16,4	16,4	16,4	20,01	0,75
M2	16,4	16,3	16,4	20,05	0,74
M3	16,3	16,4	16,4	20,10	0,74
M4	16,4	16,4	16,4	20,03	0,75
M5	16,4	16,4	16,4	20,00	0,75

Cálculos para acidez:

- Día 1:

M1:

$$\%Acidez = \frac{0{,}0160\ x\ 0{,}1015\ x\ 90}{20{,}02}\ x\ 100$$

M2:

$$\%Acidez = \frac{0{,}0160\ x\ 0{,}1015\ x\ 90}{20{,}10}\ x\ 100$$

M3:

$$\%Acidez = \frac{0{,}0161\ x\ 0{,}1015\ x\ 90}{20{,}05}\ x\ 100$$

M4:

$$\%Acidez = \frac{0{,}0160\ x\ 0{,}1015\ x\ 90}{20{,}00}\ x\ 100$$

M5:

$$\%Acidez = \frac{0{,}0160\ x\ 0{,}1015\ x\ 90}{20{,}05}\ x\ 100$$

Abuso:

$$\%Acidez = \frac{0{,}0161\ x\ 0{,}1015\ x\ 90}{20{,}03}\ x\ 100$$

- Día 5:

M1:

$$\%Acidez = \frac{0{,}0158\ x\ 0{,}1015\ x\ 90}{20{,}00}\ x\ 100$$

M2:

$$\%Acidez = \frac{0{,}0158\ x\ 0{,}1015\ x\ 90}{20{,}04}\ x\ 100$$

M3:

$$\%Acidez = \frac{0{,}0159\ x\ 0{,}1015\ x\ 90}{20{,}10}\ x\ 100$$

M4:

$$\%Acidez = \frac{0{,}0158\ x\ 0{,}1015\ x\ 90}{20{,}15}\ x\ 100$$

M5:

$$\%Acidez = \frac{0{,}0158\ x\ 0{,}1015\ x\ 90}{20{,}01}\ x\ 100$$

Abuso:

$$\%Acidez = \frac{0{,}0162\ x\ 0{,}1015\ x\ 90}{20{,}10}\ x\ 100$$

- Día 10:

M1:

$$\%Acidez = \frac{0{,}0158\ x\ 0{,}1015\ x\ 90}{20{,}11}\ x\ 100$$

M2:

$$\%Acidez = \frac{0{,}0158\ x\ 0{,}1015\ x\ 90}{20{,}08}\ x\ 100$$

M3:

$$\%Acidez = \frac{0{,}0158\ x\ 0{,}1015\ x\ 90}{20{,}06}\ x\ 100$$

M4:

$$\%Acidez = \frac{0{,}0158\ x\ 0{,}1015\ x\ 90}{20{,}03}\ x\ 100$$

M5:

$$\%Acidez = \frac{0{,}0158\ x\ 0{,}1015\ x\ 90}{20{,}12}\ x\ 100$$

Abuso:

$$\%Acidez = \frac{0{,}162\ x\ 0{,}1015\ x\ 90}{20{,}00}\ x\ 100$$

- Día 15:

M1:

$$\%Acidez = \frac{0{,}0159\ x\ 0{,}1015\ x\ 90}{20{,}00}\ x\ 100$$

M2:

$$\%Acidez = \frac{0{,}0158\ x\ 0{,}1015\ x\ 90}{20{,}03}\ x\ 100$$

M3:

$$\%Acidez = \frac{0{,}0158\ x\ 0{,}1015\ x\ 90}{20{,}05}\ x\ 100$$

M4:

$$\%Acidez = \frac{0{,}0159\ x\ 0{,}1015\ x\ 90}{20{,}00}\ x\ 100$$

M5:

$$\%Acidez = \frac{0{,}0159\ x\ 0{,}1015\ x\ 90}{20{,}10}\ x\ 100$$

Abuso:

$$\%Acidez = \frac{0{,}0165\ x\ 0{,}1015\ x\ 90}{20{,}07}\ x\ 100$$

- Día 19:

M1:

$$\%Acidez = \frac{0{,}0161\ x\ 0{,}1015\ x\ 90}{20{,}05}\ x\ 100$$

M2:

$$\%Acidez = \frac{0{,}0158\ x\ 0{,}1015\ x\ 90}{20{,}00}\ x\ 100$$

M3:

$$\%Acidez = \frac{0{,}0159\ x\ 0{,}1015\ x\ 90}{20{,}08}\ x\ 100$$

M4:

$$\%Acidez = \frac{0{,}0158\ x\ 0{,}1015\ x\ 90}{20{,}02}\ x\ 100$$

M5:

$$\%Acidez = \frac{0{,}0158\ x\ 0{,}1015\ x\ 90}{20{,}09}\ x\ 100$$

Abuso:

$$\%Acidez = \frac{0{,}0167\ x\ 0{,}1015\ x\ 90}{20{,}15}\ x\ 100$$

- Día 24:

M1:

$$\%Acidez = \frac{0{,}0161\ x\ 0{,}1015\ x\ 90}{20{,}03}\ x\ 100$$

M2:

$$\%Acidez = \frac{0{,}0161\ x\ 0{,}1015\ x\ 90}{20{,}05}\ x\ 100$$

M3:

$$\%Acidez = \frac{0{,}0162\ x\ 0{,}1015\ x\ 90}{20{,}09}\ x\ 100$$

M4:

$$\%Acidez = \frac{0{,}0161\ x\ 0{,}1015\ x\ 90}{20{,}01}\ x\ 100$$

M5:

$$\%Acidez = \frac{0{,}0161\ x\ 0{,}1015\ x\ 90}{20{,}04}\ x\ 100$$

- Día 29:

M1:

$$\%Acidez = \frac{0{,}0160\ x\ 0{,}1015\ x\ 90}{20{,}06}\ x\ 100$$

M2:

$$\%Acidez = \frac{0{,}0161\ x\ 0{,}1015\ x\ 90}{20{,}05}\ x\ 100$$

M3:

$$\%Acidez = \frac{0{,}0162\ x\ 0{,}1015\ x\ 90}{20{,}00}\ x\ 100$$

M4:

$$\%Acidez = \frac{0{,}0160\ x\ 0{,}1015\ x\ 90}{20{,}10}\ x\ 100$$

M5:

$$\%Acidez = \frac{0{,}0162\ x\ 0{,}1015\ x\ 90}{20{,}04}\ x\ 100$$

- Día 33:

M1:

$$\%Acidez = \frac{0{,}0163\ x\ 0{,}1015\ x\ 90}{20{,}12}\ x\ 100$$

M2:

$$\%Acidez = \frac{0{,}0164\ x\ 0{,}1015\ x\ 90}{20{,}09}\ x\ 100$$

M3:

$$\%Acidez = \frac{0{,}0164\ x\ 0{,}1015\ x\ 90}{20{,}00}\ x\ 100$$

M4:

$$\%Acidez = \frac{0{,}0163\ x\ 0{,}1015\ x\ 90}{20{,}04}\ x\ 100$$

M5:

$$\%Acidez = \frac{0{,}0164\ x\ 0{,}1015\ x\ 90}{20{,}07}\ x\ 100$$

- Día 38:

M1:

$$\%Acidez = \frac{0{,}0164\ x\ 0{,}1015\ x\ 90}{20{,}01}\ x\ 100$$

M2:

$$\%Acidez = \frac{0{,}0164\ x\ 0{,}1015\ x\ 90}{20{,}05}\ x\ 100$$

M3:

$$\%Acidez = \frac{0{,}0164\ x\ 0{,}1015\ x\ 90}{20{,}10}\ x\ 100$$

M4:

$$\%Acidez = \frac{0{,}0164\ x\ 0{,}1015\ x\ 90}{20{,}03}\ x\ 100$$

M5:

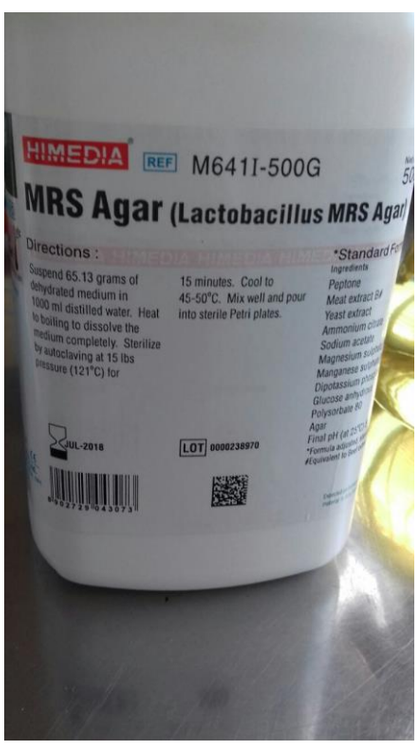
$$\%Acidez = \frac{0{,}0164\ x\ 0{,}1015\ x\ 90}{20{,}00}\ x\ 100$$

ANEXO B: ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO

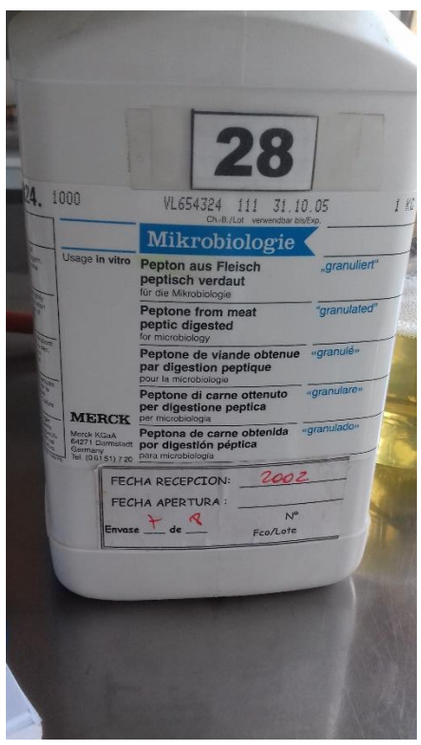
Para este análisis, no se pudieron realizar los cálculos correspondientes para cada recuento ya que el cultivo de las muestras presentó crecimiento invasivo y colonias muy pequeñas.

Los problemas presentados para este análisis se señalan a continuación:

- Para la prueba previa a los análisis se utilizó un agar MRS que se encontraba disponible en el laboratorio, pero para el análisis real se utilizó un nuevo agar que no era la misma marca.
- La segunda jarra para anaerobiosis encargada no llegó y con una sola no alcanzaba para la cantidad de cultivos. Se intentó utilizar un método más rustico que consistía en eliminar el oxígeno de un recipiente por medio de una vela, pero los resultados no fueron los esperados y no había recipientes suficientes. Para solucionar este problema se probó realizar los cultivos sin anaerobiosis dando como resultado un mayor número de colonias, pero de un tamaño muy pequeño, por lo que se optó dejar este análisis solo como cualitativo y representativo del aumento de población.



Agar utilizado para los análisis de práctica, tomada en el lab. De la UTFSM JMC



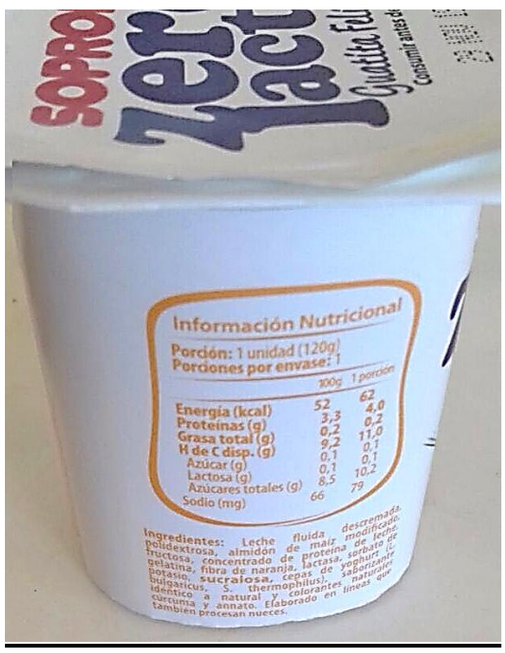
Agua peptonada utilizada para las diluciones. Tomada en el lab. De la UTFSM JMC

ANEXO C: COMPOSICIÓN ESENCIAL Y FACTORES DE CALIDAD CODEX ALIMENTARIUS, FAO

3.3 Composición

	Leche fermentada	Yogur, yogur en base a cultivos alternativos y leche acidófila	Kefir	Kumys
Proteína láctea[a] (% w/w)	mín. 2,7%	mín. 2,7%	mín. 2,7%	
Grasa láctea (% w/w)	menos del 10%	menos del 15%	menos del 10%	menos del 10%
Acidez valorable, expresada como % de ácido láctico (% w/w)	mín. 0,3%	mín. 0,6%	mín. 0,6%	mín. 0,7%
Etanol (% vol./w)				mín. 0,5%
Suma de microorganismos que comprenden el cultivo definido en la sección 2.1 (ufc/g, en total)	mín. 10^7	mín. 10^7	mín. 10^7	mín. 10^7
Microorganismos etiquetados[b] (ufc/g, en total)	mín. 10^6	mín. 10^6		
Levaduras (ufc/g)			mín. 10^4	mín. 10^4

ANEXO D: REALIDAD DEL YOGURT "SIN LACTOSA"



Es importante de señalar es que el yoghurt "Sin Lactosa", no es realmente sin lactosa, ya que este igual la posee solo que en un grado muy bajo, 0,1g de lactosa en 100g de alimento. Esto está señalado en el mismo envase del producto, sin embargo, el grado es tan bajo que puede ser consumido sin causar problemas por la población intolerante.